

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

مهدی علی جانبان زاده^{۱*}، حسین زارعی جلیانی^۲

۱. دانشجوی دکترای بیوفیزیک، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا

۲. مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک (IBB)، دانشگاه تهران، تهران

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

مسئول مکاتبات: مهدی علی جانبان زاده، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا،
پست الکترونیکی: Alijanianzadeh_m@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۲/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۱/۱۱

چکیده

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

واژه‌های کلیدی: کروسین، توبولین، میکروتوبول، طیف فلورسانت ذاتی

مقدمه

مورد اثرات مفید عصاره‌های زعفران بر روی سلامت بدن وجود دارد که از آن جمله می‌توان به اثرات آنتی‌اکسیدان، اثرات ضد توموری و پیش‌گیری‌کننده از سرطان اشاره کرد. در این میان مدارکی وجود دارند که نشان می‌دهند کروسین، کروستین و مشتقات آن‌ها، رشد برخی سلول‌های سرطانی و بدخیم را در محیط کشت مهار می‌کنند (۱،۲). در این خصوص، رشد سلول‌های سرطانی K562 و

زعفران (*Crocus sativus L.*)، یکی از ادویه‌های با ارزشی است که در طب سنتی در درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفته است. از مهم‌ترین ترکیبات موجود در زعفران می‌توان کاروتنوئیدهای آن یعنی کروسین، کروستین و دی‌متیل کروستین را نام برد. کروسین، استر دی‌جنتیوبیوزید کروسین است. گزارش‌های زیادی در

نیز نشان داده شده است که عصاره‌های اتانلی زعفران و مخصوصاً کروسین موجود در آن، از تشکیل پاپیلوما در مدل موشی کارسینوژنز پوست جلوگیری می‌کنند. شواهد کافی وجود دارد که این اثرات به تنهایی توسط گروه جنتیوبیوزید موجود در ساختار کروسین القا نمی‌شود (۱۲). در این تحقیق، اثرات کروسین روی سیستم پلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها به‌عنوان کاندیدی برای هدف مولکولی اجزای زعفران بررسی شده است. همچنین به موازات این بررسی‌ها، اثر کروسین روی رشد سلول‌های HeLa نیز مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

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

روش جداسازی توبولین از مغز گوسفند

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

اندازه‌گیری غلظت پروتئین به روش برادفورد

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

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

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

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

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

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

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

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

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

طول موج ۵۹۰ نانومتر می‌خوانیم. منحنی استاندارد را با مقادیر ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ میکروگرم از BSA به‌عنوان پروتئین استاندارد رسم می‌کنیم و با استفاده از معادله خطی که رسم خواهد شد، غلظت نمونه مجهول را به دست می‌آوریم. مقادیری که در رسم منحنی استاندارد استفاده شده‌اند بر طبق جدول ۱ است.

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

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

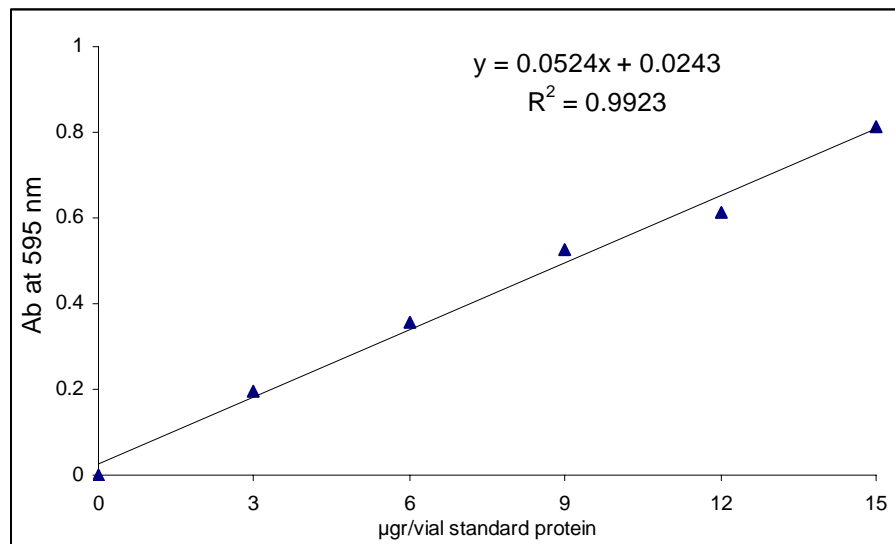
برای تهیه محلول رنگ، ۱۰۰ میلی‌گرم از کوماسی بلو G250 را در مخلوطی از ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد و ۵۰ میلی‌لیتر اتانل ۹۵ درصد حل می‌کنیم. پس از حل شدن کامل رنگ، حجم را با آب مقطر به یک لیتر می‌رسانیم.

