

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

علی زارعی محمودآبادی<sup>۱</sup> PhD، فروغ شریف<sup>\*</sup> MSc، مسلم جعفری<sup>۲</sup> MSc

<sup>\*</sup>گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (ع)، تهران، ایران  
<sup>۱</sup>مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی و "مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی"، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (ع)، تهران، ایران  
<sup>۲</sup>گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (ع)، تهران، ایران

### چکیده

**اهداف:** تخریب اکسیداتیو DNA نقش مهمی در موتاژن، پیری و سرطان بازی می‌کند. هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر عصاره آبی زعفران بر میزان محافظت DNA در مقابل شکست ناشی از آلودگی به سولفورمستارد در ماکروفاژ و تأثیر احتمالی آن به عنوان عامل آنتی‌ژنوتوکسیک بود.

**مواد و روش‌ها:** تعداد مناسب ماکروفاژ از صفاق موش سوری جدا شد و پس از تأیید زنده بودن، به صورت در شیشه با  $\text{KMnO}_4$  و سولفورمستارد در حضور و عدم حضور عصاره آبی زعفران تیمار شد. میزان سمیت ناشی از سولفورمستارد با سنجش MDA و GSH برحسب نانومولار بر میلی‌گرم پروتئین و میزان شکست DNA را به روش کامیت و برحسب میزان حرکت DNA در میدان الکتروفورز و درصد DNA باقی‌مانده در هسته سلول ارزیابی شد.

**یافته‌ها:** میزان MDA در سلول‌های نرمال، سلول‌های تیمار شده با  $\text{KMnO}_4$ ، سولفورمستارد و سولفورمستارد+عصاره زعفران به ترتیب  $۹/۶ \pm ۰/۷۱$ ،  $۴/۸۱ \pm ۰/۳۹$ ،  $۲/۵ \pm ۰/۲۱$ ،  $۲/۴ \pm ۰/۳۲$  نانومولار بر میلی‌گرم پروتئین و میزان GSH  $۱/۹ \pm ۰/۸$ ،  $۹/۴ \pm ۰/۹۵$ ،  $۹/۳ \pm ۱/۲$  و  $۵/۱ \pm ۰/۵۵$  نانومولار بر میلی‌گرم پروتئین بود. در سلول‌های نرمال متوسط حرکت DNA،  $۲۳/۱ \pm ۱/۴۳$  میکرومتر و در سلول‌های تیمار شده با  $\text{KMnO}_4$ ، سولفورمستارد و سولفورمستارد+عصاره زعفران به ترتیب  $۲۸/۳۳ \pm ۴/۶$ ،  $۴۰/۴۵ \pm ۴/۴۲$  و  $۳۹/۷۵ \pm ۴/۹۲$  میکرومتر بود. میزان DNA باقی‌مانده در هسته در سلول‌های نرمال، کنترل مثبت، سولفورمستارد و سولفورمستارد+عصاره زعفران به ترتیب  $۹۹/۳ \pm ۳/۶$ ،  $۲۰/۷ \pm ۳/۸$ ،  $۲۲/۶۱ \pm ۴/۳$  و  $۶۵/۵ \pm ۴/۸$  و بیان‌گر تأثیر معنی‌دار عصاره زعفران در کاهش شکست DNA در سلول‌های آلوده به خردل بود.

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

**کلیدواژه‌ها:** عصاره آبی زعفران، تکنیک کامیت، سولفورمستارد، ماکروفاژ، شکست DNA

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

Zarei Mahmoudabadi A.<sup>1</sup> PhD, Sharif F.\* MSc, Jafari M.<sup>2</sup> MSc

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

Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### Abstract

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

**Materials & Methods:** Macrophage cells were obtained from mice peritoneum. The viability of cells was determined and then they were treated with  $\text{KMnO}_4$ , SM and SM + saffron extract in culture media. The SM toxicity in macrophage cells was determined using MDA and GSH concentrations (nM/mg protein) and the extent of genotoxicity was investigated using alkaline comet assay and reported as the movement of DNA in electrophoretic field and %DNA remaining in the nucleus.

