مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره ۴، زمستان۱۳۸۹، صفحات ۶۵– ۵۹

بررسی اثرات سایتوتوکسیک عصاره آبی- متانولی زعفران بر روی رده‌های سلولی Vero، HeLa و Hep2 با استفاده از روش MTT

ناهید رحیمی فرد[۱]، هما حاجی مهدی پور[۲*]، محمد حسین هدایتی[۳]، سید محسن اسماعیلی[۴]

۱) مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو و اداره کل آزمایشگاه‌های کنترل غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
۲) مرکز تحقیقات طب سنتی و مفردات پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۳) واحد کنترل کیفیت، انستیتو پاستور ایران
۴) گروه میکرب شناسی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
نویسنده رابط: هما حاجی مهدی پور، تهران، خیابان ولی‌عصر، روبروی توانیر، کوچه شمس، دانشکده طب سنتی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
تلفن: ۸۸۷۷۶۰۲۷ hmehdipoor@itmrc.org

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۲/۸ **تاریخ پذیرش :**۸۹/۱۲/۲

چکیده :

زمینه و اهداف: علاوه بر استفاده از ترکیبات شیمیایی در صنایع غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی، استفاده از ترکیبات گیاهی و طبیعی نیز افزایش یافته است. به‌نظر می‌رسد مواد و ترکیبات طبیعی در مقایسه با ترکیبات شیمیایی دارای عوارض جانبی، جهش‌زایی و سرطان‌زایی کمتری باشند، اما استفاده از آنها نیز می‌تواند با عوارض جانبی و سمیت همراه باشد. اثرات دارویی قابل توجهی برای زعفران اثبات شده‌است، که لزوم بررسی سمیت گیاه را آشکار می‌سازد. هدف این مطالعه تعیین اثرات سایتوتوکسیک زعفران روی رده‌های سلولی Vero، HeLa و Hep2 به‌روش MTT بود.

روش بررسی: ابتدا از کلاله زعفران توسط حلال متانول:آب ۸۰:۲۰ با روش ماسراسیون عصاره‌گیری شد. اثرات سایتوتوکسیک عصاره زعفران، روی رده سلولی طبیعیVero و رده‌های سرطانی HeLa و Hep2 به‌روش MTT assay در میکروپلیت 96 خانه، با مجاور سازی رقت‌های مختلف عصاره زعفران بررسی شد. قرائت OD) optical density) با دستگاه microplate reader انجام شد و IC_{50} (Inhibition Concentration 50%) عصاره روی هر رده سلولی محاسبه گردید.

یافته‌ها: عصاره آبی- متانولی زعفران بر روی رده‌های سلولی Vero،HeLa و Hep2 به‌ترتیب دارای IC_{50} معادل ۱۶۲ µg/ml، ۶۵۳ و ۲۰۸ بود.

نتیجه‌گیری: زعفران دارای اثرات سمی روی رده سلولی نرمال Vero می‌باشد. بنابراین، در استفاده غذایی و دارویی گیاه در غلظت‌های زیاد باید احتیاط نمود. همچنین عصاره این گیاه دارای اثرات سمی روی دو رده سلول سرطانی Hep2 و HeLa بوده ولی سمیت آن به‌خصوص روی رده سلولی HeLa کمتر از رده سلولی نرمال Vero بود.

واژه‌های کلیدی: سایتوتوکسیک، زعفران، Vero، HeLa، Hep2

مقدمه:

امروزه در کنار استفاده از ترکیبات شیمیایی در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی و بهداشتی، استفاده از ترکیبات گیاهی و طبیعی نیز افزایش یافته است. اگرچه به‌نظر می‌رسد ترکیبات طبیعی در مقایسه با ترکیبات شیمیایی دارای عوارض جانبی، جهش‌زایی (موتاژنیسیته) و سرطان زایی کمتری می‌باشند، اما استفاده از آنها نیز در صنایع مختلف می‌تواند با عوارض جانبی و سمیت همراه باشد. زعفران با نام علمی *Crocus sativus* L. از خانواده آلاله (Iridaceae) از جمله گیاهانی است که از دیرباز در نقاط مختلف دنیا به‌عنوان یک گیاه غذایی و دارویی مورد استفاده بوده است (۲،۱). در طب سنتی ایران، این گیاه به‌عنوان ضد اسپاسم، آرام‌بخش، کمک کننده هضم غذا، ضدنفخ، معرق، خلط آور، محرک میل جنسی و تسکین دهنده درد استفاده شده‌است (۳). در طب چینی برای درمان آمنوره(۴) و در طب آیورودا این گیاه برای درمان درد مصرف می‌شود (۵). زعفران در نقاط مختلف دنیا می‌روید. گل‌های آن بنفش رنگ است و دارای خامه بلند و کلاله سه قسمتی به‌رنگ نارنجی یا قرمز است که همین قسمت به‌عنوان زعفران ارزش تجاری دارد. زعفران دارای اسانس، کاروتنوئیدها، مواد چرب، املاح معدنی و موسیلاژ است (۳). امروزه تحقیقات فارماکولوژیک و بالینی متعددی بر روی زعفران انجام شده-است و اثرات قابل توجهی از این گیاه دیده شده است. در تحقیقی که در مورد اثرات ضد افسردگی این گیاه صورت گرفته است، اثر عصاره زعفران با ایمی‌پرامین به‌عنوان یک داروی ضدافسردگی رایج در درمان افسردگی‌های خفیف تا متوسط مقایسه شده‌است. نتیجه این تحقیق نشان داد که عصاره زعفران همان کارآئی ایمی‌پرامین را بدون بروز عوارض جانبی آن دارد (۶). در مطالعه نوربالا و همکاران اثر عصاره آبی-الکلی زعفران بر بهبود افسردگی خفیف تا متوسط مطالعه شد و اثر آن را با فلوکستین مقایسه گردید. نتایج آن نیز بر اثر مثبت زعفران در کاهش علائم افسردگی در مقایسه با فلوکستین تاکید دارد(۷). از سوی دیگر، تحقیقات دیگر بر توانائی ضد دردی و ضد التهابی عصاره زعفران در موش‌های کوچک آزمایشگاهی نسبت به‌داروهای ضد درد و ضد التهاب رایج تاکید دارد (۸). اثر عصاره زعفران در کاهش صرع ناشی از تزریق داروی پنتیلن تترازول در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نیز اثبات شده‌است و مشخص شده است که احتمالا این اثر به‌دلیل تاثیر عصاره بر سیستم‌های نوروترانسمیتری اوپیوئیدی و یا گابائرژیک مغز می‌باشد(۹).

از آنجا که این گیاه از دیرباز مورد مصرف بوده است و مصارف دارویی آن نیز با پیشرفت علم رو به‌افزایش است لذا بررسی سمیت این گیاه ضروری به‌نظر می‌رسد. راه‌های متفاوتی برای ارزیابی سمیت سلولی ترکیبات وجود دارد. یکی از این روش‌ها MTT assay می‌باشد. روش MTT بر اساس واکنش ماده [3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,4-diphenyltetrazolium bromide] با آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده و تبدیل آن به‌ماده آبی‌رنگ فورمازان استوار است. فقط سلول‌های زنده دارای این آنزیم می‌باشند و میزان فورمازان و رنگ آبی تولید شده با میزان سلول‌های زنده رابطه مستقیم دارد (۱۴-۱۰). در این مطالعه اثرات سایتوتوکسیک گیاه زعفران روی یک رده سلولی نرمال Vero به‌منظور بررسی ایمنی مصرف گیاه با روش MTT تعیین شد. از طرف دیگر سرطان یکی از بیماری‌هایی است که شیوع نسبتا زیادی پیدا کرده است و داروهای موجود برای درمان آن از کفایت لازم برخوردار نمی‌باشند. تحقیقات وسیعی روی یافتن داروهای جدید ضد سرطان انجام گرفته و تعدادی از آنها با منشا گیاهی شناخته شده و وارد بازار شده‌اند. ولی همچنان خلاء داروهایی با کارآیی بیشتر و عوارض جانبی کمتر وجود دارد. به‌طوریکه مراکز متعددی برای یافتن این داروها به‌خصوص با منشا طبیعی در حال فعالیت می‌باشند. لذا، اثرات سایتوتوکسیک عصاره گیاه زعفران روی دو رده سلول سرطانی Hep2 و HeLa نیز تعیین شد.

