

مقایسه‌ی سایتوتوکسیکیتی عصاره‌ی آبی واتانولی زعفران (*Crocus sativus* . L) با داروی Paclitaxel و اثرات سینرژیک آن بر رده‌ی سلولی سرطان پستان (4T1)

دکتر سیدمحمدعلی شریعت زاده^۱، دکتر احمد همتا^۲، دکتر ملک سلیمانی مهرنجانی^۳، سمانه درویشی^۴

نویسنده‌ی مسوول: اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده‌ی علوم پایه، گروه زیست شناسی darvishi61@yahoo.com

دریافت: ۹۲/۵/۱۵ پذیرش: ۹۳/۳/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در بین زنان سرطان پستان است که در سال‌های اخیر آمار مبتلایان آن رو به افزایش است. از همین رو ما در این مطالعه ارزیابی اثرات زعفران به‌عنوان داروی ضد تومور بر قابلیت حیات سلول‌های سرطان پستان و اثر متقابل تیمار همزمان آن با داروی پاکلی تاکسول را بررسی نمودیم.

روش بررسی: در این مطالعه عصاره‌ی زعفران (*Crocus sativus* L.) را به روش سوکسله تهیه نمودیم. سلول‌های سرطان پستان رده‌ی 4T1 را از بانک سلولی پاستور فراهم نموده، چندین بار مورد پاساژ (واکشت سلولی) قرار داده تا سلول‌ها به تعداد لازم رسیدند. سایتوتوکسیکیتی دارو و عصاره‌ی زعفران هر یک به‌طور جداگانه و همزمان بر اساس تست‌های رنگ سنجی MTT و تریپان بلو با غلظت‌های معین از دارو و عصاره تیمارهای ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد و میزان تغییرات آپاپتوزنیک هر یک از ترکیبات توسط روش هونکست و پروپیدیوم یوداید بررسی گردید. یافته‌ها: نتایج حاصل از تیمار ۴۸ و ۷۲ ساعت عصاره‌ی زعفران و پاکلی تاکسول نشان از وجود اثرات ضد توموری آن‌ها بر سلول سرطانی پستان داشت و نتایج وابسته به دوز و زمان بود. در بررسی اثرات سینرژیک (همزمان) در تیمار ۴۸ ساعت، پاکلی تاکسول و عصاره‌ی زعفران نتایج نشان از افزایش معنی‌دار سایتوتوکسیکیتی دارو در سطح ($P < 0.05$) داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که پاکلی تاکسول و عصاره‌ی زعفران خواص ضدسرطانی چشمگیری علیه سلول‌های سرطانی پستان دارند. همچنین مشخص شد که عصاره می‌تواند سمیت سلولی القا شده توسط پاکلی تاکسول در سلول‌های سرطانی را تا حد قابل ملاحظه‌ای افزایش دهد این در حالی بود که عصاره‌ی آبی زعفران نتایج بهتری نشان داد.

واژگان کلیدی: پاکلی تاکسول، سرطان پستان، زعفران

مقدمه

سرطان پستان از شایع‌ترین نوع سرطان در زنان می‌باشد و میزان شیوع آن رو به افزایش است و با وجود پیشرفت در روش‌های درمانی مرگ و میر ناشی از آن همچنان بالاست. زنان زیادی این نوع سرطان را حداقل یک بار در طول عمر خود تجربه می‌کنند و گفته می‌شود سرطان پستان بعد از سرطان‌های پوست، مری، معده و غدد لنفاوی قرار

۱- دکترای تخصصی بافت و جنین شناسی، استاد دانشگاه علوم پزشکی اراک

۲- دکترای تخصصی ژنتیک مولکولی و سیتوژنتیک، استادیار دانشگاه علوم پزشکی اراک

۳- دکترای تخصصی بافت و جنین شناسی، دانشیار دانشگاه علوم پایه اراک

۴- کارشناسی ارشد سلولی تکوین، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک

می‌گیرد (۱). مواد غذایی نقش مهمی در مرحله‌ی شروع و نیز جلوگیری از پیشرفت سرطان ایفا می‌کنند و تعداد بیشماری از بیماران در سراسر دنیا از گیاهان دارویی به‌منظور حفظ سلامتی خود استفاده می‌کنند. بنابراین دانشمندان نگاه عمیقی بر خواص بیولوژیک و قدرت درمانی این محصولات دارند (۳ و ۲). در حال حاضر ایران بزرگترین تولید کننده و صادر کننده زعفران جهان است و بیش از ۶۵ درصد تولید جهانی این محصول گرانبها به ایران اختصاص دارد (۴). زعفران علاوه بر این که یک چاشنی غذایی پر مصرف است اثرات فارماکولوژیک متعددی نیز دارد و یک داروی ضد سرطان محسوب می‌شود (۵). زعفران در حالی که با دوزهای موثره در محدوده پایین میکروگرم به سلول‌های بدخیم رده‌های سلولی سرطان انسان اثر سایتوتوکسیتی داشته است، معمولاً قابلیت زیست سلول‌های سالم را تحت تاثیر قرار نداده، بنابراین می‌تواند کاندید خوبی برای ساخت داروی ضد تومور محسوب گردد (۶) ترکیبات ضد توموری زعفران شامل کروسیتین است که گلوکوزیدهایی متشکل از کاروتنوئیدی به نام کروسین و قندها است. همچنین ماده‌ی تلخ مزه پیکروکروسین که بر اثر تجزیه‌ی حرارتی یا آنزیمی به آلدئیدی معطر به نام سافرال تبدیل می‌گردد. از دیگر ترکیبات ضد توموری زعفران می‌توان به Camphor, Delphinidin, Alanine Lycopene, Myricetin و بسیاری ترکیبات دیگر اشاره کرد. مکانسم تاثیر مهم‌ترین ترکیبات ضد توموری زعفران از جمله کروسین و سافرال مهار سنتز اسید نوکلئیک و مهار عملکرد آنزیم توپوایزومراز II و در نهایت القای آپاپتوز است (۷). از دیگر ترکیبات طبیعی ضد توموری بسیار پر کاربرد و شناخته شده در مهار سرطان می‌توان به داروی شیمی درمانی پاکلی تاکسول اشاره کرد. این دارو ترکیبی دی‌ترپنی با ساختاری پیچیده است که غالباً از درخت سرخدار (Taxus) با عمر طولانی استخراج می‌گردد و دارای فعالیت بی‌نظیر ضد توموری است و در حال حاضر یک داروی مهم