**Results:** The concentration of MDA and GSH in normal cells and  $\text{KMnO}_4$ , SM and SM + saffron extract treated cells were respectively  $1.9 \pm 0.18$ ,  $9.4 \pm 0.95$ ,  $9.3 \pm 1.2$ ,  $5.1 \pm 0.55$  and  $9.6 \pm 0.71$ ,  $2.4 \pm 0.32$ ,  $2.5 \pm 0.21$ ,  $4.81 \pm 0.39$  nM/mg protein. The comet result showed that DNA movement in normal cell was  $23.1 \pm 1.43 \mu\text{m}$ , but in  $\text{KMnO}_4$ , SM and SM + saffron extract treated cells were respectively  $39.75 \pm 4.92$ ,  $40.45 \pm 4.42$  and  $28.33 \pm 4.6 \mu\text{m}$ . Similarly, the percent of DNA in nucleus in normal,  $\text{KMnO}_4$ , SM and SM+ saffron extract treated cells were respectively  $99.3 \pm 3.6$ %,  $20.7 \pm 3.8$ %,  $22.61 \pm 4.3$  and  $65.5 \pm 4.8$  that showed the significant protective effect of saffron extract on reduction of DNA damage in SM contaminated cells.

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

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

## مقدمه

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

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

ROS و در نتیجه، پیشگیری از بروز عوارض ناشی از آن در گونه‌های مختلف انجام شده است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر حفاظتی عصاره آبی زعفران (کروسین) بر ژنوتوکسیسیته ناشی از آلودگی با سولفورمستارد در سلول‌های ماکروفاژ موش سوری و مکانیزم اثر احتمالی آن بود.

## مواد و روش‌ها

موش سوری نژاد balb/c با متوسط وزن ۲۵-۳۰ گرم، از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی یکی از دانشگاه‌های شهر تهران خریداری شد. آگاروز، آگاروز با نقطه ذوب پایین (LAMPA)، اتیدیوم بروماید، RPMI ۱۶۴۰، EDTA، NAOH، تریپان بلو، GSH، PBS، اسیدباربیتوریک، ۱، ۱، ۳، ۳-تترا-اتوکسی پروپان، پیریدین، اتانول و DTNB از شرکت سیگمای ایالات متحده خریداری شد. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در درجه خلوص بالا از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

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

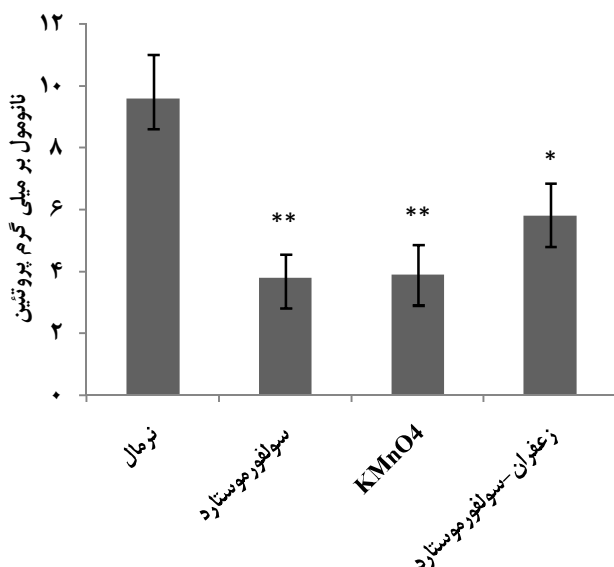
**جداسازی ماکروفاژها:** سلول‌های ماکروفاژ از صفاق موش سوری و از طریق شست‌وشوی صفاق موش توسط بافر PBS استریل جمع‌آوری شدند. سپس میزان بقای سلول‌های جمع‌آوری‌شده با استفاده از تریپان بلو مورد بررسی قرار گرفت که معادل ۹۵٪ بود [۲۰]. سلول‌ها با RPMI ۱۶۴۰ شست‌وشو داده شدند و سپس برای ادامه کار، تعداد  $1 \times 10^6$  سلول در محیط RPMI ۱۶۴۰ با حجم نهایی یک میلی‌لیتر تهیه و انکوبه شد.

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

تاثیر عصاره آبی زعفران (*Crocus sativus L.*) بر ژنوتوکسیسیتی ماکروفاژهای موش سوری ۸۱

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

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



**نمودار ۱)** میزان GSH در سلول‌های ماکروفاژ تیمار شده با سولفورموستارد، KMnO<sub>۴</sub> و عصاره زعفران (n=۶) ( $p < 0/05$ ) در مقایسه با سولفورموستارد،  $p < 0/001$  (\*\*\*) در مقایسه با سلول نرمال)