روش اندازه‌گیری

۲۰ میکرولیتر از نمونه پروتئینی را با ۵۰ میکرولیتر سود یک نرمال مخلوط کرده و به مجموع آن‌ها یک میلی‌لیتر محلول رنگ، اضافه و مدت ۵ دقیقه آنکوبه می‌کنیم. جذب را نسبت به شاهد در

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

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



توبولینی، ژل جدا کننده ۱۰ درصد مورد استفاده قرار گرفت. زمان آزمایش بین ۲ تا ۳ ساعت طول کشید تا نمونه‌ها در ژل از هم جدا شوند. رنگ‌آمیزی ژل نیز به روش کوماسی بلو انجام شد.

ژل الکتروفورز نمونه‌ها

جهت تعیین میزان خلوص و شناسایی پروتئین‌های توبولینی، از روش الکتروفورز (SDS-PAGE) استفاده شد. برای جداسازی پروتئین‌های

اندازه‌گیری فعالیت میکروتوبول‌ها به روش کدورت‌سنجی

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

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

بررسی فلورسانت ذاتی پروتئین در حضور کروسین

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

تأثیر بر رشد سلول‌های سرطانی (سلول HeLa)

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

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

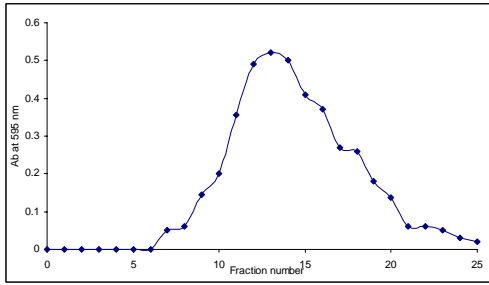
بافر نمونه از Tris با غلظت ۰/۰۶۲۵ مولار و pH=6.8 بوده و حاوی ۲ درصد SDS، ۵ درصد ۲-مرکاپتو اتانل، ۱۰ درصد گلیسرول و ۰/۰۰۲ درصد برموفنل‌بلو است. این بافر، آبی‌رنگ است. بافر تانک نیز حاوی تریس با غلظت ۲۵ میلی‌مولار و گلیسین با غلظت ۰/۱۹۲ مولار و SDS به میزان ۰/۱ درصد بوده و pH آن ۸/۳ می‌باشد.

کروماتوگرافی تعویض یونی با ستون فسفو سلولز

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

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

پلیمریزاسیون و دپلیمریزاسیون، ۱/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برآورد شد.



تصویر ۲- منحنی کروماتوگرام فسفوسولوز برای تخلیص توبولین.

نتیجه ژل الکتروفورز نمونه‌های تخلیص شده در مراحل مختلف

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

- ۱- هموزنات اولیه.
 - ۲- پس از سانتریفیوژ اول و قبل از شروع سیکل اول پلیمریزاسیون.
 - ۳- پس از سیکل اول پلیمریزاسیون/دپلیمریزاسیون.
 - ۴- سیکل دوم پلیمریزاسیون/دپلیمریزاسیون قبل از سانتریفیوژ.
 - ۵- سیکل دوم پلیمریزاسیون/دپلیمریزاسیون بعد از سانتریفیوژ.
 - ۶- بعد از ستون فسفو سلولوز.
- چاهک m نیز مارکر پروتئینی را نشان می‌دهد که سه وزن مختلف در آن نمایان است. بالاترین آن‌ها ۷۴ کیلودالتون، وسط ۵۵ کیلودالتون و در پایین ۲۷ کیلودالتون دیده می‌شود. همان گونه که مشاهده می‌شود پروتئین‌های توبولینی در مقابل مارکر وسط، یعنی ۵۵ کیلودالتون ایستاده‌اند و در گذر از مراحل مختلف، به ترتیب خالص‌تر شده‌اند.