ضد سرطان بوده که برای درمان انواع سرطان از جمله سرطان سینه و تخمدان بسیار موثر می‌باشد. با این وجود رشد آهسته و فراوانی کم این درخت و محتوای کم تاکسول در آن باعث شده مطالعات متعددی بر روی مسیرهای جایگزین آن و یا کاهش میزان مصرف آن انجام گیرد (۸). پاکلی تاکسول دارویی است که مانع پلیمریزه شدن توبولین نشده بلکه دپلیمریزه شدن آن را متوقف می‌کند و در نتیجه چرخه‌ی تقسیم میتوزی سلول متوقف می‌شود (۹-۱۱) مطالعات صورت گرفته نشان دادند زعفران توانایی مقابله با رشد سلول‌های سرطانی را دارد به‌طوری که تاثیر آن بر انواع مختلفی از رده‌های سرطان از جمله: لومفی، کارسینوم تخمدان و پستان، آدنوکارسینوم روده‌ی بزرگ، پاپیلوما دیده شده است (۷). با توجه به این نکته که تا به حال گزارشی از مقایسه‌ی اثر ضد توموری عصاره‌ی زعفران با پاکلی تاکسول صورت نگرفته و همچنین تاثیر همزمان عصاره‌ی زعفران با این دارو در این رده‌ی سلول سرطان پستان دیده نشده است، در این تحقیق اثر سایتوتوکسیتی عصاره‌ی آبی واتانولی زعفران بر سلول‌های سرطان پستان هم از نظر کمی و هم مورفولوژی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن با داروی پاکلی تاکسول مقایسه گردید و در نهایت تیمار همزمان عصاره‌ی زعفران و دارو به منظور مشاهده‌ی اثرات متقابل آن مورد بررسی قرار گرفت تا در صورت مشاهده تاثیرات مطلوب، بتوان از زعفران به‌طور همزمان در شیمی درمانی با پاکلی تاکسول برای افزایش تاثیر آن کمک گرفت.

روش بررسی

عصاره گیری زعفران (Saffron Extract): در این مطالعه پس از تعیین گونه‌ی زعفران (کد هرباریومی ۱۵۹-۰۳۱۹-۰۲ دانشگاه مشهد) ۵ گرم از آن توسط دستگاه سوکسله عصاره‌گیری شد، عصاره‌ی آبی را در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد برای چند روز نگهداری نموده، سپس با

حل و سپس فیلترشد، برای ۴ ساعت انکوبه گردید. طی انکوباسیون MTT با آنزیم سوکسینات دهیدروژناز که یکی از آنزیم‌های چرخه‌ی تنفسی میتوکندری هاست، احیا گردید، احیا و شکستگی این حلقه منجر به تولید کریستال‌های آبی فورمازان گردید که در زیر میکروسکوپ قابل تشخیص‌اند. در نهایت با حلال DMSO (دی متیل سولفوکساید)، ۱۰۰ میکرولیتر به ازای هر چاهک کریستال‌های فورمازان تشکیل شده در سلول‌های زنده را حل نمودیم و توسط دستگاه الایزا (Elizaplate Reader) و در ۴۹۰ نانومتر جذب مورد نظر، قرائت شد. مراحل انجام تست تریپان بلو نیز طبق پروتکل آن انجام گرفت با این تفاوت که در تست تریپان بلو تعداد ۱۰^۶ سلول در هر چاهک پلیت ۱۲ خانه ریخته شد و پس از طی زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت محیط کهنه را درون فالكون ریخته، کف چاهک‌ها را تریپسینه کرده و سلول‌های جدا شده را درون همان فالكون موبوطه ریختیم و پس از سانتیفریژ کردن و اضافه کردن رنگ تازه تریپان بلو به نسبت ۱:۱ با محیط سوسپانسیون و طی زمان کمتر از ۳ دقیقه توسط لام هموسیتر و میکروسکوپ نوری تعداد سلول‌های مرده و زنده را مورد شمارش قرار دادیم، غلظت‌های داروی پاکلی تاکسول (۰/۰۱ تا ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) استفاده شد که در تیمار همزمان به نسبت مساوی با عصاره‌ها به هر چاهک اضافه شد (۱۳ و ۱۲، ۸).

بررسی تغییرات آپاتوزنیک، مورفولوژیک (Apoptosis) در بررسی این تغییرات از رنگ‌های فلورسانت هوخست و پروپیدیوم آیداید (PI) استفاده شد به‌طوری که پس از انجام تیمار با دوزهای مورد نظر سطح سلول‌ها را با بافر فسفات (PBS) شسته‌ی آن‌ها را تحت تاثیر غلظت مناسب از این رنگ‌ها قرار دادیم. غشای سلول سالم اجازه ورود برخی رنگ‌ها (PI) را به سلول نمی‌دهد. برعکس هوخست از غشا عبور کرده و وارد سلول می‌شود و رنگ آبی ایجاد می‌کند که در نهایت با میکروسکوپ فلورسانس تغییرات هسته

دستگاه لیوفیلیزر (Freeze Dry-Backman) به صورت پودر خشک شده آماده شد و در تهیه‌ی عصاره اتانولی همین روش تکرار ولی خشک کردن عصاره‌ی آن به کمک دستگاه تغلیظ در خلا (concentrator evaporator) انجام گردید. بعد از این مراحل برای ساخت غلظت‌های عصاره‌ی آبی (۲۰۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و عصاره‌ی اتانولی (۲۵۰ تا ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) عصاره‌های خشک شده در محیط کشت بدون سرم (RPMI) حل شد و در دمای ۴ درجه‌ی نگهداری شد و اولین غلظت هر تیمار بدون وجود عصاره‌ها به‌عنوان شاهد انتخاب شد.

