Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Evaluation of Cytotoxic and Apoptotic Mechanism of Hydro alcoholic Extract of Saffron Corm (*Crocus sativus*) on Molti-Form Glioblastoma Cells (U87)

Hamid Mozaferi Feizabad

MSc Student, College of Agriculture and Natural Resources, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Tel: 09036066809, E-mail: 2244hamid2244@gmail.com

Gholam Reza Sharifi-Sirchi

*Corresponding author. Faculty member of Agriculture and Natural Resources, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Tel: 09131951969, E-mail: sharifi-sirchi@hormozgan.ac.ir

Seid Hadi Mousavi

Faculty member of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Tel: 05118002258, E-mail: mousavih@mums.ac.ir

Abstract

Objective

Nowadays, plant components with anti-cancer effects and multi-mechanisms are desired by scientists. Studies have shown which to control of multi-factors diseases like cancer, should emphasize on anti-cancer multi-mechanisms components. One of the most common cancers in today's societies is glioblastoma. Therefore, in this research, the effect of hydro alcoholic extract of saffron corm as an anti-tumor drug on the survival of glioblastoma cells was investigated.

Materials and methods

In this study, extract of corm saffron (*Crocus sativus* L.) was prepared by softening method. The U۸۷ cell line (human primary glioblastoma cell line) was prepared from a pasteurized cell bank, multiple times passage, and the cells reached the required number. Cytotoxic drugs and extract of saffron curry were performed simultaneously and simultaneously based on MTT colorimetric assay with certain concentrations of drug and extract in ۲۴,۴۸, and ۷۲ hours. The apoptotic changes

of ,۱۲۰ and ۲۴۰ mg ml^{-1} of extract and control were measured by using flow cytometry and propidiodideid. In addition, ROS was measured for each of the concentrations of extract and control by fluorimetry and staining with DCF-DA.

Results

Results of MTT test shown that the highest cytotoxic effect was related to 400 µg ml^{-1} hydro alcoholic corm extract with 90 % toxicity and treatment 200 µg ml^{-1} with about 60 % toxicity stayed on second position. Temzolamide drug 125 µM had the highest toxicity of effect 55 %. The highest amounts of apoptotic cell death 87 and 95 % were related to 240 µg ml^{-1} hydro alcoholic corm extract in 24 and 48 hours after treat respectively based on flow cytometry data. ROS test at 6 hours after treat shown that the highest amount of adsorption were related to 240 and 120 µg ml^{-1} hydro alcoholic corm extracts respectively.

Conclusion

The results 24, 48, and 72 hours treatment of saffron corn extract and temzolamide showed their anti-tumor effects on glayobastoma cancer cells, and the results were dose-dependent and time-dependent. The results of the cytotoxic, apoptotic and oxidative stress determined that saffron corm extract have anti-tumor effects on U87 cancer cell line significantly ($P < 0.0001$) level and can increase oxidative stress on them.

Keywords: Apoptotic effects, U87 Cell, Hydro alcoholic extract, MTT, Saffron corm.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Mozaferi Feizabad H, Sharifi-Sirchi G R, Mousavi S H (2021) Evaluation of Cytotoxic and Apoptotic Mechanism of Hydro alcoholic Extract of Saffron Corm (*Crocus sativus*) on Molti-Form Glioblastoma Cells (U87). *Agricultural Biotechnology Journal* 12 (4), 23-42.

Agricultural Biotechnology Journal 12 (4), 23-42. DOI: 10.22103/jab.2020.15764.1226

Received: September 21, 2020. Accepted: November 15, 2020.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

بررسی مکانیسم سمیت سلولی و آپوپتوزی عصاره‌ی هیدروالکلی کورم زعفران *Crocus sativus* بر رده سلولی گلایوبلاستوم مولتی فرم (U87)

حمید مظفری فیض آباد

دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه هرمزگان، تلفن: ۰۹۰۳۶۰۶۶۸۰۹، ایمیل: 2244hamid2244@gmail.com

غلامرضا شریفی سیرچی

* نویسنده مسئول: هیات علمی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه هرمزگان، تلفن: ۰۹۱۳۱۹۵۱۹۶۹، ایمیل: sharifi-sirchi@hormozgan.ac.ir

سید هادی موسوی

هیات علمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، تلفن: ۰۵۱۱۸۰۰۲۲۵۸، ایمیل: mousavih@mums.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۲۵ **تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۳۱**

چکیده

هدف: امروزه، ترکیبات گیاهی با خواص ضد سرطانی و مکانیسم‌های چندتایی مورد علاقه دانشمندان قرار گرفته‌اند. مطالعات نشان داده است که برای درمان بیماری‌های چند عاملی مانند سرطان باید روی ترکیباتی با چند مکانیسم تاکید داشت که یکی از این ترکیبات جالب توجه، عصاره زعفران می‌باشد. از همین رو در این تحقیق، ارزیابی اثرات عصاره هیدروالکلی کورم زعفران به‌عنوان داروی ضدتومور بر قابلیت حیات سلول‌های سرطان گلایوبلاستوم بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه عصاره کورم زعفران (*Crocus sativus. L*) به روش خیسانده تهیه شد. سلول‌های سرطان گلایوبلاستوما رده سلولی U87[1] از بانک سلولی پاستور تهیه گردید و چندین بار مورد پاساژ قرار داده تا سلول‌ها به تعداد لازم رسیدند. سایتوتوکسی دارو و عصاره کورم زعفران هر یک به‌طور جداگانه و همزمان براساس تست رنگ سنجی MTT با غلظت‌های معین

1. Human primary glioblastoma cell line

از دارو و عصاره در تیمارهای ۲۴،۴۸،۷۲ ساعت انجام شد و میزان تغییرات آپوپتوژنیک غلظت‌های ۱۲۰ و ۲۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره و شاهد به‌روش فلوسایتومتری و پروپیدیوم‌یداید بررسی شد. همچنین سنجش ROS هر یک از غلظت‌های عصاره و شاهد به‌روش فلوریمتری و رنگ‌آمیزی DCF-DA انجام شد.

نتایج: نتایج آزمون MTT نشان داد که بیشترین مقدار سمیت مربوط به تیمار ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره با سمیت حدودا ۹۰ درصد و سپس تیمار ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با سمیت ۶۰ درصد بود. بیشترین مقدار سمیت داروی تموزولامید مربوط به تیمار ۱۲۵ میکرومولار با سمیت ۵۵ درصد سلول‌ها بود. بیشترین مقدار آپوپتوز تیمارهای استفاده شده در ۲۴ و ۴۸ ساعت مربوط به تیمار ۲۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره بود که براساس داده‌های فلوسایتومتری به‌ترتیب ۸۷ و ۹۵ درصد سلول‌ها در این تیمار کشته شدند. آزمون ROS در ساعت ۶ نشان داد بیشترین مقدار جذب در غلظت ۲۴۰ به‌دست آمد و تیمار ۱۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره هیدروالکلی کورم زعفران از لحاظ عدد جذب در کلاس b قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از تیمار ۲۴،۴۸،۷۲ ساعت عصاره کورم زعفران و تموزولامید نشان از وجود اثرات ضد توموری آنها بر روی سلول سرطانی گلایوبلاستوما داشت و نتایج وابسته به دوز و زمان بودند و در بررسی نتایج میزان اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوژنیک و اکسیداتیو سلولی نشان از معناداری در سطح ($P<0.0001$) داشت و مشخص شد که عصاره کورم زعفران می‌تواند استرس اکسیداتیو در رده سلول سرطانی U87 را تا حد قابل ملاحظه‌ای افزایش دهد.