سولفورموستارد، غلظت‌های فوق افزوده شد و کلیه سلول‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. به سلول‌های کنترل و سلول‌هایی که فقط سولفورموستارد دریافت کرده بودند، به‌طور همزمان حجم مساوی PBS افزوده شد. به نمونه کنترل مثبت، ۲۰۰ میکرولیتر KMnO<sub>۴</sub> با غلظت ۰/۲۵ میلی‌مولار با شرایط مشابه با سایر گروه‌ها اضافه شد. پس از پایان انکوباسیون، مجدداً میزان بقای سلول‌ها تعیین شد و از آنها برای بررسی ژنوتوکسیسیتی استفاده شد. **سنجش گلو تاتیون (GSH):** به‌منظور بررسی تاثیر سولفورموستارد روی سلول ماکروفاژ قبل از سنجش فاکتورهای ژنوتوکسیسیتی، برخی فاکتورهای اکسیداتیو نظیر GSH و مالون‌دی‌آلدئید (MDA) نیز سنجیده شدند. برای این منظور، سلول‌های ماکروفاژ با کمک اسیدسولفوسالیسیلیک ۴٪ و روی یخ، هم‌وزن شده و سپس در ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. از مایع رویی آن برای سنجش GSH با کمک روش مورون [۲۳] استفاده شد. به‌طور مختصر، عصاره سلول با تری‌کلرواستیک‌اسید ۲۵٪ مخلوط و در ۲۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی حاصل با بافر فسفات (۰/۲ مولار و pH=۸) به حجم یک میلی‌لیتر رسانده شد و با ۲ میلی‌لیتر از DTNB ۰/۶ میلی‌مولار، مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد. سپس جذب آن در طول موج ۴۱۲ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (Thermo Spectronic؛ ایالات متحده) سنجیده شد و میزان GSH با کمک منحنی استاندارد، تعیین و برحسب نانومول بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد.

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

**سنجش میزان شکست DNA:** میزان شکست تک‌زنجیره و دوز زنجیره DNA با استفاده از روش کامت سنجیده شد [۲۵]. به‌طور

**نتایج**

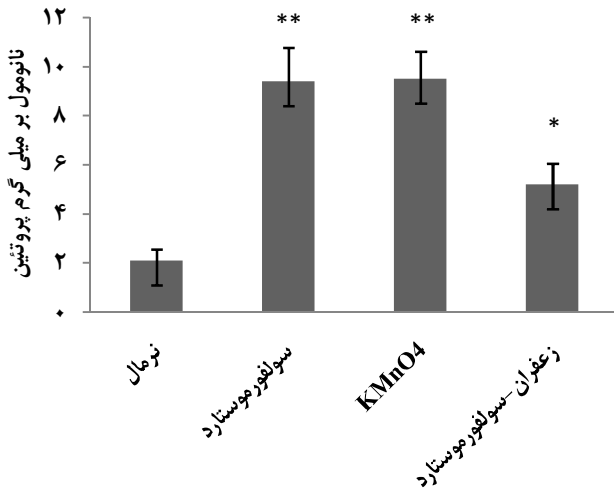
سولفورمستارد شد، هرچند اثرات ضعیف تری مشاهده شد (نمودار ۵). افزایش عصاره به صورت پس تیمار هیچ گونه تاثیر معنی داری ایجاد نکرد (نمودار ۶).