کشت سلول (cell culture): رده‌ی سلولی (4T1): سرطان پستان موش نژاد ویستار (BALB/C)، از بانک سلولی انستیتو پاستور خریداری شد و پس از چند دوره پاساژ سلولی (واکشت) به تعداد مورد نظر رسید. محیط کشت مورد نیاز این رده سلولی (Roswell Park Memorial Institute Medium) RPMI از FBS ۱۰ درصد استفاده شد و سلول‌ها در انکوباتور CO2 دار و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. **بررسی توان زیستی سلول‌ها (Cell Viability):** برای سنجش توان زیستی سلول‌ها در تیمار با ترکیب شیمی درمانی پاکلی تاکسول و عصاره‌های آبی و اتانولی زعفران و نیز اثر همزمان آن‌ها بر یکدیگر از تست MTT Assay (دی متیل تیازول - دی فنیل تترازولیوم بروماید) و تست تریپان بلو استفاده شد. برای تست MTT، تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه مورد نیاز بود که توسط تریپسینه کردن و پاساژ دادن، سلول‌ها استخراج و در چاهک‌ها کشت داده شد و برای ۲۴ ساعت انکوبه گردید، پس از طی زمان لازم و چسبیدن سلول‌ها به کف چاهک‌ها محیط کهنه را برداشته، چاهک شاهد و آزمایش را انتخاب و با دوز دارو و عصاره‌ی مورد نظر و محیط تازه در بازه‌های زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار نمودیم در نهایت محیط را برداشته و با محلول تازه MTT که با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در PBS استریل

وسیتوپلاسم مورد بررسی قرار گرفت. در متغیرهایی که دارای توزیع نرمال بودند، از آزمون T و One Way ANOVA استفاده گردید. همچنین در ترسیم نمودارها از نرم افزار Excel و تصاویر از نرم افزار Motic استفاده شد.

یافته‌ها

در تیمار با داروی پاکلی تاکسول در دزهای مختلف تفاوت‌ها بارز و وابسته به دز نشان داد و با مقایسه‌ی

دزها (IC_{50}) در تیمار ۴۸ ساعت غلظت ($0.1 \mu\text{g/ml}$) و در تیمار ۷۲ ساعت غلظت ($0.15 \mu\text{g/ml}$) محاسبه گردید (نمودار و جدول ۱). در تیمار با عصاره‌ی اتانولی زعفران در دزهای مختلف، سایتوتوکسیتی وابسته به دز (غلظت) و زمان نشان داد و با مقایسه‌ی دزها (IC_{50}) در تیمار ۴۸ ساعت غلظت ($1800 \mu\text{g/ml}$) و در تیمار ۷۲ ساعت غلظت ($1200 \mu\text{g/ml}$) محاسبه گردید (نمودار و جدول ۲).

جدول ۱: مقایسه‌ی میانگین درصد توانایی زیستی دزهای مختلف پاکلی تاکسول (*Paclitaxel*) در تیمار ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش *MTT Assay*. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

Dos Paclitaxel ($\mu\text{g/ml}$)	Blank	0/001	0/01	0/1	1	10
میانگین $\pm$ انحراف معیار (۴۸ ساعت)	1/00 $\pm$ 00	82/2 $\pm$ 4/1	64/3 $\pm$ 7/1	54/7 $\pm$ 4/69	38/90 $\pm$ 1/3	28/14 $\pm$ 2/1
میانگین $\pm$ انحراف معیار (۷۲ ساعت)	1/00 $\pm$ 00	90/75 $\pm$ 3/0	89/0 $\pm$ 2/2	85/8 $\pm$ 3/4	53/0 $\pm$ 3/4	40/2 $\pm$ 1/3

جدول ۲: مقایسه‌ی میانگین درصد توان زیستی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی اتانولی زعفران (*Ethanollic Saffron*) در تیمار ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش *MTT Assay*. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

Dos Ethanollic Saffron ($\mu\text{g/ml}$)	Blank	250	500	1000	1500	2000
میانگین $\pm$ انحراف معیار (۴۸ ساعت)	1/00 $\pm$ 00	92/2 $\pm$ 3/4	71/1 $\pm$ 18/7	69/3 $\pm$ 5/55	67/6 $\pm$ 5/26	55/4 $\pm$ 1/5
میانگین $\pm$ انحراف معیار (۷۲ ساعت)	1/00 $\pm$ 00	84/3 $\pm$ 4/08	81/4 $\pm$ 0/2	79/9 $\pm$ 5/7	50/5 $\pm$ 3/4	54/04 $\pm$ 0/7

در تیمار عصاره‌ی آبی زعفران با مقایسه‌ی داده‌ها تفاوت‌ها بارز و اثر سایتوتوکسیتی عصاره وابسته به دز و زمان نشان داد و (IC_{50}) در تیمار ۴۸ ساعت، غلظت ($500 \mu\text{g/ml}$) و در تیمار ۷۲ ساعت ($220 \mu\text{g/ml}$) محاسبه گردید (نمودار و جدول ۳). در تیمار همزمان داروی پاکلی تاکسول و عصاره‌ی آبی واتانولی مشاهده گردید که عصاره‌ها توان سمیت پاکلی تاکسول را در مهار سلول‌های سرطانی افزایش دادند و (IC_{50}) در تیمار ۴۸ ساعت دارو با عصاره‌ی آبی زعفران، دز ($0.07 \mu\text{g/ml}$) و در تیمار دارو همزمان با عصاره‌ی اتانولی دز ($0.15 \mu\text{g/ml}$) محاسبه گردید (جدول و نمودار ۴). نتایج حاصل از تست تریپان بلو نیز مؤید همین

نتایج است. نتایج سنجش *MTT* با اندازه‌گیری جذب نوری (*OD*) بر اساس غلظت عصاره‌ها و داروی شیمی درمانی در مقایسه با میزان توان زیستی در نمودارها آرایه شده است. درصد سلول‌های زنده تحت تیمار نسبت به سلول‌هایی که تیمار دریافت نکرده بودند، با استفاده از فرمول ذیل محاسبه گردید:

جذب نوری سلول‌های تیمار شده $\times 100 = \text{viability\%}$ - میانگین جذب نوری سلول‌های کنترل در هر ول نمودار (۱). مقایسه‌ی میانگین درصد توانایی زیستی دزهای مختلف پاکلی تاکسول (*Paclitaxel*) در تیمار ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش *MTT Assay* مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار و

تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شده است (ANOVA, One Way)