کلمات کلیدی: اثرات آپوپتوزی، سلول U87، عصاره هیدروالکلی، MTT، پیاز زعفران

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: مظفری فیض آباد حمید، شریفی سیرچی غلامرضا، موسوی سیدهادی (۱۳۹۹) بررسی مکانیسم سمیت سلولی و آپوپتوزی عصاره‌ی هیدروالکلی کورم زعفران *Crocus sativus* بر رده سلولی گلایوبلاستوم مولتی فرم (U87). *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۲(۴)، ۲۳-۴۲.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

سرطان یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ‌ومیر در جهان است؛ بنابراین توجه به پیشگیری و درمان آن از اهمیت زیادی برخوردار است. برخی از انواع سرطان از جمله گلایوبلاستوما[2] با داشتن پتانسیل بالا برای رشد، تهاجم و مقاومت در برابر درمان‌های عمومی

2. Glioblastoma

مانند شیمی‌درمانی و رادیوتراپی دارای توانایی عود مجدد بالایی هستند. گلیوما به تومورهای ناشی از سلول‌های گلیا گفته می‌شود که شامل آستروسایتوما، گلایوبلاستوما، اولیگودندروگلیوما و اپندایموما می‌شوند.

گلیوما یکی از تومورهای اولیه سیستم عصبی مرکزی است که در نخاع یا مغز بروز می‌کند. گلیوبلاستوم مولتی‌فرم، کشنده‌ترین و معمول‌ترین نوع تومور مغزی بدخیم است. حتی زمانی که تهاجمی‌ترین نوع درمان که شامل رادیوتراپی، شیمی‌درمانی و جراحی است استفاده می‌شود، میانگین زندگی فقط بین ۱۲ تا ۱۷ ماه می‌باشد. در سال‌های اخیر مطالعات در مدل‌های حیوانی و همچنین کشت رده سلول‌های بدخیم سرطانی، تاثیرات ضد توموری و پیشگیری کننده از سرطان زعفران و اجزای اصلی آن را نشان داده‌اند . در این پژوهش‌ها عصاره زعفران و اجزای اصلی تشکیل دهنده آن یا همان کاروتنوئیدها، دارای خاصیت پیشگیری کننده سرطان می‌باشند(Hoshyar & Mollaei 2017; Milajerdi et al. 2015) . همچنین عصاره گیاه زعفران دارای خاصیت ضد فعال کنندگی لوکمی، استئوسارکوما، فیبروسارکوما و سرطان تخمدان می‌یاشد(Hosseinia et al. 2017) . براساس یافته‌ها، عصاره زعفران از طریق مهار سنتز RNA و DNA و افزایش آپوپتوز، سمیت انتخابی بر ضد سلول‌های سرطانی دارد. کروسین زعفران به واسطه تغییراتی در سطح ژن‌های DNA و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی به‌عنوان مهمترین ترکیب ضد سرطانی زعفران شناخته می‌شود. کروستین ممکن است از طریق کاهش سنتز DNA و RNA و پروتئین مهار RNA پلی مراز II در سلول‌های نئوپلاستیک و تداخل با ساختار هیستون H1 و H1-DNA رشد تعدادی از سلول‌های سرطانی را مهار کند (Hosseinia et al. 2017). آزمون MTT از روش‌های سنجش رنگی است که به‌منظور بررسی کمی میزان زنده‌مانی سلولی صورت می‌گیرد و در بحث سنجش سمیت سلولی نیز بسیار کاربرد دارد. در این روش براساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم توسط دهیدروژنازهای میتوکندریایی انجام می‌پذیرد و با تولید NADH و NADPH منجر به تشکیل رسوب نامحلول ارغوانی رنگ به نام فورمازان می‌شوند. این روش تکرار پذیری، دقت و حساسیت آزمایش بالا را دارا می‌یاشد. بررسی میزان آپوپتوز سلولی با استفاده از فلوسایتومتری (پیک Sub-G1) روشی مناسب برای چرخه سلولی است. آپوپتوز یک مرگ شایع در یوکاریوت‌ها می‌باشد که نقش اساسی در طول: جنین‌زایی، کنترل هومئوستاتیک[۳] و کنترل تومور و توسعه واکنش ایمنی دارد. هنگام دریافت سیگنال‌های خاص یکسری تغییرات شیمیایی مورفولوژیکی در سلول رخ می‌دهد. یک خانواده از پروتئین‌های شناخته شده به‌عنوان آنزیم‌های کاسپاز و شاید سایر پروتئین‌ها در مراحل اولیه آپوپتوز تاثیرگذار هستند که این پروتئین‌ها کلید شکست زیربنایی عملکرد عادی سلول می‌باشند.(Manosroi et al. 2006) برای تعیین میزان آپوپتوز سلولی از روش فلوسایتومتری استفاده شد. با کمک فلوسایتومتری می‌توان سیکل سلول و میزان تکثیر سلولی را نیز اندازه گرفت. قطعه قطعه شدن DNA[۴] از جمله مارکرهای مهمی است که در جریان آپوپتوز روی می‌دهد و طی آن قطعات مونو و الیگو نوکلئوزومال DNA[۵] تشکیل می‌گردند. چندین رنگ

2. Homeostatic
3. DNA fragmentation
5. Mono-and/or Oligo-nucleosomic DNA fragments, Low-molecular weight DNA fragments or multiples of which are often used as a marker of apoptosis.