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

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

نتایج

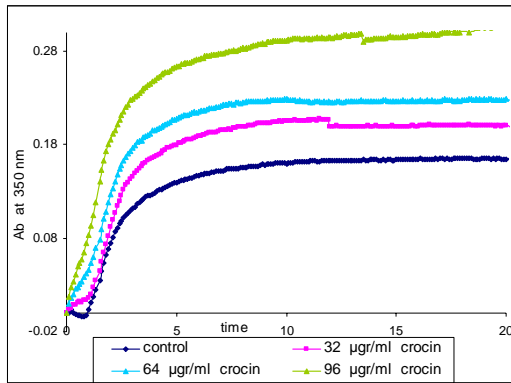
کروماتوگرام ستون فسفو سلولوز P-11

همان گونه که در تصویر ۲ مشاهده می‌شود نمونه‌های خارج شده از ستون کروماتوگرافی، هرکدام جداگانه در دستگاه طیف‌سنج UV/VIS بررسی شده‌اند تا نمونه‌های حاوی پروتئین از بقیه جدا شوند. برای این کار مطابق روش برادفورد در بخش روش‌ها، ۲۰ میکرولیتر از هر فرکشن را به ۵۰ میکرولیتر سود یک نرمال، مخلوط و در معرف برادفورد انکوبه می‌کنیم و سپس OD آن را اندازه‌گیری می‌نمائیم. از نمونه‌های شماره ۱۳ و ۱۴ که در پیک بالای منحنی هستند و بیشترین میزان پروتئین را دارند، برای انجام ژل الکتروفورز، نمونه‌برداری شد که نتیجه آن در تصویر ژل (تصویر ۳) دیده می‌شود.

تعیین غلظت پروتئین‌های استخراج شده با

روش برادفورد

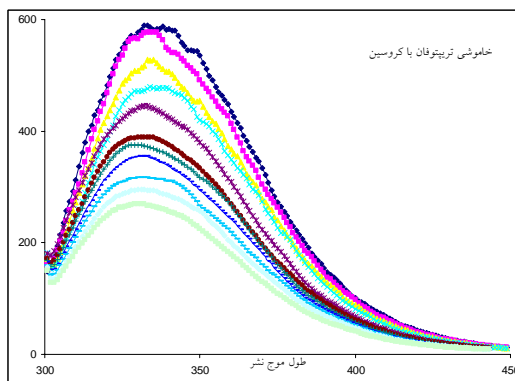
بر اساس منحنی رسم شده و محاسبه غلظت، غلظت پروتئین استخراج شده پس از مرحله دوم



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

نمودار اشباعی فلورسانت ذاتی توبولین در حضور کروسین

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



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

اثر رنگیزه بر رشد سلول های HeLa

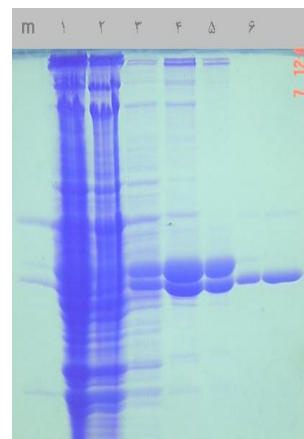
در نمودار تصویر ۷، اثر کروسین بر رشد سلول-های HeLa ترسیم شده است. محور افقی، مدت زمان پس از اعمال غلظت های کروسین بر روی محیط کشت سلولها و محور عمودی، نشان دهنده درصد زنده بودن سلولهاست. همان گونه که از تصویر می توان فهمید کروسین در بالاترین غلظتی