جدول ۳: مقایسه‌ی میانگین درصد توان زیستی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی آبی زعفران (*Aquamus.Saffron*) در تیمار ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش *MTTassay* مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

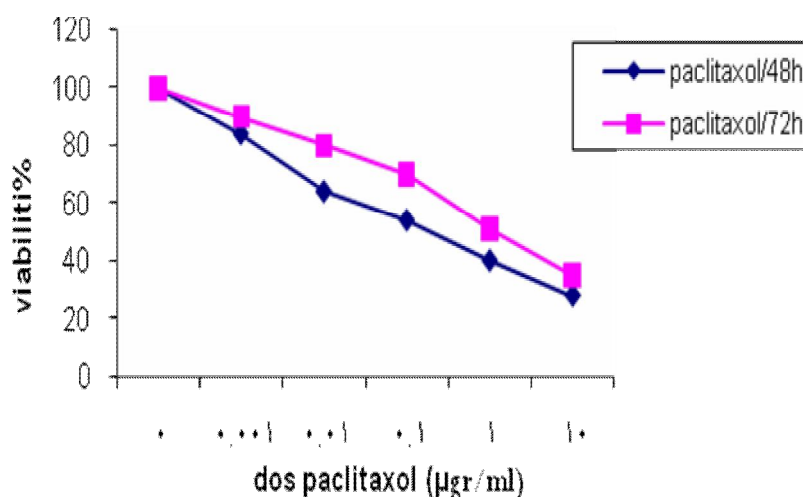
Dos Aquamus Saffron ($\mu\text{g/ml}$)	Blank	200	400	600	800	1000
میانگین $\pm$ انحراف معیار (۴۸ ساعت)	1/00 $\pm$ 00	90/49 $\pm$ 0/51	69/98 $\pm$ 0/7	62/8 $\pm$ 0/4	90/1 $\pm$ 0/26	92/7 $\pm$ 1/4
میانگین $\pm$ انحراف معیار (۷۲ ساعت)	1/00 $\pm$ 00	54/8 $\pm$ 4/08	60/04 $\pm$ 0/2	62/4 $\pm$ 1/3	78/65 $\pm$ 1/86	85/86 $\pm$ 0/55

جدول ۴: مقایسه‌ی میانگین درصد توان زیستی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی آبی واتانولی زعفران در تیمار همزمان با پاکلی تاکسول در ۴۸ ساعت با روش *MTTassay* مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

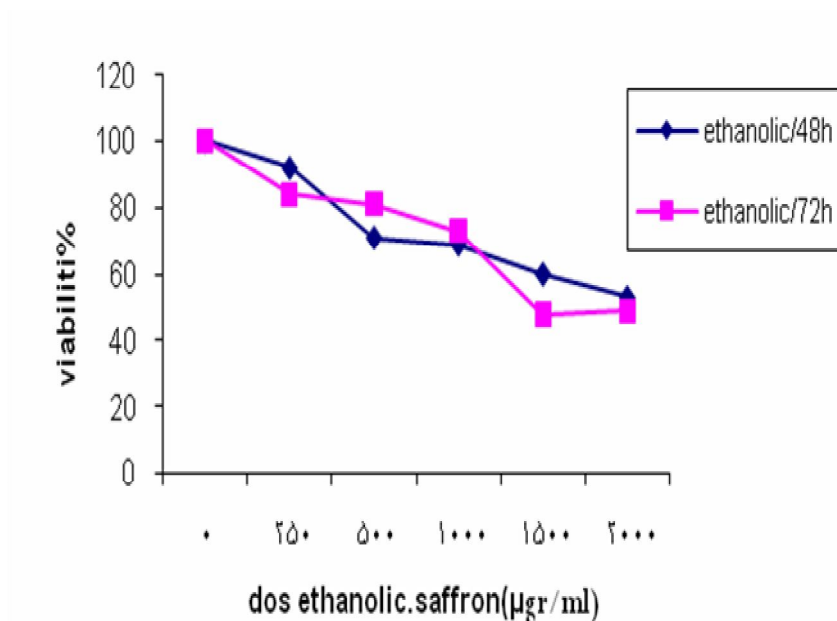
Dos Paclitaxel./Saffron($\mu\text{g/ml}$)	Blank	1	2	3	4	5
میانگین $\pm$ انحراف معیار Paclitaxel	1/00 $\pm$ 00	82/2 $\pm$ 4/1	64/3 $\pm$ 7/1	59/7 $\pm$ 4/69	38/90 $\pm$ 1/3	28/14 $\pm$ 2/1
میانگین $\pm$ انحراف معیار Ethanolic. Paclitaxel	1/00 $\pm$ 00	81/7 $\pm$ 0/8	70/10 $\pm$ 9/1	47/43 $\pm$ 0/2	23/4 $\pm$ 1/2	22/7 $\pm$ 5/1
میانگین $\pm$ انحراف معیار Aquamus. Paclitaxel	1/00 $\pm$ 00	78/67 $\pm$ 1/9	57/5 $\pm$ 0/2	38/2 $\pm$ 0/7	25/5 $\pm$ 7/3	21/55 $\pm$ 7/4

دز درصد حیات سلول‌ها به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد. محور افقی غلظت دارو و محور عمودی درصد بقای سلولی را نشان می‌دهد.

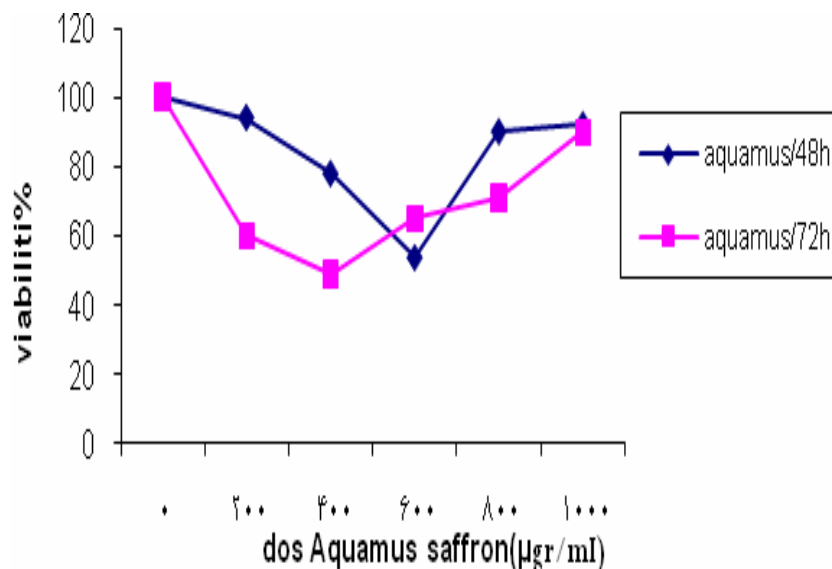
نتایج حاصل از جدول و نمودار (۱) نشان داد اثر سایتوتوکسیتی (مهار سلولی) داروی پاکلی تاکسول دارای اثر متقابل بر بقای سلول سرطانی دارد به این معنی که با افزایش