مواد و روش‌ها:

تهیه گیاه

گیاه زعفران از شرکت سحرخیز خریداری شد و نام علمی آن توسط هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران تعیین گردید.

عصاره‌گیری

۵ گرم از پودر گیاه به‌روش ماسراسیون با استفاده از حلال متانول: آب ۸۰:۲۰ به‌نسبت ۱:۱۰ به‌مدت چهار روز عصاره‌گیری شد. پس از گذشت هر ۲۴ ساعت مخلوط گیاه – حلال صاف شد و حلال جدید به‌باقی‌مانده گیاه اضافه شد. عصاره به‌دست آمده توسط دستگاه تقطیر در خلاء در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و سپس توسط دستگاه فریز درایر تا حد خشک شدن تغلیظ گشت، و تا قبل از استفاده در یخچال نگهداری شد. به‌منظور بررسی اثر سایتوتوکسیک گیاه، عصاره گیاه در DMSO (Dimethyl sulfoxide) ۱۰٪ حل شد.

رده‌های سلولی

سه رده سلولی HeLa (کارسینومای بدخیم سرویکس انسانی)، Hep2 (کارسینومای لارنژ انسانی) و Vero (سلول‌های کلیه میمون سبز آفریقایی) از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند.

مواد مورد استفاده

حلال‌های مورد استفاده از شرکت Merck، MTT و تریپسین-EDTA از شرکت Sigma، محیط‌های کشت و جنتامایسین از شرکت Gibcobrl تهیه شدند.

تعیین فعالیت سایتوتوکسیک گیاه به‌روش MTT

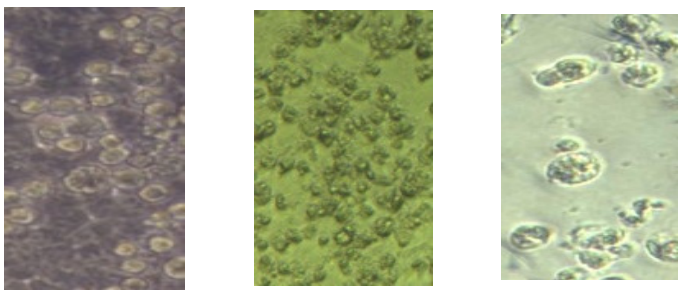
رده‌های سلولی Vero, HeLa و Hep_2 به‌ترتیب در محیط‌های کشت MEM, RPMI 1640, RPMI 1640 حاوی۱۰٪ FBS و ۱٪ آنتی‌بیوتیک جنتامایسین جهت جلوگیری از رشد میکرب‌ها کشت داده شدند. سپس داخل گرمخانه با شرایط ۵٪ CO_2، رطوبت ۹۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و منحنی رشد آنها ترسیم شد. سلول‌ها در حد نهایی فاز رشد خود به‌وسیله محلول تریپسین-EDTA از یکدیگر و ظروف محیط کشت جدا شد و سانتریفوژ گردید. سپس با روش trypan blue dye exclusion درصد زنده بودن (viability) آنها مشخص شد. تعداد ۲×۱۰^{۵} سلول زنده در میکروپلیت‌های 96 خانه کشت داده شد و به‌مدت ۷۲ ساعت درون گرمخانه با شرایط گفته شده قرار گرفت. رقت‌های انتخابی عصاره زعفران (۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲۵ µg/ml) به‌مدت ۷۲ ساعت جهت بررسی اثرات سایتوتوکسیک با سلول‌های کشت داده شده مجاور سازی شد. بعد از این مرحله، سلول‌ها با ماده MTT مجاور شدند و به‌مدت ۵-۳ ساعت در گرمخانه

۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. محیط کشت سلول‌ها خارج شد و برای حل شدن ماده فورمازان واکنش داده با سلول‌های چسبیده به کف پلیت‌ها جهت قرائت OD، به‌میزان ۱۰۰ میکرولیتر ایزو بوتیل الکل به میکروپلیت‌ها اضافه شد. در دستگاه شیکر به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت تا فورمازان تولید شده حل شود. سپس جذب نوری محلول در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه microplate reader ثبت شد (۱۰،۱۱، ۱۵).

لازم به ذکر است که در گروه شاهد به‌جای عصاره گیاه، حلال عصاره استفاده شد.

یافته‌ها:

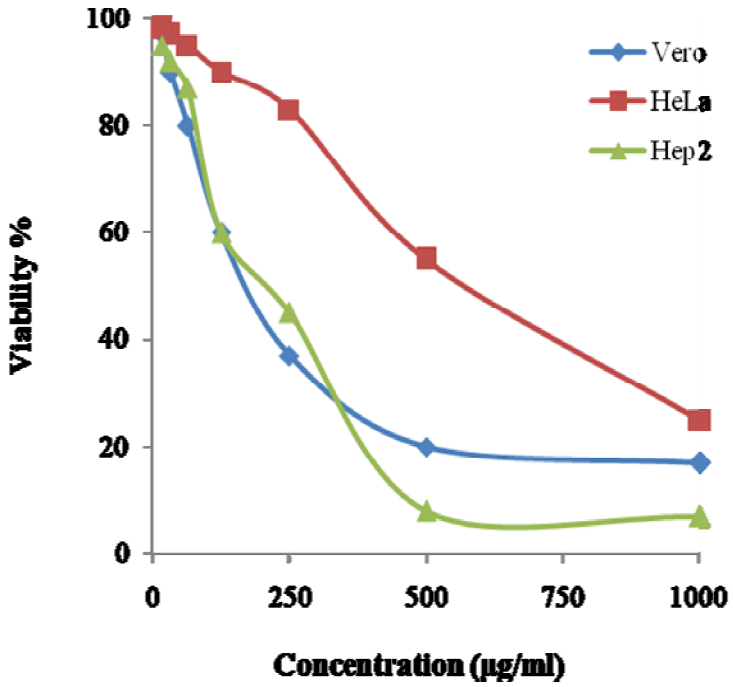
سلول‌های Vero، HeLa و Hep2 پس از مجاورت با غلظت‌های زیاد عصاره زعفران از حالت طبیعی خارج شدند و مرفولوژی آنها تغییر یافت، که نشان‌دهنده اثرات سمی عصاره زعفران روی این سلول‌ها است (شکل۱).