**بررسی القای سمیت با سولفورمستارد در سلول های**

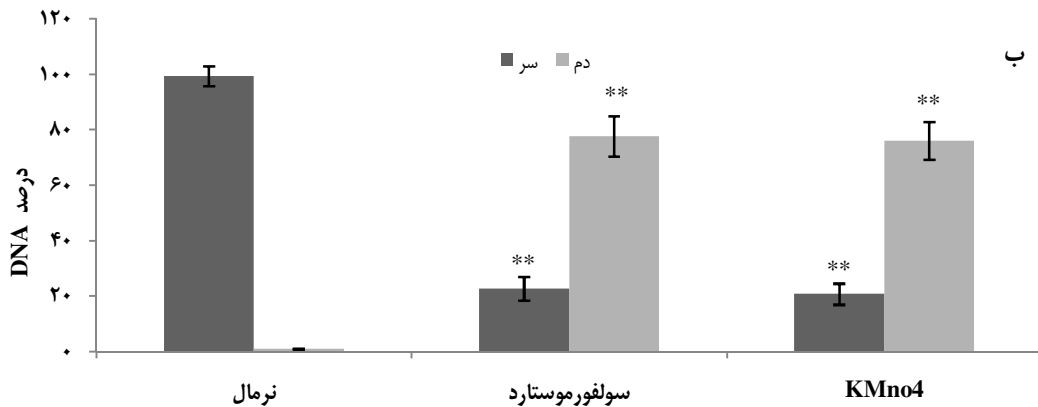
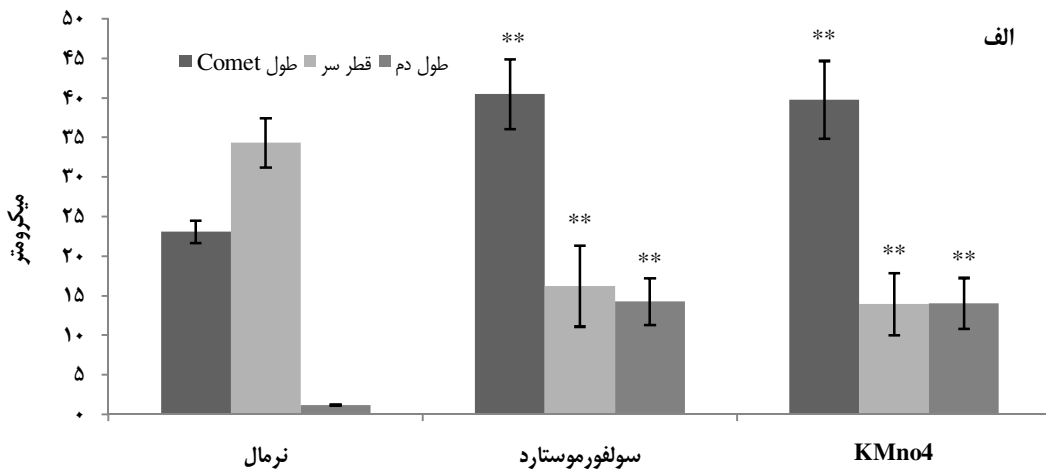
**ماکروفاژ:** در سلول های تیمار شده با سولفورمستارد و  $KMnO_4$ ، میزان GSH سلولی کاهش معنی داری را در مقایسه با نمونه نرمال نشان داد و تیمار سلول ها با عصاره زعفران موجب تقویت سیستم آنتی اکسیدانی و افزایش معنی دار در غلظت GSH شد (نمودار ۱). میزان MDA در سلول های آلوده به خردل در مقایسه با سلول های نرمال و سلول های تیمار شده با عصاره زعفران، افزایش معنی دار نشان داد (نمودار ۲).

**بررسی ژنوتوکسیسیتی در سلول های ماکروفاژ:**

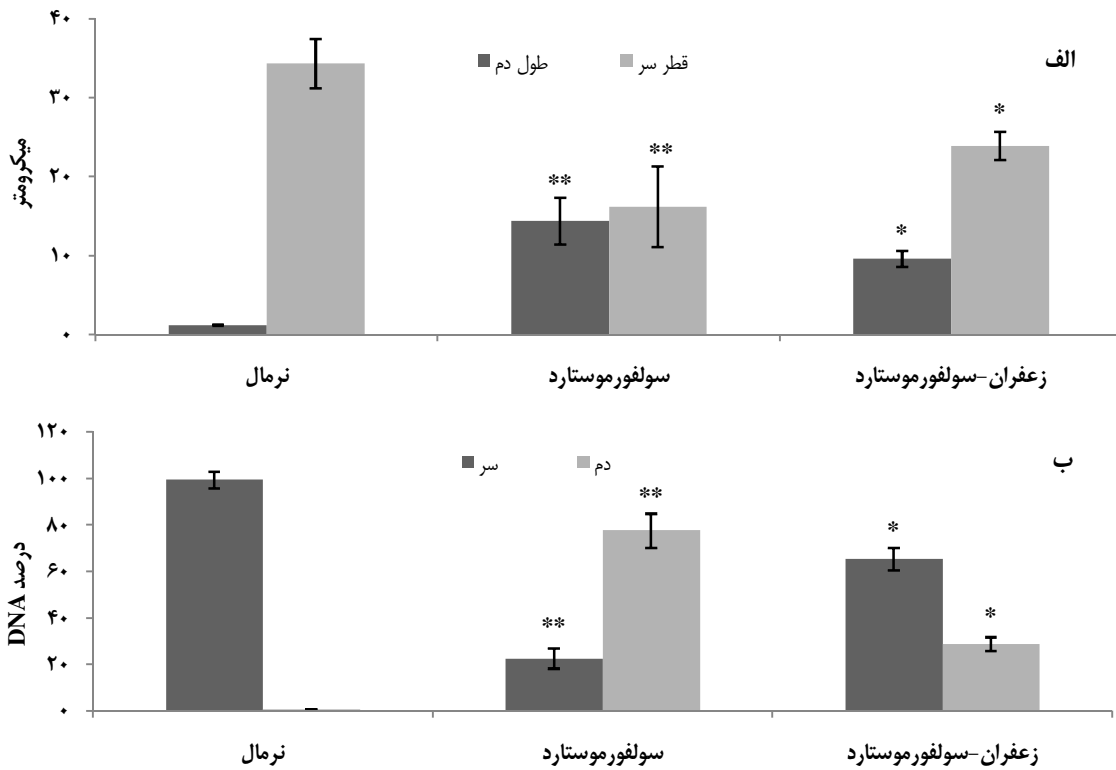
سولفورمستارد با غلظت ۱۸۰ میکرومولار به صورت در شیشه (Invitro) به طور معنی داری موجب شکست هر دو زنجیره DNA شد (شکل ۱).  $KMnO_4$  به عنوان یک عامل اکسیدان قوی و کنترل مثبت نیز موجب شکست دو زنجیره DNA شد که میزان شکست با سولفورمستارد قابل مقایسه بود (نمودار ۳). افزودن عصاره زعفران قبل از آلودگی با سولفورمستارد (پیش درمان)، شاخص های مورد سنجش شکست DNA را به طور معنی داری کاهش داد (نمودار ۴). افزایش همزمان عصاره با خردل نیز موجب کاهش تاثیرات مخرب