نمودار ۱: مقایسه میانگین درصد توانایی زیستی دوزهای مختلف پاکلی تاکسول (Paclitaxel) در تیمار ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش MTT assay. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شده است (ANOVA, one way)



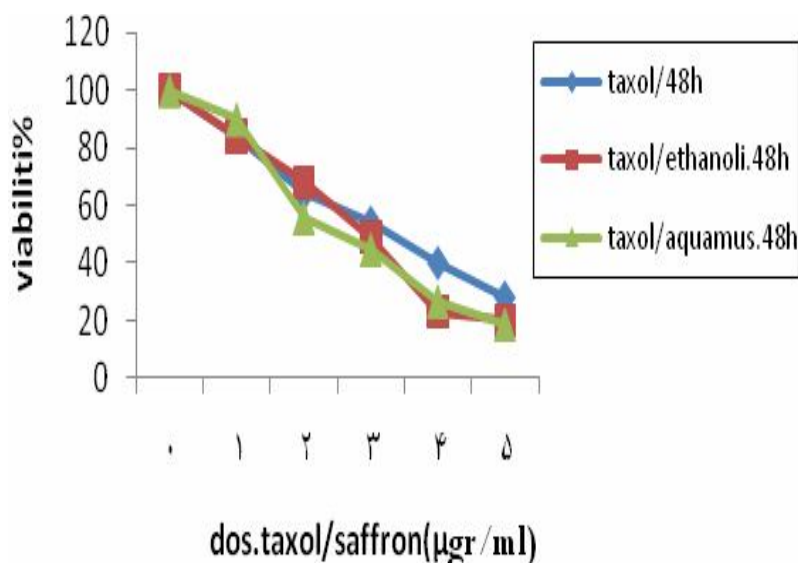
نمودار ۲: مقایسه میانگین درصد توان زیستی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی اتانولی زعفران (Ethanolic Saffron) در تیمار ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش MTT assay. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شده است (ANOVA, One Way)



نمودار ۳. مقایسه‌ی میانگین درصد توان زیستی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی آبی زعفران (*Aquamus.Saffron*) در تیمار ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش *MTT assay*. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شده است (ANOVA, One Way)

حیات سلول‌های سرطانی اثر متقابل دارد، به‌طوری‌که با افزایش زمان تیمار، بر سمیت عصاره افزوده می‌شود و کاهش معنی‌داری بر درصد توان زیستی آن‌ها دارد و اثرات این سمیت در غلظت خاصی از عصاره دیده شد به‌طوری‌که با افزایش غلظت تفاوت معنی‌داری در کاهش توان حیات سلول‌های سرطانی مشاهده نگردید.

نتایج حاصل از جدول و نمودار (۲) نشان داد دز و زمان تیمار عصاره‌ی اتانولی زعفران با توانایی زیستی سلول‌های سرطانی دارای اثرات متقابل می‌باشد، به‌صورتی‌که با افزایش دوز قابلیت حیات سلول‌ها کاهش معنی‌داری پیدا می‌کند که با افزایش زمان این نتایج موثرتر بود. نتایج حاصل از جدول و نمودار (۳) نشان داد زمان و غلظت عصاره‌ی آبی زعفران بر قابلیت

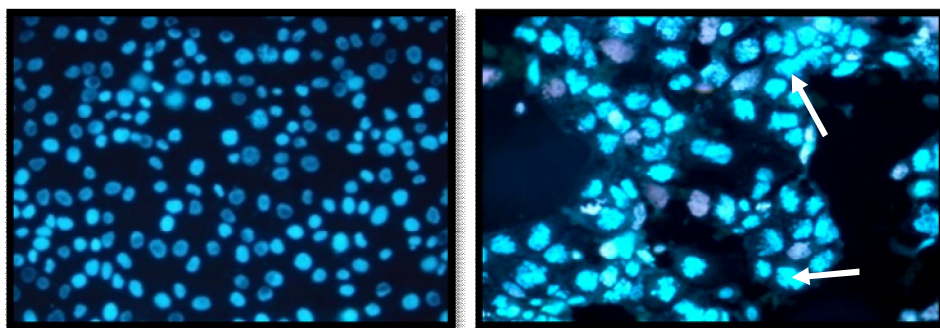


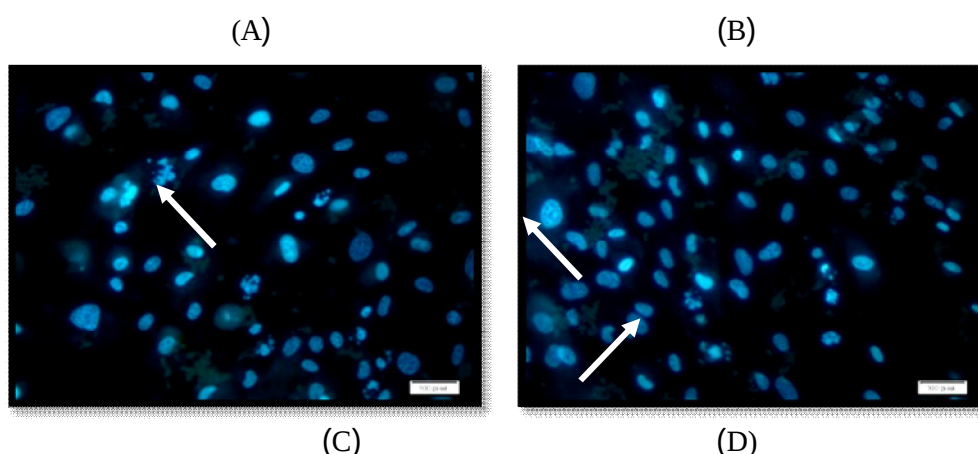
نمودار ۴: مقایسه‌ی میانگین درصد توان زیستی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی آبی واتانولی زعفران در تیمار همزمان با پاکلی تاکسول در ۴۸ ساعت با روش MTT assay مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شده است (ANOVA, One Way)