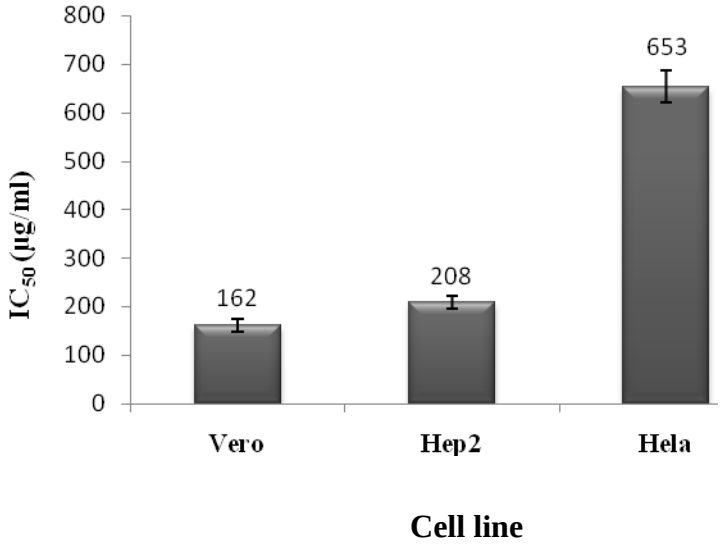
الف ب ج

شکل ۱: سلول‌های الف)Vero ، ب)HeLa و ج)Hep2 پس از مجاورت با عصاره زعفران

درصد زنده بودن سلول‌های Vero، HeLa و Hep2 در مقابل غلظت‌های مختلف عصاره تام زعفران در نمودار ۱ نشان داده شده است. با افزایش غلظت عصاره زعفران، درصد سلول‌های زنده کم شده است، به‌طوریکه در غلظت µg/ml ۱۰۰۰ از عصاره درصد سلول‌های زنده هر سه رده در حداقل بود. با استفاده از هر یک از نمودارها و برنامه Excel غلظتی از عصاره که قادر به از بین بردن ۵۰٪ از سلول‌ها بوده است (IC_{50}) در هر رده سلولی محاسبه گشت که نتایج آن در نمودار ۲ دیده می‌شود. IC_{50} عصاره گیاه زعفران روی رده سلولی نرمال Vero از دو رده دیگر کمتر بود(µg/ml ۱۶۲). این امر نشان دهنده این نکته است که گیاه روی این رده سلولی سمیت بیشتر دارد. در واقع با غلظت کمتری قادر به از بین بردن ۵۰٪ سلول‌ها شده است. IC_{50} عصاره زعفران روی رده سلولی HeLa به‌طور قابل توجهی از دو رده سلولی دیگر بیشتر بود (µg/ml ۶۵۳). این امر نشان دهنده سمیت ناچیز عصاره روی این رده سلولی بود. سمیت عصاره روی رده سلولی Hep2 اندکی کمتر از رده سلولی Vero بود. (µg/ml ۲۰۸).



نمودار ۱: درصد زنده بودن سلول‌های Vero, HeLa و Hep2 پس از مجاورت با غلظت‌های مختلف عصاره زعفران



نمودار۲: IC_{50} عصاره زعفران روی رده‌های سلولی Vero، HeLa و Hep2

بحث:

از نتایج چنین برمی‌آید که عصاره زعفران دارای اثرات سمی روی سه رده سلولی Vero، HeLa و Hep2 می باشد. میزان سمیت روی رده سلولی طبیعی Vero بیشتر از دو رده سلولی سرطانی است. کمترین میزان سمیت روی رده سلولی HeLa دیده می‌شود (IC_{50} معادل ۶۵۳µg/ml). گرچه مقادیر IC_{50} به‌دست آمده نشانگر زیاد نبودن سمیت گیاه است ولی به‌هر حال با افزایش دوز، اثرات سایتوتوکسیک مشاهده شده است که نشان می‌دهد در مصرف دوزهای بالای زعفران باید احتیاط نمود. زعفران گیاهی است که مصرف زیادی در صنایع غذایی و نیز در طب سنتی دارد (۳). امروزه تحقیقات فارماکولوژیک و بالینی زیادی نیز روی این گیاه صورت گرفته است و مشخص شده است که اثرات درمانی زیادی دارد. برای دستیابی به این اثرات، دوزهای بسیار بالاتر از مقادیر مصرف غذایی زعفران لازم است. تحقیقات متعدد کارایی زعفران را در بهبود بیماری‌های سیستم اعصاب مرکزی نشان داده‌اند که این امر مصارف این گیاه را به‌عنوان یک گیاه دارویی افزایش می‌دهد (۶،۷، ۹). همزمان با افزایش موارد مصرف یک گیاه بررسی‌های ایمنی گیاه نیز اهمیت بیشتری می‌یابد. مطالعات مختلفی نیز برای بررسی اثرات سمیت سلولی زعفران روی سلول‌های غیرسرطانی در کشت سلولی انجام شده است. در یکی از این مطالعات اثرات عصاره زعفران روی سلول‌های طبیعی YAMC (کولون موش بالغ جوان) انجام شد و مشخص گردید که عصاره گیاه تا غلظت ۱۰۰۰ µg/ml فاقد سمیت است (۱۶). در حالیکه، مطالعه حاضر روی سلول‌های Vero نشان داد این گیاه دارای اثرات سمی روی این رده سلولی است. بنابراین، به‌نظر می‌رسد که مصرف دوزهای بالای گیاه به‌خصوص به‌عنوان دارو باید با احتیاط صورت پذیرد. به‌علاوه، بررسی اثرات توکسیک گیاه روی سایر رده‌های سلولی نرمال نیز امری ضروری است.