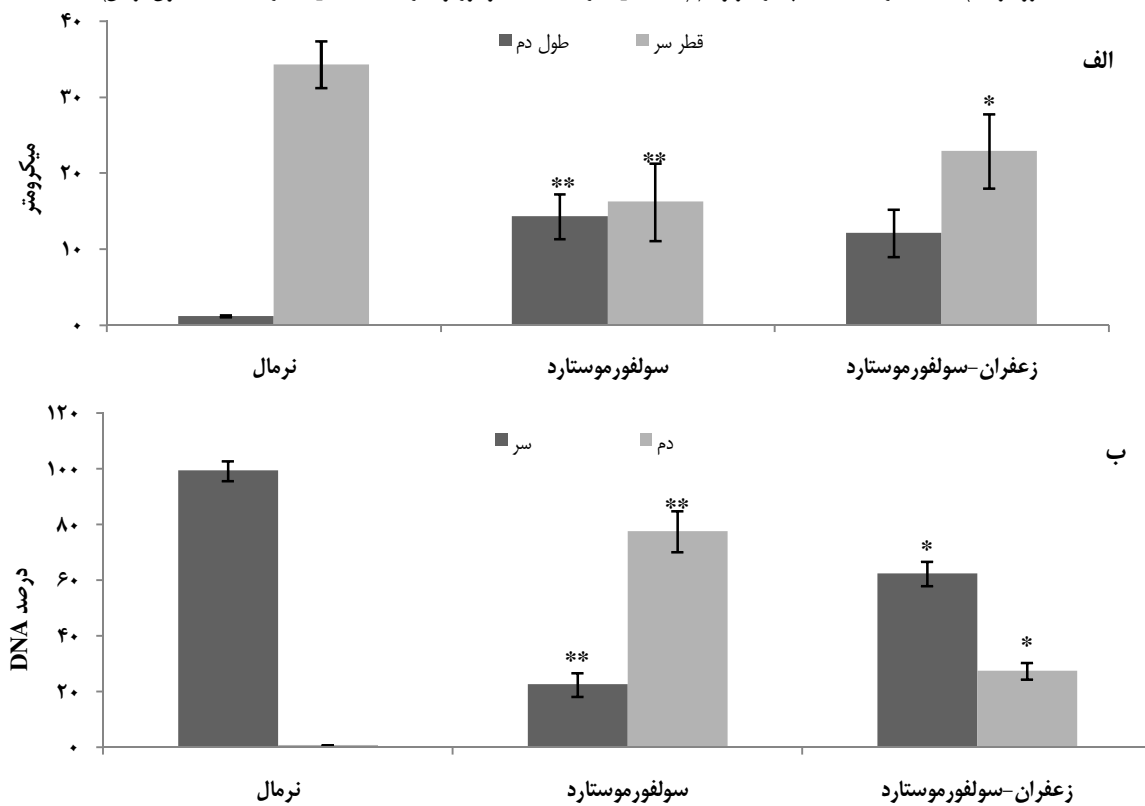
**نمودار ۲** میزان MDA در سلول های ماکروفاژ تیمار شده با سولفورمستارد،  $KMnO_4$  و عصاره زعفران (n=۶)  $p < 0.05$ \* در مقایسه با سولفورمستارد،  $p < 0.001$ \*\* در مقایسه با سلول نرمال)