هوخست و pI ، نشانگر وجود تغییرات هسته بود که بیان‌گر مراحل آپاتوز می‌باشد. این تغییرات در تیمار با عصاره‌ی زعفران شامل حفره‌دار شدن هسته و قطعه قطعه شدن DNA بود و در تیمار تاکسول سلول‌های با هسته‌ی غول پیکرو DNA تکه تکه شده مشاهده گردید.

نتایج حاصل از جدول و نمودار (۴) نشان داد تیمار همزمان دارو و عصاره‌ی آبی واتانولی زعفران سبب افزایش قدرت مهار سلولی دارو شد، به‌طوری‌که با افزایش غلظت، بر سمیت داروی پاکلی تاکسول افزوده گردید و کاهش معنی‌داری بر میانگین درصد توان زیستی سلول‌های سرطان پستان داشت. نتایج حاصل از تغییرات آپاتوزنیک عصاره‌های

زعفران و داروی شیمی درمانی پاکلی تاکسول توسط





شکل ۱: بررسی تغییرات مورفولوژیک توسط رنگ آمیزی فلورسانت. A: سلول‌های کنترل B: سلول تیمار شده با دز $400 \mu\text{g/ml}$ تا ۴۸ ساعت، C: تیمار با عصاره‌ی آبی زعفران دز $400 \mu\text{g/ml}$ در ۴۸ ساعت و D: تیمار عصاره‌ی اتانولی دز $2000 \mu\text{g/ml}$ در ۴۸ ساعت

بحث

با توجه به اینکه زعفران اثرات سایتوتوکسیک (سمیت سلولی) بر سلول‌های سرطانی داشته، به همین علت به نظر می‌رسد این گیاه دارویی نسبت به داروهای ضد سرطان مصنوعی مزیت‌هایی دارد و می‌تواند به عنوان دارویی ضد تومور مطرح گردد. محققین در موارد متعددی اثرات ضد توموری را گزارش کرده‌اند. در پژوهشی تجویز عصاره‌ی زعفران از راه خوراکی و موضعی در موجود زنده میزان پیدایش سرطان مصنوعی را کاهش داده، سرعت رشد تومور را مهار کرده و عمر حیوان آزمایشگاهی را طولانی‌تر نموده است (۱۴). در مطالعه‌ی حاضر میزان اثرات ضد توموری عصاره‌ی آبی واتانولی زعفران که هر کدام دارای ترکیب خاص ضد تومور هستند، مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن با داروی رایج در درمان سرطان پستان به نام پاکلی تاکسول مقایسه شد. همچنین در این مطالعه اثرات سینرژیک (هم افزایی) عصاره‌های زعفران را بر این دارو مورد سنجش قرار دادیم. نتایج حاصل نشان داد عصاره‌ی آبی واتانولی زعفران در مقایسه با داروی تاکسول دارای اثرات ضد توموری کمتر

می‌باشند، ولی چون مقادیر عصاره در حد میکروگرم به کار رفته بود، نتایج قابل ملاحظه می‌باشد. نتایج حاصل نشان داد عصاره‌ی اتانولی زعفران به واسطه‌ی وجود ترکیب الیدی معطر به نام سافرانال قادر به مهار سلول‌های سرطانی بود. این اثرات وابسته به غلظت و زمان بوده با افزایش غلظت سمیت سلولی نیز افزایش نشان داد. در ارتباط با این نتایج محققین دیگر با بررسی عصاره‌ی اتانولی زعفران بر رده‌های سلولی (Hela, HepG2, L929) وجود ترکیبات ضد توموری موجود در عصاره‌ی اتانولی را گزارش کرده‌اند (۱۲). هماهنگ با این نتایج در پژوهشی دیگر مقایسه‌ای بین اثرات ضد توموری ترکیبات کروسین و پیکروکروسین و سافرانال بر رده (Hela Cells) صورت گرفت و نتایج نشان از اثرات ضد توموری هر سه ترکیب داشت (۱۵). عصاره‌ی آبی زعفران نیز به واسطه‌ی داشتن کاروتنوئیدهایی چون کروسین و کروستین با خواص ضد توموری اثبات شده قادر به مهار سلول‌های سرطانی بود. هماهنگ با نتایج ما محققین دیگر نیز اثرات ضد توموری (عصاره‌ی آبی زعفران) کروسین و کروستین را بر سلول‌های کارسینومای کبد انسان (HepG2) گزارش کرده‌اند