فلورسنت وجود دارند که قابلیت اتصال به DNA را دارند. مهمترین آن‌ها که کاربرد گسترده دارد یدید پروپیدیوم[۶] است (Hegi et al. 2005). که در بین زنجیره‌های دو رشته‌ای اسید نوکلیک قرار می‌گیرد و توسط لیزر آرگون در طول موج ۴۸۸ نانومتر تحریک می‌شود و نور فلورسانس قرمز را از خود پراکنده می‌سازد. چون از ورود این رنگ توسط سلول‌های زنده به داخل جلوگیری می‌شود، یک راه تشخیص سلول‌های زنده از مرده ، استفاده از همین نوع رنگ است. همچنین با رنگ‌آمیزی سلول‌ها با PI و انجام فلوسایتومتری می‌توان درصد سلول‌ها در مراحل مختلف چرخه سلولی (G0/G1 ، S و G2/M) را مشخص نمود. چون که سلول های آپوپتوتیک محتوای DNA کمتری دارند هنگام فلوسایتومتری قبل از پیک مربوط به G1 یک پیک دیگر (Sub G1) ایجاد می‌کنند که اندازه‌گیری این پیک نشان‌دهنده درصد سلول‌های آپوپتوتیک است که دچار آپوپتوز شده‌اند (DNA کمتر یعنی شدت رنگ کمتر) (Stupp et al. 2009). اندازه‌گیری رادیکال‌های آزاد اکسیژن[۷] با استفاده از رنگ آمیزی (دی–سی–اف–اچ–دی–ای)[۸] روشی مهم در تعیین رادیکال‌های آزاد است. سلول‌ها در طول متابولیسم هوازی به طور مداوم اکسیژن واکنشی تولید می‌کنند. تولید ROS نقش ایمنی و عملکردی مهم در سیستم ایمنی را بازی می‌کند. تنش اکسیداتیو زمانی اتفاق می‌افتد سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی طبیعی در سلول آسیب می‌بیند. روش‌های متعددی برای اندازه‌گیری میزان ROS وجود دارد که یکی از ساده‌ترین روش‌های موجود استفاده از فلوئورسنت نفوذپذیر سلولی است. این روش یکی از گسترده‌ترین روش‌هایی است که مستقیما اندازه‌گیری وضعیت سلول را انجام می‌دهد. این تکنیک بسیار قابل اعتماد، روشی قابل پیگیری برای تغییرات ROS در طول زمان است. در این مطالعه اثرات سایتوتوکسیک، آپپتوژنیک و تاثیر اکسیداتیو عصاره هیدروالکلی گیاه زعفران بر روی رده سلولی U۸۷ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری هیدروالکلی به‌روش خیساندن: در ابتدا کورم‌های زعفران، از شهرستان تربت حیدریه بصورت خشک شده تهیه شدند. این کورم‌ها توسط هرباریوم دانشگاه فردوسی تایید شدند. سپس، پس از کندن لیف رویی این کورم‌ها تا حد ممکن با آسیاب خرد شدند. برای تهیه حلال الکلی ۷۰، درصد ۱۴۰ میلی‌لیتر الکل ۹۷ درصد به ۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. مقدار ۱۰ گرم از پودر کورم با حلال آماده شده، مخلوط شد و به‌مدت ۴۸ ساعت درون آون در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و هر ۲ ساعت یکبار هم زده شد. سپس با فیلتر ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌متر مربع تفاله‌های موجود در محلول جدا گردید و توسط قیف بوخمر ناخالصی حذف شد. حلال توسط دستگاه روتاری هییدولف[۹] به‌مدت ۱ ساعت استخراج شد و جهت تسریع عملیات در مخزن آب یخ ریخته

5. Potassium Iodide (IP)
7. Reactive oxygen species (ROS)
8 . Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA)
9 . Heidolph

شد. قبل از خشک شدن کامل و چسبیدن عصاره به درون بالن روتاری، عصاره خارج گردید و داخل پلیت منتقل شد. سپس در داخل آون در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

تست MTT:نمک تترازولیوم بروماید مورد استفاده در این آزمایش محصول شرکت سیگما[10] بود. محیط کشت کامل حاوی ۹۰ درصد محیط کشت DMEM که خود دارای ترکیبات: ۴/۵ گرم بر لیتر گلوکز، ۴/۵ گرم بر لیتر استیبل گلوتامین (ال-الانیل-ال-گلوتامین) آمینو اسید ضروری در محیط کشت سلولی، سدیم پیرووات به‌عنوان منبع انرژی اضافه و سدیم بی‌کربنات بود بعلاوه ۱۰ درصد اف-بی-اس (FBS)[11] مورد استفاده قرار گرفت.

دفریز کردن: با حفظ کلیه شرایط ایمنی و با دستکش ویال سلول‌های منجمد شده از تانک ازت خارج و در انکوباتور (۳۷ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد و در طی ۱ تا ۱/۵ دقیقه فرآیند ذوب انجام پذیرفت. محتویات داخل کرایوویال U87 به یک فالکن حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه شدند. محتویات لوله به‌مدت ۵ دقیقه با ۲۰۰۰ دور در دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ قرار گرفت و مایع رویی آن دور ریخته شد. سلول‌ها در فلاسک T25 با ۸ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM نگهداری شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون با میکروسکوپ معکوس بررسی و سپس پاساژ داده شدند.

مرحله پاساژ سلولی: سلول‌ها با محلول بافر فسفات شستشو داده شدند. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر محلول تریپسین به سلول‌های موجود در فلاسک اضافه و فلاسک به‌مدت ۵ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد تا سلول‌ها از کف فلاسک جدا شدند. سپس به سرعت محیط DMEM حاوی FBS به فلاسک اضافه شد (حدود ۴ میلی‌لیتر).) تا سلول‌ها در اثر تریپسین آسیب نبینند. خنثی کننده‌ی تریپسین همان FBS موجود در محیط کشت است که با محیط موجود، آنرا خنثی می‌کند. فالکن به‌مدت ۵ دقیقه با ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی بیرون ریخته شده و حدود ۴ میلی لیتر DMEM محتوی FBS ده درصد به فالکن اضافه می‌شود. سلول‌ها به فلاسک‌های جدید منتقل و این فلاسک به درون انکوباتور CO_2 منتقل شد.

مرحله پرکردن پلیت‌ها: پس از جداسازی سلول‌ها از فلاسک توسط تریپسین، محتویات فلاسک به لوله فالکن ۱۵ میلی لیتری منتقل شد و به‌مدت ۵ دقیقه با ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از حذف سوپرناتانت و اضافه کردن محیط کشت جدید، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با ۱۰ میکرولیتر محلول تریپان‌بلو ۰/۱ درصد مخلوط شد و ۱۰ میکرولیتر از محتوای اپندورف بر روی لام شمارش سلولی قرار داده شد. برای شمارش تعداد سلول‌ها، از لام هموسیتومتر که دارای ۴ مربع بزرگ بود و هر یک از این مربع‌ها خود از ۱۶ مربع کوچک‌تر تشکیل شده است، استفاده شد. مساحت کوچکترین مربع ۰/۰۰۲۵ مترمربع است. بنابراین مربع اصلی مساحتی برابر ۰/۰۴ مترمربع دارا است. از آنجاییکه عمق هر مربع برابر با ۰/۱ میلی‌متر است، حجمی که هر مربع گرفت برابر با ۰/۰۰۴ میکرولیتر است. برای محاسبه تعداد سلول‌ها از فرمول زیر استفاده شد.

[10]. Sigma, https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d6429?lang=en&region=IR
[11]. FBS (Fetal Bovin Serum)

$$\mu l \text{ تعدادسلول} = \frac{A * 1\mu l}{0/004}$$

که در آن A برابر با تعداد سلول‌ها در مربع اصلی است. و برای محاسبه تعداد سلول‌ها در ۱ میلی‌لیتر، تعداد سلول‌های به‌دست آمده در یک میکرولیتر در ۱۰۰۰ ضرب شد. در آزمایش ما، تعداد سلول‌ها در ۴ مربع کوچک گوشه‌ها شمرده شدند و حاصل بر ۴ تقسیم شد و عدد حاصل ابتدا در عدد ۲ (چون سوسپانسیون سلولی به نسبت ۲ در محلول تریپان بلو رقیق شده بود) ضرب شد. عدد حاصل تعداد سلول‌ها در ۰/۰۰۴ میکرولیتر بود سپس با تناسب تعداد سلول‌ها در ۱ میلی‌لیتر، محاسبه شد. روند تعداد سلول لازم و نحوه جداسازی با فرمول زیر انجام شد:

$$\frac{\text{تعداد سلول زیرلام}}{\text{تعداد سلول مورد نیاز}} = \frac{1\ ml}{\text{حجم مورد نیاز}}$$

حجم سلول مورد شمارش این مرحله زیر لام معادل ۱/۶ میلیون سلول بود که با توجه به اینکه ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت درون فالکن وجود داشت. پس، در مجموع ۳/۲ میلیون سلول موجود بود. پر کردن خانه ها در پلیت‌ها به صورت زیر انجام شد:

گروه ۱: سلول U87 + محیط کشت

گروه ۲: سلول TMZ + U87

گروه ۳: سلول U87 + غلظت‌های افزاینده عصاره هیدروالکلی کورم زعفران

گروه ۴: سلول U87 + غلظت‌های افزاینده داروی تموزولامید

هر چاهک با ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی پر شد. آزمایش در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدن. و با ۵ تکرار انجام شد.