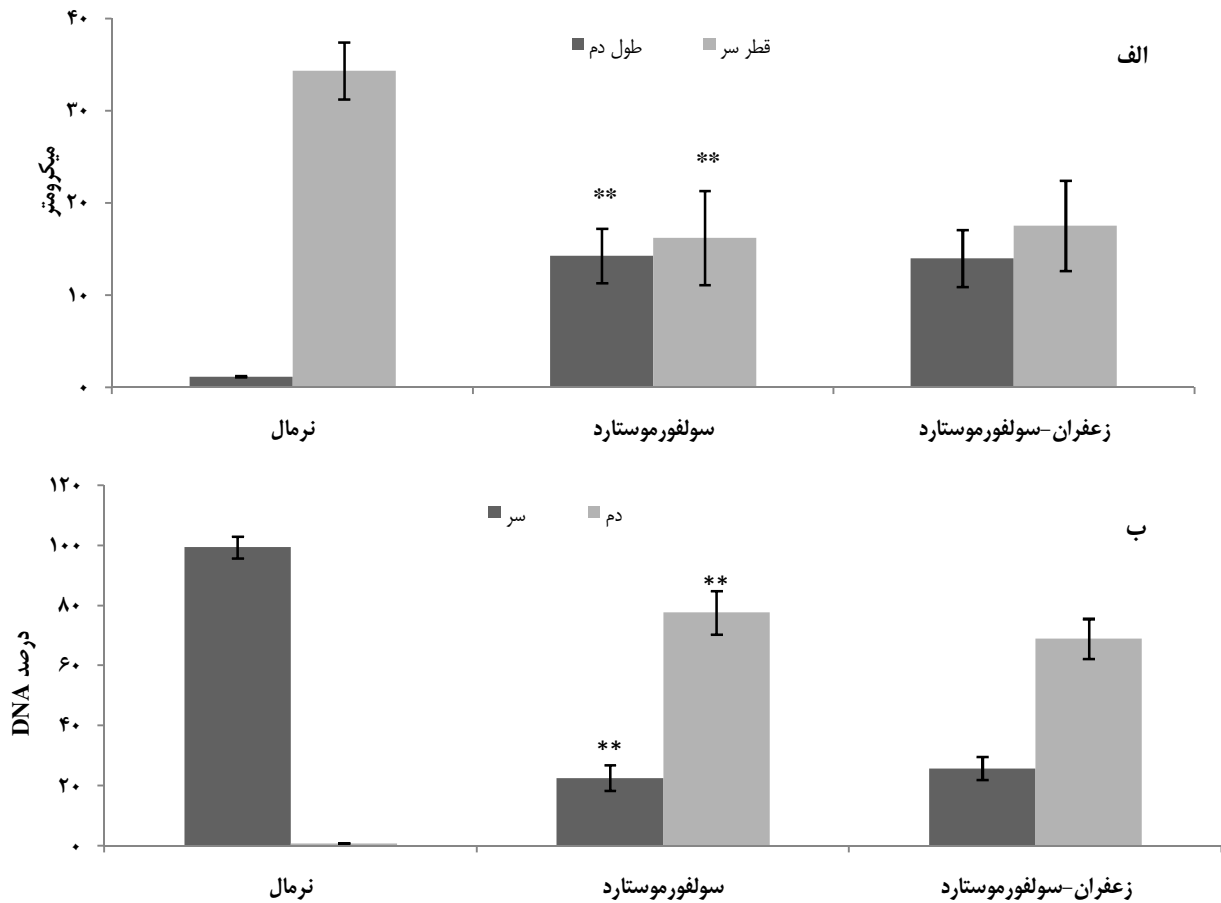
**نمودار ۳** مقایسه شاخص های ژنوتوکسیسیتی ناشی از آلودگی با سولفورمستارد (۱۸۰ میکرومولار) و  $KMnO_4$  (۰/۲۵ میلی مولار) در سلول ماکروفاژ با استفاده از روش Comet assay (n=۱۰۰) (الف) مقایسه قطر سر، طول Comet و طول دم برحسب میکرومتر، (ب) مقایسه درصد DNA در سر و درصد DNA در دم  $p < 0.05$ \* در مقایسه با سولفورمستارد،  $p < 0.001$ \*\* در مقایسه با سلول نرمال).



**نمودار ۴** مقایسه تاثیر عصاره آبی زعفران بر میزان ژنوتوکسیسیته ناشی از آلودگی با سولفورموستارد (۱۸۰ میکرومولار) در سلول ماکروفاژ با استفاده از روش Comet assay در شرایط افزایش عصاره به صورت پیش تیمار (۳۰ دقیقه) نسبت به سولفورموستارد (الف) (n=۱۰۰) مقایسه قطر سر و طول دم برحسب میکرومتر، ب) مقایسه درصد DNA پ در سر و دم ( $p < 0.05$  در مقایسه با سولفورموستارد،  $p < 0.001$  در مقایسه با سلول نرمال)