و نتایج آن غلظت مهارکننده (IC_{50}) برای سلول‌های سرطانی را ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داد و اینکه عصاره هیچ‌گونه اثر مهاری بر رشد سلول‌های طبیعی نداشته است (۱۶). در بررسی مورفولوژیک عصاره‌های زعفران بر سلول‌های سرطانی تغییرات نشان از تاثیر این عصاره بر هسته‌ی سلول‌ها و ایجاد مراحل آپتوز سلولی داشت این تغییرات شامل حجیم شدن، حفره‌دار شدن سیتوپلاسم و همچنین هسته‌ی سلول‌ها بود که بیان‌گر آسیب به DNA و قطعه قطعه شدن آن می‌باشد. هماهنگ با این نتایج گروهی از محققین نشان دادند اثر عصاره‌ی زعفران بر سلول‌های (MCF-7) توسط رنگ‌آمیزی (PI) پروپیدوم یداید شامل فشردگی کروماتین، شکستگی هسته، سلول و غشا است (۱۷). در تایید این نتایج گروهی دیگر از محققین با آزمایش اثرات زعفران روی DNA در یک سیستم بدون سلول (Free Cell) که هسته‌ها ایزوله شده بودند، نشان دادند بازدارندگی زعفران بر سنتز اسیدنوکلئیک می‌تواند اساس بیوشیمیایی برای اثر بازدارندگی آن روی تکثیر سلول‌های توموری باشد (۱۹) و (۱۸). در تیمار با داروی پاکلی تاکسول، از ترکیبات رایج شیمی درمانی در سرطان پستان در تیمار ۴۸ ساعت، اثرات قابل ملاحظه‌ای در مهار سلول‌های سرطانی مشاهده شد که بیان‌گر قدرت این ترکیب ارزشمند بود. چندین سال از کشف و استعمال پاکلی تاکسول به‌عنوان یک داروی موثر برای از بین بردن بسیاری از بدخیمی‌ها می‌گذرد و تاکنون تحقیقات متعددی در مورد اثرات سایتوتوکسیک این دارو صورت گرفته است که همگی سمیت پاکلی تاکسول بر سلول‌های سرطانی را تایید می‌کنند. گروهی از محققین با تاثیر پاکلی تاکسول بر رده‌ی سلولی MCF-7 (سرطان پستان انسان) نشان دادند این دارو با دخالت در چرخه‌ی سلولی و مهار دپلمریزه شدن میکروتوبول‌ها سبب توقف چرخه‌ی سلولی و رشد سلول‌های توموری می‌شود (۲۰). تاکنون تحقیقات زیادی بر روی این دارو و چگونگی افزایش سمیت آن صورت گرفته است. از

جمله مصرف همزمان این دارو با چند داروی دیگر در مراحل شیمی درمانی ولی در این تحقیق این دارو را به همراه عصاره‌ی زعفران مورد سنجش قرار دادیم که تاکنون گزارشی مبنی بر اثرات این هم‌افزایی بدین صورت گزارش نشده است. در تیمار پاکلی تاکسول به تنهایی در ۴۸ ساعت بیشترین اثر مهاری دارو دیده شد و در تیمار ۴۸ ساعته پاکلی تاکسول و عصاره‌ی اتانولی IC_{50} دارو از ۰/۱ grμ/ml به ۰/۱۵ grμ/ml و در تیمار با عصاره‌ی آبی به ۰/۰۰۷ grμ/ml کاهش نشان داد. این نتایج نشان از افزایش توان ضد توموری دارو داشت که در تیمار با عصاره‌ی آبی زعفران و پاکلی تاکسول موثرتر دیده شد که نشان از وجود مکانیسم‌هایی مشترک بین عملکرد عصاره‌ی آبی حاوی کاروتنوئیدهایی چون کروستین و کروسیتین با داروی پاکلی تاکسول است. هماهنگ با نتایج ما گروهی از محققین نشان دادند کروسیتین موجود در عصاره‌ی آبی زعفران بر پلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها در چرخه‌ی سلولی اثر کرده و مانع رشد سلول‌های سرطانی می‌شوند (۲۲ و ۲۱). همزمان کردن این مکانیسم‌ها در دارو و عصاره‌ی آبی توانست بر قدرت پاکلی تاکسول بیافزاید بدون اینکه اثرات جانبی آن را افزایش دهد چرا که در پژوهشی که توسط گروهی از محققان انجام شده، نشان دادند تجویز زعفران با دزهای موثر در حد میکروگرم بر سلول‌های بدخیم سرطانی اثر سایتوتوکسیک انتخابی داشته و قابلیت زیست سلول‌های سالم را تحت تاثیر قرار نداده است (۲۳). پیرو این نتایج گروهی از محققین نشان دادند عصاره‌ی زعفران از آسیب DNA سلول‌های مغز استخوان موش آزمایشگاهی به علت مصرف داروهای ضد تومور سیس پلاتین، میتوماکسین پیشگیری نموده است و مانع بروز اثرات جانبی از جمله سرطان‌های ثانویه به‌واسطه عملکرد ژنوتوکسیک (آسیب به DNA) برخی داروهای شیمی درمانی می‌شود (۲۵ و ۲۴).

نتیجه گیری

عصاره‌ی زعفران با غلظتی خاص و در حد میکروگرم می‌تواند کاندید خوبی برای ساخت داروهای ضد تومور باشد و یا اینکه می‌توان از آن در مطالعات سینرژیک (هم افزایی) به همراه داروهای شیمی درمانی استفاده کرد و حداقل عوارض جانبی را به همراه داشت. بنابراین با توجه به این نکته که کشورمان ایران مهم‌ترین تولید کننده‌ی این گیاه ارزشمند است، جا دارد ترکیبات موثره این گیاه دارویی استخراج گردد و به طور خاص با انواع داروهای رایج در شیمی درمانی

همراه شود و نتایج حاصل از آن‌ها مورد سنجش قرار گیرد تا بتوان به ترکیبات دارویی جدید با قدرت ضد توموری بیشتر و عوارض جانبی کمتر و همچنین هزینه‌های درمانی پایین‌تر دست یافت.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کلیه‌ی عزیزان به خصوص جناب آقای دکتر فتح‌اله محقق، دانشگاه علوم پزشکی اراک که در این پژوهش صمیمانه ما را یاری نمودند، سپاس‌گزاری می‌گردد.

References

- 1- Abdullaev Fl. Cancer chemoperventive and tumoricidal properties of saffron. *Biol Med*. 2002; 227: 20-25.
- 2- Eisenberg D, Kessler R. Saffron redgold of brackish. Tehran Agricultural Information Bank. 1995.
- 3- Akhondzadeh S, Tahmacebi-Pour N, Noorbala A, et al. *Crocus sativus* L. In the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized and placebo controlled trial. *Phytother Res*. 2005; 19(2): 148-51.
- 4- Sabzevari M. Unconventional medicine in United States prevalence, cost and pattern of use. *N Engl J med* 1993; 328: 52-246.
- 5- Ampasavate C, Okonogi S, Anuchapreeda S. Cytotoxicity of extracts from fruit plants against leukemic cell lines. *African J Pharmacy Pharmacol*. 2011; 4(1): 13-21.
- 6- Okouneva T, Hillb T, The effects of vinflunine and vinblastin on centromere dynamis. *Cancer*. 2003; 2(5): 427-36.
- 7- Gutheil W, Reed G, Ray A, Dhar A. Crocetin: an agent derived from saffron for prevention and therapy for cancer. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012; 13(1): 173-9.
- 8- Verdianrizi M, Hageakhondi A, Hamedani M, et al. Sepration of taxuspinanane G from (*Taxus baccata* L.). *Plantpharmacology*. 2010; 4: 120-4.
- 9- Stephanie V, Paul Ch, John P, Noah G, Carolyn D. Erlotinib added to carboplatin and paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer: A phase II study based on surgical reassessment. *Gynecologic Oncology*. 2010; 119: 451-6.
- 10- Chryssanthi D, Lamari F, Iatrou G, Pylara A, Karamanos N, Cordopatis P. Inhibition of breast cancer cell proliferation by style constituents of different crocus species. *Anticancer Res*. 2007; 27: 357-62.