مرحله‌ی تیماردهی: در این مرحله فرآیند تیماردهی انجام شد. برای این منظور ابتدا ۵۰ میلی‌گرم عصاره را با ترازوی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم وزن کرده، سپس با یک میلی‌لیتر حلالDMSO، محلول شدند. عصاره کورم زعفران در غلظت‌های (100, 200, 400, 800, 1600) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد . از داروی تموزولامید به‌عنوان داروی کنترل مثبت استفاده شد. غلظتهای (۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲، ۷/۸۱، ۳/۹، ۱/۹۵) میکروگرم بر میلی‌لیتر برای این دارو انتخاب شدند.

قرائت آزمون MTT: برای اندزه گیری اثر سایتوتوکسیک عصاره، آزمون MTT و تعیین زنده مانی سلولی انجام شد. برای این منظور، در پایان هر بازه زمانی به هر چاهک پلیت‌ها، مقدار ۱۰ میکرولیتر از نمک تترازولیوم با غلظت 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد. سپس پلیت‌ها، درون فویل آلومینیوم پیچیده و به‌مدت ۳ الی ۴ ساعت انکوبه شدند. پس از تخلیه چاهک‌ها، درون هر چاهک که حاوی بلورهای فورموزان بود با ۱۰۰ میکرولیتر DMSO پر شد و به‌مدت ۲ ساعت در دمای اتاق و در مکـانی تاریـک (درون فویل آلومینیوم) قـرار داده شدند. در نهایت چاهک‌ها با دستگاه EPOCH و با نرم افزار GEN5 با طیف ۵۷۰ نانومتر خوانده شدند.

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

بررسی میزان آپوپتوز سلولی با استفاده از فلوسایتومتری (پیک SUB-G1)-مرحله پرکردن پلیت‌ها: پس از شمارش سلولی هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی حاوی $۵/۴\times۱۰^{۶}$ سلول بود. هر چاهک پلیت با $۷*۱۰^{۵}$ سلول پر شد. در هر چاهک یک میلی‌لیتر محیط کشت کامل قرار گرفت.

گروه‌بندی برای عصاره کورم زعفران بصورت زیر بود:

گروه ۱: سلول U87 + محیط کشت

گروه ۲: سلول U87 + غلظت‌های افزاینده عصاره هیدروالکلی کورم زعفران

مرحله تیماردهی : از دو غلظت ۱۲۰ و ۲۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی کورم زعفران در این آزمایش استفاده شد. تیمارها در هر چاهک به ۲ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی سوسپانسیون سلولی اضافه شدند. برای این آزمایش دو تکرار برای هر غلظت در نظر گرفته شد و دو چاهک حاوی ۲ میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی نیز به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. پلیت به‌مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور قرار گرفت. سپس زیر میکروسکوپ چاهک‌های پلیت چک شد. محتوای محیط کشت هر چاهک به فالکن‌های سایز ۱۵ منتقل شد. هر فالکن شماره‌گذاری گردید و به همان ترتیب قبل، هر چاهک با PBS شسته شده و به فالکن مربوطه منتقل گردید. هر چاهک با تریپسین شسته شد و محتوای آن به فالکن مربوطه منتقل گردید. تمامی ۶ فالکن با ۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت تخلیه و در هر فالکن با ۰/۵ میلی‌لیتر بافر، سوسپانسیون سلولی تهیه شد. به‌منظور تثبیت سلول‌ها از اتانول کنسانتره ۷۰ درصد استفاده شد و به‌مدت ۲۰ الی ۳۰ دقیقه فالکن‌ها انکوبه شدند. دوباره فالکن‌ها سانتریفیوژ و سوپرناتانت تخلیه شدند و با ۱۰۰ میکرولیتر RNase A به‌مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. به هر فالکن ۴۰۰ میکرولیتر محلول PI اضافه شد و به‌مدت نیم ساعت انکوبه شد و بعد از این مرحله قرائت انجام شد..

اندازه‌گیری رادیکاهای آزاد با استفاده از رنگ آمیزی: ابتدا غلظت پایه ۲۵ میکرومول برلیتر به مقدار ۲ میلی‌لیتر از پودر DCFH-DA تهیه شد.

مرحله‌ی پرکردن پلیت‌ها: پس از شمارش سلولی هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی حاوی $۱/۵\times۱۰^{۶}$ سلول بود. بعد از رقیق‌سازی، هر کدام از سلول‌های پلیت با ۲۰×۱۰^{۳} سلول پر شد. گروه‌بندی برای عصاره کورم زعفران در آزمون رادیکال‌های آزاد بصورت زیر انجام شد:

گروه ۱: سلول U87 + محیط کشت

گروه ۲: سلول U87 + غلظت‌های افزاینده عصاره هیدروالکلی کورم زعفران (در بازه غلظت ۲۴۰-۱۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)

مرحله‌ی تیماردهی: از غلظت ۱۲۰ و ۲۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. برای هر غلظت، ۶ چاهک در سه پلیت (هر پلیت دو چاهک) پر شد. یک پلیت ۶ ساعت و دیگری ۸ ساعت و سومین پلیت ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمارها، قرائت شدند. هر کدام از پلیت‌ها را بعد از زمان انکوبه شدن معین شده، از داخل انکوباتور خارج و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر محلول از پیش آماده شده DCFH-DA به چاهک‌ها اضافه شد. به‌مدت ۳۰ دقیقه پلیت درون فویل نگه داشته شد. سپس، پلیت درون دستگاه پلیت خوان پرکین المر[۱۲] قرار گرفت و در طول موج ۴۸۵ نانومتر پلیت خوانده شد. همین روند برای سایر پلیت‌ها انجام شد. سپس در نهایت اعداد در نرم‌افزار GraphPad Prism7 تحلیل شد.

نتایج

نتایج عصاره هیدرو الکلی کورم زعفران: عصاره‌گیری هیدروالکلی از نمونه اولیه انجام شد و بازده عصاره از وزن خشک (p) برابر با ۱۰/۵ درصد بود.