**نمودار ۵** مقایسه تاثیر عصاره آبی زعفران بر میزان ژنوتوکسیسیته ناشی از آلودگی با سولفورموستارد (۱۸۰ میکرومولار) در سلول ماکروفاژ با استفاده از روش Comet assay در شرایط افزایش عصاره به صورت همزمان با سولفورموستارد (n=۱۰۰) مقایسه قطر سر و طول دم برحسب میکرومتر، ب) مقایسه درصد DNA در سر و دم (الف) مقایسه قطر سر و طول دم برحسب میکرومتر، ب) مقایسه درصد DNA در سر و دم ( $p < 0.05$  در مقایسه با سولفورموستارد،  $p < 0.001$  در مقایسه با سلول نرمال)



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

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

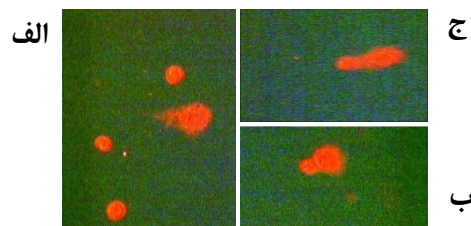
گروه ← شاخص ↓	نرمال	سولفورموستارد	زعفران (۲۵ میلی‌مولار)	زعفران (۵۰ میلی‌مولار)	زعفران (۱۰۰ میلی‌مولار)
طول Comet (میکرومتر)	۲۳/۱±۱/۴۳	۴۰/۴۵±۴/۴۲	۳۵/۵۵±۴/۱۲	۳۲/۲۵±۳/۳۷*	۳۲/۴±۴/۱۵*
قطر سر (میکرومتر)	۳۴/۳±۳/۱	۱۶/۲۲±۵/۱	۱۸/۸±۴/۷۸*	۲۱/۵۴±۳/۷۶**	۲۶/۲±۵/۷*
طول دم (میکرومتر)	۱/۲±۰/۰۹	۱۴/۲۸±۲/۹۴	۱۱/۵۴±۶/۲	۹/۳۳±۴/۶**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

(\*\*p<۰/۰۰۱, \*p<۰/۰۵)

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

### بحث

تحقیقات در زمینه اثر زعفران روی سلول‌های نئوپلاستیک در دهه



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

گذشته، بیانگر اثرات آنتی‌کارسینوژنیک و ضدتوموری زعفران و ترکیبات حاصل از آن به‌صورت در شیشه و در محیط زنده بوده است [۲۴، ۲۵، ۲۶]. طبق نتایج حاصل از مطالعات، تجویز خوراکی عصاره زعفران با روش وابسته به دوز موجب مهار رشد تومور آسیت موش، کارسینوم آسیت اریلیخ و همچنین آسیت دالتون لنفوما شده و طول زندگی موش‌های تیمار شده را ۲ تا ۳ برابر افزایش داده است. گزارشات دیگر حاکی است که دوز غیرسمی ماده موثره کروسین، اثرات ژنوتوکسیک و نئوپلاستیک بنزوپیرین را در رده سلولی C3H10T1/2 مهار می‌کند [۲۷]. بنابراین نتایج حاصل از مطالعات مختلف در محیط زنده، بیانگر تأثیر معنی‌دار عصاره زعفران و اجزای خالص شده آن بر افزایش طول مدت حیات حیوانات مبتلا به انواع تومورها است، هرچند به مکانیزم اثر آن اشاره‌ای نشده است. مطالعه حاضر با توجه به کاربرد گسترده سولفورمستارد به‌عنوان عامل آلکیل‌کننده و اکسیدان قوی در جنگ‌ها و بروز عوارض شدید و گاهی غیرقابل درمان در مصدومان انجام شد. ابتدا به‌منظور تایید تأثیر اکسیداتیو سولفورمستارد روی ماکروفاژ، میزان گلوپاتیون و MDA قبل و بعد از آلودگی با سولفورمستارد در هموژن سلول اندازه‌گیری شد. افزایش معنی‌دار در میزان MDA و کاهش در میزان گلوپاتیون بیانگر تأثیرات اکسیداتیو سولفورمستارد روی ماکروفاژ است و تیمار ماکروفاژ آلوده به سولفورمستارد موجب کاهش معنی‌دار در میزان MDA و افزایش در میزان گلوپاتیون می‌شود که بیانگر اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره زعفران است. سپس اثرات ژنوتوکسیسیتهی سولفورمستارد روی سلول ماکروفاژ با کمک تکنیک کامت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل بیانگر آن است که سولفورمستارد به‌شدت اسیدهای نوکلئیک سلول‌های ماکروفاژ را تحت تأثیر قرار داده و موجب شکست تک یا هر دو زنجیره DNA می‌شود. به‌علاوه، سولفورمستارد از طریق تشکیل اتصالات عرضی در زنجیره DNA موجب فشردگی در DNA می‌شود. هر دو مورد فوق در سلول‌های مورد مطالعه مشاهده شد، به‌طوری که در بیش از ۹۰٪ سلول‌های مورد مطالعه، در اثر آلودگی با سولفورمستارد، شکست DNA مشاهده شد که منجر به حرکت DNA در میدان الکتریکی و تشکیل کامت شد و کمتر از ۵٪ سلول‌ها به‌صورت فشرده و کوچک‌تر از سلول‌های نرمال بودند که ناشی از اتصالات عرضی است. تیمار سلول‌ها با عصاره زعفران (کروسین) موجب کاهش معنی‌دار در میزان شکست DNA و در نتیجه، کاهش طول کامت و افزایش درصد DNA در هسته (به‌عنوان یک شاخص معتبر از میزان شکست DNA) و تبدیل سلول‌ها به فرم طبیعی شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که افزایش عصاره زعفران قبل از آلودگی با سولفورمستارد موجب کاهش معنی‌دار در ژنوتوکسیسیتهی ناشی از سولفورمستارد می‌شود، ولی افزایش همزمان یا افزایش عصاره ۳۰ دقیقه بعد از آلودگی با سولفورمستارد، تأثیر چندانی در بهبود عوارض آن ندارد. چون سولفورمستارد از طریق کاهش سیستم آنتی‌اکسیدان و