نتیجه فعالیت پلیمریزاسیون در حضور و عدم حضور کروسین

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

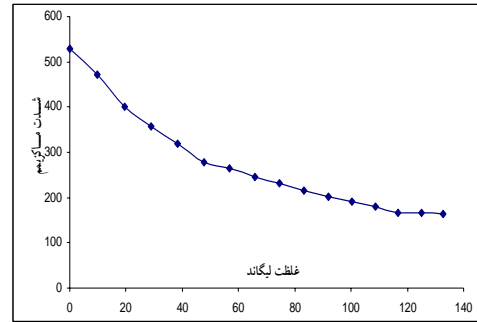
بررسی فلورسانت ذاتی پروتئین در حضور کروسین

میزان فلورسانت ذاتی پروتئین در عدم حضور و همچنین حضور لیگاند، با غلظت های افزایشده بررسی گردید. تصویر ۵ نتیجه این بررسی را نشان می دهد. برای این منظور، غلظت ۱/۸ میکرومولار پروتئین خالص شده را در حضور غلظت های مختلف لیگاند بررسی کردیم. تهییج تریپتوفانها در طول موج ۲۹۰ نانومتر و نشر آنها از ۳۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر بررسی گردید. همان طور که مشاهده می شود با اضافه کردن لیگاند کروسین به پروتئین های توبولین، از مقدار تریپتوفان های در دسترس کاسته شده است.

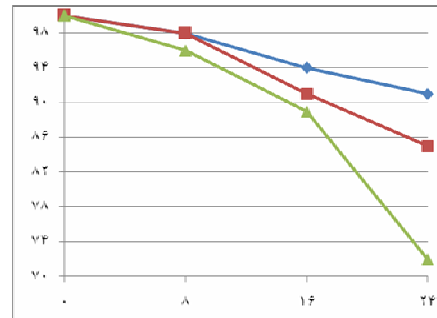


تصویر ۳- ژل الکتروفورز پروتئین توبولین در مراحل مختلف خالص سازی.

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



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



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

بحث

بسیاری از داروهای ضدسرطان که امروزه استفاده می‌شوند با تاثیر بر روند پلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها اعمال اثر می‌کنند. اختلال در جدا شدن کروموزوم‌ها در مرحله تقسیم سلولی، اساسی‌ترین عملکرد این داروها به شمار می‌رود. بر اساس نمودارهای کدورت‌سنجی که در نتایج نشان داده شدند (تصویر ۴)، افزایش میزان پلیمریزاسیون و همچنین کاهش زمان هسته‌گزینی میکروتوبول‌ها (به شکلی وابسته

به دوز) در نتیجه افزودن مقادیری از کروسین به وضوح دیده می‌شود. همان‌گونه که در تصویر ۵ در بخش نتایج دیده می‌شود، فلورسانس ذاتی توپولین خالص‌شده در حضور لیگاند کروسین کاهش می‌یابد و این امر، با کاهش طول موج ماکزیمم نشر تریپتوفان به میزان حدود ۷ نانومتر (شیفت به سمت آبی) همراه است. هر چه محیط تریپتوفان، غیرقطبی‌تر باشد، نشر آن در طول موج‌های پایین‌تری صورت می‌گیرد و این امر در مورد کروسین صدق می‌کند. تاخوردگی توپولین در اثر افزودن کروسین بیشتر، و پروتئین، جمع‌تر می‌شود. در این خصوص می‌توان نتیجه گرفت که میان‌کنش این لیگاند یا با سطوحی بوده است که تریپتوفان‌های در دسترس محیط در آن جا قرار داشته‌اند و یا تغییرات کلی ساختار پروتئین بر اثر اتصال این لیگاند به نحوی بوده است که تریپتوفان‌ها پوشیده شده و یا به سمت داخل پروتئین رفته‌اند.

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

با تاکسول و یا به طور کلی، به جای آن مورد استفاده قرار داد.

تقدیر و تشکر

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

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

منابع مورد استفاده

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