نتایج آزمون MTT در ساعت‌های ٢٤, ٤٨ و ٧٢ : داده‌های حاصل از الایزای آزمون MTT، ۲۴ ساعت بعد از تیماردهی براساس آزمون‌های یک طرفه با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism7 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. براساس این آزمون اختلاف بین تیمارها در سطح احتمال ۰/۰۰۰۱ معنی‌دار شدند. با توجه به نتایج آزمون MTT در ساعت ۲۴ براساس داده‌های جدول (۱) بیشترین مقدار سمیت تیمارهای استفاده شده مربوط به تیمار ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره بود که حدودا ۹۰ درصد سلول‌ها در این تیمار کشته شدند و کمترین رنگ تولید شده را در پلیت هنگام قرائت با الایزا داشتند که از لحاظ سمیت در کلاس a قرار گرفت. تیمار ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی کورم زعفران از لحاظ سمیت در کلاس b قرار گرفت که براساس داده‌های الایزا سمیتی تقریبا معادل با ۶۰ درصد داشته است. همچنین رنگ تولید شده بیشتری نسبت به کلاس a را در پلیت هنگام قرائت با الایزا داشت. کلاس c متعلق تیمار ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و سمیت این کلاس برابر رقم تقریبی ۳۵ درصد بود. همچنین رنگ تولید شده بیشتری نسبت به کلاس b را در پلیت هنگام قرائت با الایزا داشت. در تیمار شاهد ۱۰۰ درصد و صفر درصد سمیت نشان داد. سلول‌های شاهد بیشترین رنگ تولید شده را در پلیت هنگام قرائت با الایزا داشتند و کلاس d را به‌خود اختصاص دادند.

۸. PerkinElmer

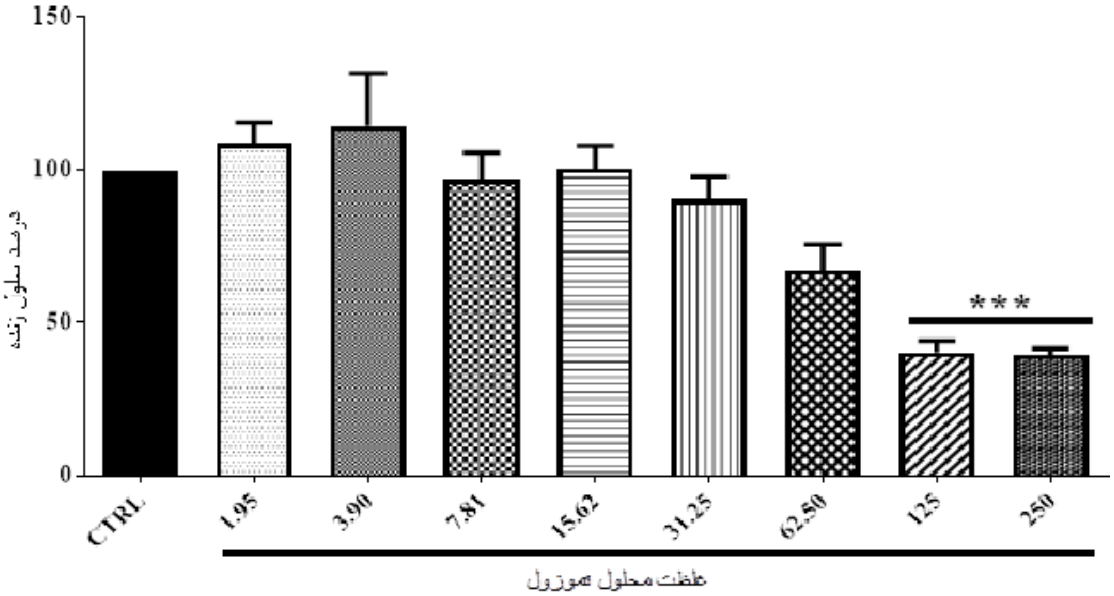
جدول ۱. آزمون MTT در ساعت‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ بعد از تیماردهی. تیمارها شامل: ۱۲۰ و ۲٤۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی کورم زعفران. Control، سلول‌های شاهد بدون تیمارعصاره. درصد سلول‌های زنده ± انحراف معیار. حروف کوچک انگلیسی، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۰/۰۰۰۱

Table 1. MTT test in 24, 48 and 72 hours after treatment. Treatments including: 120 and 240 µg ml^{-1} hydro alcoholic extract of Safaran corn. Control, Cells without treatments with extract. Percentage of live cell ± SE. Small English letter, show statistics significant differences in (p≤0.0001).

ساعت بعد از تیمار Hours after treat	تیمارها: عصاره هیدروالکلی کورم ژعفران (µg ml^{-1}) Treatments: hydro alcoholic content of Safaran corn extract (µg ml^{-1})	درصد سلول زنده Percentage of live cell
24	Control کنترل	99.98±2.665 d
	100 µg ml^{-1}	64.04±2.665 c
	200 µg ml^{-1}	36.77±2.665 b
	400 µg ml^{-1}	11±2.665 a
48	Control کنترل	100±2.712 d
	100 µg ml^{-1}	62.94±2.712 c
	200 µg ml^{-1}	35.49±2.712 b
	400 µg ml^{-1}	9.786±2.712 a
72	Control کنترل	100±2.635 d
	100 µg ml^{-1}	62.45±2.635 c
	200 µg ml^{-1}	35.44±2.635 b
	400 µg ml^{-1}	9.47±2.635 a

براساس تحلیل آماری با نرم‌افزار در غلظت حدود ۱۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر ۵۰ درصد سلول‌ها از بین رفتند و بدین صورت IC_{50} به‌دست آمد. مراحل مشابه برای داروی تموزولامید اجرا شد براساس داده‌های شکل (۱) بیشترین مقدار سمیت تیمارهای استفاده شده مربوط به تیمار ۱۲۵ میکرو مولار داروی تموزولامید بود که براساس داده‌های الایزا حدودا ۵۵ درصد سلول‌ها در این تیمار کشته شده بودند و کلاس d را تشکیل دادند که کمترین رنگ موجود در هنگام قرائت با الایزا را دارند. تیمار ۶۲/۵ میکرومولار از لحاظ سمیت در کلاس b قرار گرفت. که براساس داده‌های الایزا سمیتی تقریبا معادل با ۶۰ درصد داشته است. همچنین رنگ

تولید شده بیشتری نسبت به کلاس a را در پلیت هنگام قرائت با الایزا داشت. کلاس c متعلق به تیمار ۳۱/۲۵ میکرومولار بود و سمیت این کلاس برابر رقم تقریبا ۱۵ درصد بود. همچنین رنگ تولید شده بیشتری نسبت به کلاس b را در پلیت هنگام قرائت با الایزا داشت. در تیمار شاهد زنده‌مانی ۱۰۰ درصد و صفر درصد سمیت نشان داد. سلول‌های شاهد بیشترین رنگ تولید شده را در پلیت هنگام قرائت با الایزا داشتند و کلاس d را به‌خود اختصاص دادند.