تولید ROS و همچنین تبدیل به یون سولفونیوم [۲۸] موجب اتصال به DNA و شکست زنجیره‌های DNA می‌شود، لذا احتمالاً عصاره آبی زعفران (کروسین) به‌عنوان عامل آنتی‌اکسیدان عمل کرده و از تولید ROS یا از تشکیل یون سولفونیوم جلوگیری می‌کند. این نتایج نشان می‌دهد که عصاره زعفران دارای اثرات پیشگیرانه است، ولی تأثیر چندانی در حذف یا درمان اثرات ایجاد شده ندارد. در مطالعه دیگری که با استفاده از عصاره زعفران به‌همراه عصاره سیر صورت گرفته، نتایج مشابهی مشاهده شده است که بیانگر اثرات آنتی‌ژنوتوکسیسیتهی روی سلول‌های مغز استخوان موش است و نشان می‌دهد که عصاره سیر به‌عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدان موجب تقویت اثر زعفران می‌شود [۲۹، ۳۰]. با توجه به موارد مشاهده‌شده، زعفران به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مناسب می‌تواند به‌صورت مکمل غذایی برای جلوگیری از بروز عوارض ژنوتوکسیسیته ناشی از اثرات اکسیداتیو مربوط به کارسینوژن‌های محیطی، از جمله سولفورمستارد مورد استفاده قرار گیرد.

## نتیجه‌گیری

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

## منابع

- 1- Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(4):477-503.
- 2- Papiemeister B, Feister AJ, Robinson SI, Ford RD. Medical defense against mustard gas: Toxic mechanisms and pharmacological implications. Boca Raton: CRC Press; 1991.
- 3- Wormser U. Toxicology of mustard gas. *Trends Pharmacol Sci.* 1991;12(4):164-7.
- 4- Lakshmana Rao PV, Vijayaraghavan R, Bhaskar ASB. Sulfur mustard-induced DNA damage in mice after dermal and inhalation exposure. *Toxicology.* 1999;139(1-2):39-51.
- 5- Somani SM, Babu SR. Toxicodynamics of sulfur mustard. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.* 1989;27(9):419-35.
- 6- Vijayaraghavan R, Sugendran K, Pant SC, Husain K, Malhotra RC. Dermal intoxication of mice with bis (2-chloroethyl) sulfide and the protective effect of flavonoids. *Toxicology.* 1991;69(1):35-42.
- 7- Gross CL, Innace JK, Hovatter RC, Meier HL, Smith WJ. Biochemical manipulation of intracellular glutathione levels influences cytotoxicity to isolated human lymphocytes by sulfur mustard. *Cell Biol Toxicol.* 1993;9(3):259-68.
- 8- Lindsay CD, Hambrook JL, Lailey AF. Monoisopropylglutathione ester protects A549 cells from cytotoxic effects of sulfur mustard. *Hum Exp Toxicol.* 1997;16(11):636-44.
- 9- Meier HL, Johnson JB. The determination and prevention of cytotoxic effects induced in human lymphocytes by alkylating agent 2, 2'-dichloroethyl sulfide (sulfur mustard, HD). *Toxicol*

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