مطالعات متعددی روی اثرات ضد سرطانی گیاه زعفران به‌صورت *in-vitro* و *in-vivo* انجام شده است و اثرات ضد سرطانی این گیاه در تعدادی از آنها اثبات شده است. فرضیه‌های زیادی نیز راجع به مکانیسم اثر این گیاه وجود دارد که شامل مهار اسیدهای نوکلئیک، مهار رادیکال‌های آزاد و واکنش کاروتنوئیدهای گیاه با توپوایزومراز II می‌باشد. در تحقیقی که روی اثرات سمیت زعفران روی سلول‌های MCF-7 (سلول‌های سرطانی سینه) انجام شد، نشان داد که غلظتی از عصاره گیاه که باعث مهار رشد ۵۰٪ از سلول‌های سرطانی شده است ۴۰۰ µg/ml می‌باشد. به‌علاوه، عصاره گیاه قادر به القاء خزان یاخته (آپوپتوز) در سلول‌های MCF-7 نیز

بوده است (۱۷). در مطالعه‌ای دیگر اثرات عصاره زعفران و ماده عمده گیاه به‌نام کروسین روی سلول‌های سرطان کلورکتال به‌نام‌های HT-116، SW-480 و HT-29 بررسی شد. نتایج حاکی از اثرات سمی این گیاه و ماده کروسین روی این رده‌های سلولی بوده‌است (۱۶). از آنجا که طبق مطالعه حاضر گیاه دارای اثرات سمی نسبتا کم روی رده سلولی Hep2 و اثر بسیار اندک روی رده سلولی HeLa می‌باشد، شاید بتوان این گیاه را یک داوطلب مناسب جهت تحقیقات سرطان نام برد که با استخراج ترکیبات موجود در گیاه به‌ماده‌ای با اثرات شاخص ضد سرطان دست یافت.

نتیجه گیری:

علی‌رغم استفاده فراوان غذایی و دارویی زعفران، این گیاه در غلظت‌های زیاد دارای اثرات سمی روی رده سلولی نرمال Vero می‌باشد. این امر ضرورت احتیاط در مصرف دوزهای بالای این گیاه را خاطرنشان می‌سازد. از طرف دیگر به‌علت اثرات سمی گیاه روی رده سلولی سرطانی Hep2 و نیز اثر بسیار ناچیز روی رده سلولی HeLa می‌توان تحقیقات گسترده‌تری را جهت یافتن اثرات ضد سرطانی این گیاه انجام داد.

فهرست مراجع:

double-blind, randomized pilot trial. *Ethnopharmacol*. 2005; **97**: 281-284.

8.Hosseinzadeh H, Younesi HM. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacol*. 2002; **2**: 7-15.

9. Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR. Protective effect of safranal on pentylentetrazol-induced seizures in the rat: involvement of GABAergic and opioid systems. *Phytomed*. 2007; **14**: 256-262.