شکل ۱. آزمون MTT در ساعت **۲٤. محورافقی شامل مقادیر تموزولامید بر واحد *µm*. Control، سلول‌های شاهد بدون تیمار. علامت بار نشان دهنده سه انحراف استاندارد می باشد و عدم انقطاع بارهای مربوط به تیمارهای مختلف نشان از عدم اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارها است**

Figure 1. MTT Test in 24 hours. X-axis including temozolamide content base on µm. Control, cells without treatments. Bar sign means 3 standard deviation

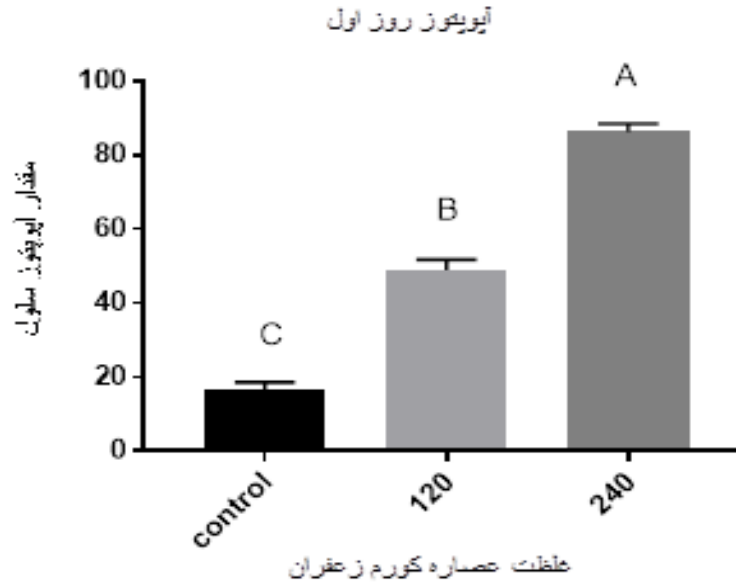
داده‌های حاصل از الایزای آزمون MTT در ساعت ۴۸ براساس آزمون‌های یک طرفه با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism7 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. براساس این آزمون تیمارها در سطح احتمال ۰/۰۰۱ معنی‌دار شدند. براساس تحلیل با نرم‌افزار آماری در ساعت ۴۸، IC_{50} در غلظت حدود ۱۲۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر به‌دست آمد. در آزمون MTT در ساعت ۴۸ براساس داده‌های جدول (۱) بیشترین مقدار سمیت تیمارهای استفاده شده مربوط به تیمار ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره بود که براساس داده‌های الایزا حدودا ۹۰ درصد سلول‌ها در این تیمار کشته شدند و کمترین رنگ تولید شده را در پلیت هنگام قرائت با الایزا داشتند که از لحاظ سمیت در کلاس a قرار گرفت. تیمار ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی کورم زعفران از لحاظ سمیت در کلاس b قرار گرفت که براساس داده‌های الایزا سمیتی تقریبا معادل با ۶۰ درصد داشته است. همچنین رنگ تولید شده بیشتری

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

نسبت به کلاس a را در پلیت هنگام قرائت با الایزا داشت. کلاس c متعلق به تیمار ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و سمیت این کلاس برابر رقم تقریبی ۳۵ درصد بود. همچنین رنگ تولید شده بیشتری نسبت به کلاس b در پلیت هنگام قرائت با الایزا داشت. نتایج در تیمار شاهد صفر درصد سمیت نشان داد. سلول‌های شاهد بیشترین رنگ تولید شده را در پلیت هنگام قرائت با الایزا داشتند و کلاس d را به‌خود اختصاص دادند. در آزمون MTT در ساعت ۷۲ براساس داده‌های جدول (۱) بیشترین مقدار سمیت تیمارهای استفاده شده مربوط به تیمار ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره بود که براساس داده‌های الایزا حدودا ۹۰ درصد سلول‌ها در این تیمار کشته شده بودند و کمترین رنگ تولید شده را در پلیت هنگام قرائت با الایزا داشتند که از لحاظ سمیت در کلاس a قرار گرفتند. تیمار ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی کورم زعفران از لحاظ سمیت در کلاس b قرار گرفت. که براساس داده‌های الایزا سمیتی تقریبا معادل با ۶۰ درصد داشته است. همچنین رنگ تولید شده بیشتری نسبت به کلاس a را در پلیت هنگام قرائت با الایزا داشت. کلاس c متعلق تیمار ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و سمیت این کلاس برابر رقم تقریبی ۳۵ درصد بود. همچنین رنگ تولید شده بیشتری نسبت به کلاس b را در پلیت هنگام قرائت با الایزا داشت. در تیمار شاهد صفر درصد سمیت نشان داد. سلول‌های شاهد بیشترین رنگ تولید شده را در پلیت هنگام قرائت با الایزا داشتند و کلاس d را به خود اختصاص دادند.

نتایج آزمون Sub-G1 با دستگاه فلوسایتومتری-ساعت ٢٤ تیمارعصاره هیدروالکلی کورم زعفران روی رده سلولی U87: براساس داده‌های شکل (۲) بیشترین مقدار آپوپتوز تیمارهای استفاده شده در ۲۴ ساعت مربوط به تیمار ۲۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره بود که براساس داده‌های فلوسایتومتری ۸۷ درصد سلول‌ها در این تیمار کشته شده بودند که از لحاظ آپوپتوز سلولی در کلاس a قرار گرفت. تیمار ۱۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی کورم زعفران از لحاظ آپوپتوز در کلاس b قرار گرفت. که براساس داده‌های فلوسایتومتری آپوپتوزی معادل با ۵۰ درصد داشته است. کلاس *c* متعلق تیمار شاهد بود و آپوپتوز این کلاس برابر رقم ۱۷ درصد بود.

ساعت ٤٨ تیمارعصاره هیدروالکلی کورم زعفران روی رده‌ی سلولی U87: براساس داده‌های شکل (۳) بیشترین مقدار آپوپتوز تیمارهای استفاده شده مربوط به تیمار ۲۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره بود که براساس داده‌های فتوسایتومتری ۹۵ درصد سلول‌ها در این تیمار کشته شده بودند که از لحاظ آپوپتوز سلولی در کلاس a قرار گرفت. تیمار ۱۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی کورم زعفران از لحاظ آپوپتوز در کلاس b قرار گرفت. که براساس داده‌های فلوسایتومتری آپوپتوزی معادل با ۵۷ درصد داشته است. کلاس c متعلق تیمارشاهد بود و آپوپتوز این کلاس برابر رقم ۲۴/۳ درصد بود.



شکل ۲. آزمون Sub G1 peak در ساعت ٢٤. محورافقی، تیمارها شامل: ۱۲۰ و ٢٤٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی کورم زعفران. Control; سلول‌های شاهد بدون تیمارعصاره. علامت بار نشان دهنده سه انحراف استاندارد می‌باشد.

Figure 2. Sub G1 peak Test in 24 hours. X-axis, Treatments including: 120 and 240 µg ml^{-1} hydro alcoholic extract of Safaran corn. Control, Cells without treatments with extract. Bar sign means 3 standard deviation.

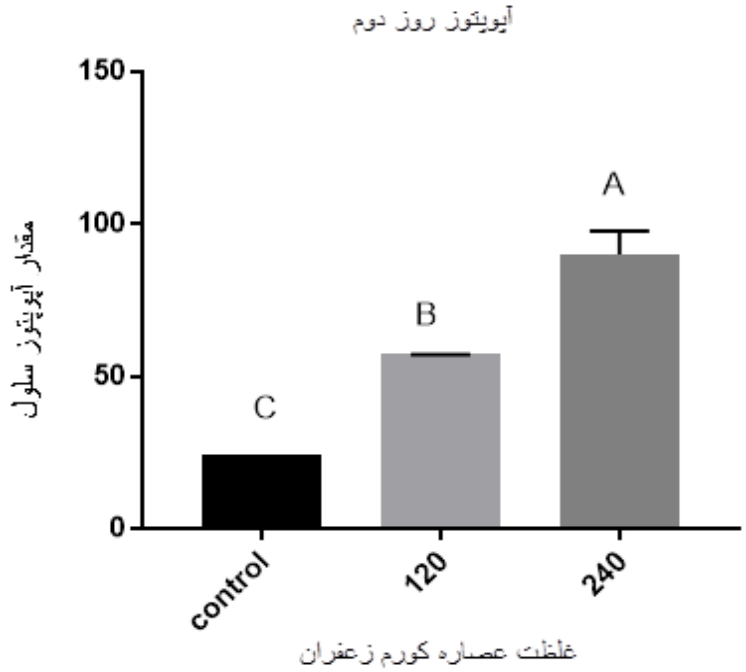
***نتایج برای ساعت‌های ٦، ٨ و ٢٤ تحت* نتایج اندازه‌گیری ROS با استفاده از رنگ‌آمیزی DCF-DA–**