- 11- Samarghandian S, Boskabadi MH, Davoodi S. Use of in vitro assays to assess the potential antiproliferative and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.) in human lung cancer cell line. *Pharmacognosy Magazine*. 2010; 6(24): 309-14.
- 12- Tavakkol-Afshari J, Brook A, Mousavi SH. Study of cytotoxic and apoptogenic properties of saffron extract in human cancer cell lines. *Food Chem. Toxicol*. 2008; 46: 3443-7.
- 13- Mark A, Marcus A, Jairo O, et al. Phase II trial of paclitaxel, ifosfamide, and carboplatin in extensivestagesmall cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2003; 40: 91-7.
- 14- Chakrabarty R, Das I. Saffron can prevent chemically induced skin carcinogenesis in swiss albino mice. *Asian Pac J*. 2004; 5(1): 70-6.
- 15- Escribano J, Alonso G, Coca-Prados M, Fernandes J. Crocin safranal and picrocrocin from saffron inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Letters Jurnal*. 1996; 100(1): 23-30.
- 16- Tavakol-Afshari J, Rakhshandeh H, Brook A, Shahrokh abadi Kh. Study of cytutocity Saffron extract on carcinoma cell lines(HepG2). *Azad Islamic University Jurnal*. 2010; 19(3): 154-9.
- 17- Mousavi S, Tavakol-Afshari J, Brook A, Jafari I. Role of caspases and Bax protein in Saffron-induced apoptosis in MCF-7 cells. *Food & Chemical Toxicology*. 2009; 47: 1909-13.
- 18- Abdullaev F, Macvicar C, Frenkel G. Inhibition by selenium of DNA and RNA synthesis in normal and malignant cells in vitro. *Cancer Lett*. 1994; 139: 43-49.
- 19- Mousavi S, Moallem SA, Mehri S, Shahsavand S. Improvement of cytotoxic and apoptogenic properties of crocin in cancer cell lines by its nanoliposomal form. *Cancer*. 2011; 49(10): 1039-45.
- 20- Chang F, Li L, Wu C, Liu T, Peng F. Paclitaxel induced apoptosis in human gastric carcinoma cell lines. *Cancer*. 1996; 77(1): 8-14.
- 21- Ashrafi M, Taghikhani M, Moosavi-Movahedi A. The effect of carotenoids obtained from saffron on histone H1 structure and H1-DNA interaction. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2005; 36(4): 246-52.
- 22- Ganeyan Z, Hosseinzadeh H. Effectes of saffronon polymerytion microtubule inbreast cancer cell line. *Iran danesh*. 2010; 4(1): 31-9.
- 23- Abdullaev FI. Cancer chemopreventive andtumoricidal properties of saffron (*crocus sativus*L.). *Exp Biol Med*. 2005; 227: 20-5.
- 24- Premkumar K, Thirunavukkarasu C, AbrahamSK, Santhiya ST, Ramesh A. Protective effect of saffron (*Crocus sativus* L.) aqueous extract against genetic damage induced by anti-tumor agents in mice. *Hum Exp Toxicol*. 2006; 25: 79-84.
- 25- Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR. Effect of safranal, a constituent of *crocus sativus* (saffron), on methyl methanesulfonate (MMS)-induced DNA damage in mouse organs: An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay. *DNA and Cell Biol*. 2007; 26 (12): 841-6.

Comparison of the Cytotoxicity of Aqueous and Ethanolic Extracts of Saffron (*Crocus sativus* L) with Paclitaxel as a Chemotherapy Drug in Breast Cancer Cell Line (4T1)

Shariatzadeh SMA¹, Hamta A¹, Soleimani M¹, Darvishi S¹

¹Dept. of Biology, Faculty of Sciences, University of Arak, Arak, Iran

Corresponding Author: Darvishi S, Dept. of Biology, Faculty of Sciences, University of Arak, Arak, Iran

E-mail: darvishi61@yahoo.com

Received: 6 Aug 2013 **Accepted:** 1 Jun 2014

Background and Objective: Breast cancer is the most common cancer among women worldwide. Saffron is one of the most well-known plants as an antioxidant and anticancer. The aim of this study was to assess the impact of saffron on the viability of breast cancer cells and simultaneous interaction effect of Paclitaxel drug.

Materials and Methods: In this study, saffron extract (*Crocus sativus* L.) was prepared by Soxhlet method. Breast cancer cells (4T1) were prepared from the Pasteur cell bank then passaged several times until the required number of cells obtained. Cytotoxicity of Paclitaxel and the extracts of saffron were assessed separately and simultaneously using colorimetric MTT assay and trypan Blue test with certain concentrations of drug and extracts in the treatment period of 48 and 72 h. Then, the rate of apoptogenic changes in each compound was evaluated by Hoechst and PI methods.

Results: Data from 48 and 72 h treatment of extract of *Crocus sativus* showed antitumor effects on breast cancer cells. These effects were dose and time dependent. The synergistic effects in 48 hour treatment indicated a significant increase in cytotoxicity of saffron/Paclitaxel ($P < 0.05$).

Conclusion: The results showed that ethanol and aqueous extract of saffron and Paclitaxel have significant anticancer properties against breast cancer cells. It was also found that the aqueous and ethanol extracts of saffron can considerably increase cytotoxicity in cancer cells induced by Paclitaxel while the aqueous extract of saffron showed better results.

Keywords: Breast cancer, Paclitaxel, Saffron