10. Rahimifard N, Hajimehdipoor H, Hedayati MH, Bagheri O, Pishehvar H, Ajani Y. Cytotoxic Effects of Essential Oils and Extracts of some *Mentha* species on Vero, HeLa and Hep2 Cell Lines. *J. Med. Plants*. 2010; **9(35)**: 88-99.

11. Rahimifard N, Pakzad SR, Shoeibi Sh, Hedayati MH, Hajimehdipour H, Motaharinia V, Mehrafshan L, Javadi A, Pirali Hamedani M. Effects of essential oil and extract of *Thymus vulgaris*, *Zataria multiflora* and *Eugenia carryophilata* on Vero, HeLa, Hep2 cell lines by MTT assay. *J. Med. Plants*. 2009; **8(30):** 152 - 156.

12. Mosaddegh M, Ostad SN, Naghibi F, Hamzeloo Moghadam M. Cytoxic effects of five species of *Inula* against some tumor cell lines. *IJPR*. 2006; **2 (4):** 203-208.

13. Mosaddegh M, Hamzeloo Moghadam M, Ghafari S, Naghibi F, Ostad SN, Read RW.

۱- مظفریان و. *فرهنگ نام‌های گیاهان ایران*. فرهنگ معاصر. تهران. ۱۳۸۸، ص. ۱۶۵.

۲- خاکپور ب، رستمپور واجارگاه م، صحرایی ه، کمال نژاد م، شمس ج. بررسی اثر عصاره آبی کلاله گل زعفران (*Crocus sativus*) بر کسب و بیان حساسیت حرکتی ناشی از مورفین در موشهای کوچک نر. *مجله پزشکی کوثر*، ۱۳۸۶ ، شماره ۱۲، صص ۳۱۳-۳۲۱

۳- زرگری ع. *گیاهان داروئی*. مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. تهران. جلد چهارم. ۱۳۷۵؛ ص ۵۷۴

4. Huang KCH. *The Pharmacology of Chinese Herb*. 2nd ed. USA. CRC Press. 1999, pp: 172, 474-475.

5. Duke JA. *Handbook of Medicinal Herbs*. 2nd ed. USA .CRC Press.. 2001, pp. 256-268.

6.Akhondzadeh Sh, Fallah-Pour H, Afkham Kh, Jamshidi AH, Khalighi-Sigaroudi F. Comparison of *Crocus sativus* L. and imiperamine in the treatment of mild to moderate depression: a pilot double-blind randomized trial. *BMC Comp. Altern Med*. 2004; **4**: 12-16.

7.Noorbala AA, Akhondzadeh Sh, Tahmacebi-Pour N, Jamshidi AH. Hydro-alcoholic extract of *Crocus sativus* L. versus fluoxetine in the treatment of mild to moderate depression: a

Sesquiterpene lactones from *Inula oculuschristi*. *NPC*. 2010; **5 (4):** 511-514.
14. Sahranavard S, Naghibi F, Mosaddegh M, Esmaeili S, Sarkhail P, Taghvaei M, Ghafari S. Cytotoxic activities of selected medicinal plants from Iran and phytochemical evaluation of the most potent extract. *RPS*. 2009; **4(2)**: 133-137.
15.Alley MC, Scudiero DA, Monkes A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR. Feasibility of drug screening with panel of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res*. 1988; **48**: 589 - 601.
16. Aung HH, Wang CZ, Ni M, Fishbein A, Mehendale SR, Xie JT, Shoyama CY, Yuan CS. Crocin from *Crocus sativus* possesses significant anti-prolifration effects on human colorectal cancer cells. *Exp Oncol*. 2007; **29(3)**: 175-180.
17. Mousavi SH, Tavakkol Afshar J, Brook A. Study of cytotoxic effects of saffron in MCF-7 cells. *IJPS*. 2008; **4(4)**: 261-268.