تاثیر عصاره حاصل از خروجی دستگاه فلوریمتری: آنالیز آماری داده های حاصل از آزمون ROS در ساعت ۶ نشان داد که بین تیمارهای ۱۲۰ و ۲۴۰ و کنترل اختلاف معنادار آماری در سطح احتمال ۰/۰۰۰۱ وجود دارد.. براساس داده‌های جدول (۲) بیشترین مقدار جذب در غلظت ۲۴۰ به‌دست آمد که کلاس *a* را به‌خود اختصاص داد. تیمار ۱۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی کورم زعفران از لحاظ عدد جذب در کلاس b قرار گرفت وکلاس c متعلق تیمار شاهد بود.

براساس داده‌های جدول (۲) بیشترین مقدار جذب در غلظت ۲۴۰ به‌دست آمد که کلاس a را به‌خود اختصاص داد. تیمار ۱۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی کورم زعفران از لحاظ عدد جذب در کلاس b قرار گرفت وکلاس c متعلق تیمار شاهد بود. آنالیز آماری داده های حاصل از آزمون ROS در ساعت ۲۴ نشان داد که بین تیمارهای ۱۲۰ و ۲۴۰ و کنترل اختلاف معنادار آماری در سطح احتمال ۰/۰۰۰۱ وجود دارد. براساس داده‌های جدول (۲) بیشترین مقدار جذب در غلظت ۲۴۰ به‌دست آمد که

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

کلاس a را به‌خود اختصاص داد. تیمار ۱۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی کورم زعفران از لحاظ عدد جذب در کلاس b قرار گرفت و کلاس c متعلق تیمار شاهد بود.



شکل ۳. آزمون Sub G1 peak در ساعت ٤٨. محورافقی، تیمارها شامل: ۱۲۰ و ۲٤۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی کورم زعفران. Control; سلول‌های شاهد بدون تیمارعصاره. علامت بار نشان دهنده سه انحراف استاندارد می باشد.

Figure 3. Sub G1 peak Test in 48 hours. X-axis, Treatments including 120 and 240 µg ml^{-1} hydro alcoholic extract of Safaran corn. Control, Cells without treatments with extract. Bar sign means 3 standard deviation.

بحث

نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ساعت تیمارهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی کورم زعفران به‌ترتیب کمترین مقادیر سمیت را بر روی رده سلولی U87 دارند. هدف از این آزمون در مرحله اول اثبات وجود سمیت این عصاره بود. با توجه به نتایج هرچه میزان غلظت عصاره افزایش می‌یابد زنده‌مانی سلول‌ها کمتر می‌شود که وابستگی به غلظت را اثبات میکند. اما این وابستگی به زمان هم وجود داشت. زیرا میزان زنده‌مانی در غلظت‌های مختلف در پلیت ۲۴ ساعت بیشتر از پلیت ۴۸ ساعت بود و به‌همین ترتیب در پلیت ۴۸ ساعت نسبت به پلیت ۷۲ ساعت زنده‌مانی بیشتر بود.

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

جدول ۲. اندازه‌گیری ROS با استفاده از رنگ‌آمیزی DCF-DA در ساعت‌های ٦، ۸ و ٢٤. تیمارها شامل: ۱۲۰ و ۲٤۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی کورم زعفران. Control، سلول‌های شاهد بدون تیمارعصاره. میزان عدد جذب در فلورومتری ±. انحراف معیار. حروف کوچک انگلیسی، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۰,۰۵

Table 2. ROS measurement by DCF-DA staining method in 6, 8 and 24 hours. Treatments including: 120 and 240 µg ml^{-1} hydro alcoholic extract of Safaran corn. Control, Cells without treatments with extract. Amount of adsorption in fluorometry ± SE. Small English letter, show statistics significant differences in ($p \leq 0.05$).

ساعت بعد از تیمار Hours after treat	تیمارها: عصاره هیدروالکلی کورم ژعفران (µg ml^{-1}) Treatments: hydro alcoholic extract of Safaran corn (µg ml^{-1})	جذب Adsorption
6	کنترل Control	67963±9388 c
	120 µg ml^{-1}	75964±9388 b
	240 µg ml^{-1}	88654±9388 a
8	کنترل Control	109129±5615 c
	120 µg ml^{-1}	130276±5615 b
	240 µg ml^{-1}	143736±5615 c
24	کنترل Control	101049±12209 c
	120 µg ml^{-1}	131135±12209 b
	240 µg ml^{-1}	201432±12209 a

هدف دیگر یافتن میزان غلظت مؤثر برای سمیت ۵۰ درصد بود که در ۲۴ ساعت اول ۱۲۰/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. مطابق انتظار در ۴۸ ساعت این میزان بخاطر وجود سمیت در محیط کشت تشدید شد و البته در ۷۲ ساعت این تشدید شیب کمتری به‌خود گرفت. نتایج آزمایشات نشان داد که استفاده از عصاره زعفران روی رده‌های سلول‌های سرطانی اثرات ضد تکثیر دارد. در واقع عصاره زعفران می‌تواند روی سلول‌های سرطانی اثرات تعدیل‌کننده بر سم زدایی آنزیم‌های دخیل در مبارزه با استرس اکسیداتیو داشته باشد، فعالیت تلومراز را کاهش دهد و اثر پروآپوپتیک را افزایش دهد. سنتز DNA و RNA را کاهش دهد. همچنین

توانمندی بالای کروسین به‌عنوان یک ماده مؤثره عصاره زعفران در اتصال به tRNA[۱۳] برای ایجاد سمیت سلولی برای سلول‌های سرطانی مؤثر است(Bukhari et al, 2018). آزمایشی دیگر نشان داد که استفاده از عصاره زعفران روی رده سلول‌های سرطانی سینه اثرات سمی دارد. ابتدا با آزمون سنجش سمیت سلولی میزان غلظت برای ۵۰ درصد سمیت حساب شده است که به‌طور معنی‌داری با افزایش دوز و زمان افزایش یافته است. سپس با سنجش فاکتورهای آپوپتوز، کاسپاز ۹ شکسته شده نسبت به کاسپاز ۹ سالم افزایش معنی‌داری داشته است. یکی دیگر از عوامل که بررسی شده فاکتور تنش شبکه آندوپلاسمی می‌باشد. پروتئین XBP1s پس از تیمار با کروسین به‌طرز معنی‌داری افزایش یافته است. در نهایت میزان تجمع پروتئین Lc3-II به‌عنوان فاکتور مهم برای ارزیابی میزان اتوفاژی بررسی شده است که نشان از افزایش معنی‌دار این پروتئین دارد (Heidarzadeh et al, 2018). پس از آزمون سمیت و تعیین غلظت مؤثر، باید علت این سمیت معلوم شود که بخاطر آپوپتوز سلولی این سمیت ایجاد شده یا بخاطر نکروزه شدن سلول‌ها بوده است. پس از آزمون Sub-G1 استفاده شد.

براساس نتایج، آپوپتوز در تیمار کنترل کمترین میزان آپوپتوز بود و حدودا کمتر از ۱۵ درصد سلول‌ها بود. این میزان نشان دهنده قابل قبول بودن کنترل به‌عنوان شاهد بود. در غلظت ۱۲۰ به میزان ۵۰ درصد سلول‌ها دچار آپوپتوز شدند. این میزان از آپوپتوز به وضوح خاصیت آپوپتوزی عصاره را نشان داد. بحث در مورد غلظت ۲۴۰ نیز کاملا به‌همین منوال است. میزان بالایی از سلول‌ها دچار آپوپتوز شدند که ۸۰ تا ۹۰ درصد می‌باشد. این نکته مؤید این بود که غلظت عصاره به میزان لازم می‌تواند ایجاد آپوپتوز کند. این روند نشان‌دهنده تاثیر مستقیم عصاره هیدروالکلی پیاز زعفران بر روی آپوپتوز رده سلولی گلایوبلاستوما مولتی‌فرم می‌باشد. نتایج آزمایشی دیگر نشان داد که میزان غلظت عصاره زعفران در بازدارندگی ۵۰ درصد در سلول‌های سرطانی معده و مغز و سینه به وضوح از ۲۴ ساعت تا ۷۲ ساعت کاهش می‌یابد (Hoshyar et al, 2016). اما علت این امر با مقایسه Bax به‌عنوان پروتئینی که آپوپتوز را القا می‌کند با Bcl-2 به‌عنوان پروتئینی که از آپوپتوز جلوگیری می‌کند آشکار گردید. در واقع میزان Bax نسبت به Bcl-2 افزایش قابل توجهی داشت. در ساعت اول این نسبت میانگین ۵۵ درصد، در ۱۲ ساعت اول میانگین ۷۰ درصد، در ۲۴ ساعت میانگین ۱۱۰ درصد و در ۳۶ ساعت میانگین ۱۶۳ درصد را در سلول‌های سرطانی گلایوبلاستوما مولتی فرم U87 نشان داد. نتایج اندازه‌گیری استرس اکسیداتیو[۱۴] با استفاده از رنگ آمیزی DCF-DA نشان داد که در بازه زمانی ۶ ، ۸ و ۲۴ ساعت مقدار استرس اکسیداتیو در سلول‌های گلایوبلاستوما بوسیله تیمارهای ۱۲۰ و ۲۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب افزایش یافت. نتایج آزمایشی دیگر نشان داد عصاره پیکروکروسین که از ترکیبات مؤثر عصاره زعفران می‌باشد(YU et al, 2018). استرس اکسیداتیو با افزایش دوز پیکروکروسین MMP همراه بود. همچنین نسبت پروتئین Bax به پروتئین Bcl-2 نیز افزایش یافته است. یکی از نکات مهم قابل بررسی در آزمون ROS نوع ماهیتی است که این عصاره بر روی سلول سرطانی دارد. بخاطر خواص آنتی اکسیدانی، انتظار بر این بود که با کاهش استرس مواجه باشیم که با توجه به نتایج سمیت سلولی آن نشان می‌داد این عصاره به‌عنوان ماده پیشگیری از

13 . Transfer RNA

سرطان می‌تواند کاربرد داشته باشد. اما هرچه ساعت تیمار با عصاره کورم زعفران افزایش می‌یابد میزان استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد افزایش یافت که باعث تسریع فرآیند مرگ سلولی می‌شود. این موضوع می‌تواند گواه بر تاثیر درمانی مواد موجود در عصاره کورم زعفران روی رده سلولی گلایوبلاستوما مولتی فرم دارد و می‌تواند با دارا بودن مکانیزم‌های مؤثر، در درمان سرطان گلایوبلاستوما موثر باشد.

سپاسگزاری: بدینوسیله نگارندگان برخود لازم می‌دارند از حمایت‌های مادی و معنوی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه هرمزگان تشکر را بجا آورند.

منابع

حیدرزاده حمید؛ بطحایی سیده زهرا؛ آبرون سعید؛ محمد علی محققی (۱۳۹۶) بررسی اثر سمی کروسین بر رده سلولی MDA-MB-468 براساس القای آپوپتوز و تغییرات نشانگرهای تنش شبکه اندوپلاسمی و اتوفاژی. پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی ۲۰ (۴)، ۳۷-۵۱.

میلاجردی علیرضا؛ حقیقت دوست فهیمه؛ آزادبخت لیلا (۱۳۹۴) سمیت زعفران، کروسین و کروستین آن بر ضد سلول های سرطانی و طبیعی: یک مرور منظم. مجله تعالی بالینی ۴، ۵۵-۳۳.

هوشیار ریحانه؛ مصفوی نیا سیده الهام؛ بطحایی سیده زهرا (۱۳۹۴) خواص ضدسرطانی کلاله گیاه زعفران (کروکوسساتیووس). مجله علوم پزشکی رازی ۲۲ (۱۴۰)، ۷۸-۶۸.

References

Bukhari SI, Manzoor M, Dhar MK (2018) A comprehensive review of the pharmacological potential of *crocus sativus* and its bioactive apocarotenoids. Biomed Pharmacother 98, 733-745.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. NEJM 352(10), 997-1003.

Heidarzadeh H, Bathaie SZ, Abroun S, Mohagheghi MA (2017-2018) Evaluating the cytotoxic effect of crocin on MDA-MB-468 cell line based on apoptosis induction, ER stress, and autophagy markers. Pathobiology Research 20(4), 37-51 (In Persian).

Hoshyar R, Mollaei H (2017) A comprehensive review on anticancer mechanisms of the main carotenoid of saffron, crocin. JPP 69(11), 1419-1427.

Hoshyar R, Mostafavinia SE, Bathaie SZ (2016) Anticancer effects of saffron stigma (*Crocus Sativus*): a review study. RJMS 22(140), 68-78. (In Persian).

Hosseinia A, Bakhtiarib E, Khajavi Radd A, Shahrakid S, Mousavi SH (2017) The evaluation and comparing of cytotoxic effects of *Ferula gummosa* gum, *Scutellaria lindbergii*, *Kelussia odoratissima* and *Artemisia kopetdaghensis* extracts on ACHN cell line. IJPR 16(3), 1104-1112.

Manosroi J, Dhumtanom P, Manosroi A (2006) Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. Cancer lett 235(1), 114-20.

Milajerdi A, Haghighatdoost F, Azadbakht L (2015) Saffron (*Crocus satious* L.) and its crocin and crocetin toxicity against normal and tumor cells. A systematic review. J ClinExc 4, 33-55. (In Persian).

Stupp R, Hegi ME, Mason WP et al. (2009) Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. Lancet Oncol 10(5), 459-66.

Yu L, Li J, Xiao M (2018) Picrocrocin exhibits growth inhibitory effects against SK-MEL-2 human malignant melanoma cells by targeting JAK/ STAT5 signaling pathway, cell cycle arrest and mitochondrial mediated apoptosis. J BUON, 23(4), 1163-1168.