مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال یازدهم، شماره اول، پیاپی چهل و یکم، تابستان ۱۴۰۱ (۲۲-۱۱)

DOI: 10.30473/eab.2021.61225.1851

مقاله پژوهشی:

مقایسه خواص ضدسرطانی کلاله زعفران‌های (*Crocus sativus*) مناطق مختلف ایران روی سلول‌های MDA-MB-231 و MCF-7 سرطان پستان انسانی

نجیبه شیدایی[۱]، راحله شاکری[۲*]

۱. کارشناس‌ارشد، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

۲. استادیار، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۲۱ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۱۸)

چکیده

سرطان بیماری است که از تکثیر کنترل‌نشده سلول‌ها ناشی می‌شود. سرطان پستان دومین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در سراسر جهان می‌باشد. رایج‌ترین روش‌های درمان سرطان پستان جراحی، شیمی‌درمانی و پرتودرمانی است که هر کدام اثرات جانبی نامطلوبی برای بیماران به همراه دارند. از این‌رو، تلاش بر این است که ترکیبات شیمی‌درمانی جدیدی شناسایی شوند که عوارض جانبی کمتری دارند یا عوارض جانبی آن‌ها را روی سلول‌های سالم کاهش دهند. زعفران با داشتن ترکیبات دارویی مختلف مانند کروسین و سافرانال مورد توجه محققان در تحقیقات سرطان قرار گرفته است. با توجه به گزارش‌های مختلف در خصوص اثر ضدسرطانی زعفران، در این پژوهش خواص ضدسرطانی زعفران‌های زراعی کشت شده در مناطق مختلف ایران بر دو رده سلولی سرطان پستان (MCF-7 و MDA-MB-231) بررسی شد. ابتدا عصاره‌های آبی و متانولی از نمونه‌ها تهیه و سپس اثر سیتوتوکسیک آن‌ها در غلظت‌های مختلف بر بقای هر دو رده سلولی در مدت زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت با تست MTT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این عصاره‌ها اثر سیتوتوکسیک قابل توجهی بر رده سلولی MDA-MB-231 ندارند، اما تأثیر این عصاره‌ها بر رده سلولیMCF-7 در غلظت‌های بالاتر و زمان بیشتر مشهود بود. بیشترین اثر سیتوتوکسیک مربوط به زعفران کشت‌شده در گناباد بود. همچنین اثر سیتوتوکسیک عصاره‌های متانولی بیشتر از عصاره‌های آبی بود.

واژه‌های کلیدی: زعفران، سافرانال، سرطان پستان، شیمی‌درمانی، ضدسرطان، کروسین.

The Comparison of Anticancer Properties of Collected Saffron from Different Region of Iran on Human Breast Cancer Cells

Najibeh Sheidaei[1], Raheleh Shakeri[1*]

1. M. A., Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

(Received: Oct. 13, 2021 – Accepted: Nov. 9, 2021)

Abstract

Cancer is a disease that results from the uncontrolled proliferation of cells. Breast cancer is the second leading cause of cancer death worldwide. The most common treatment methods of breast cancer are surgery, chemotherapy and radiation therapy, which each have adverse side effects for patients. In this way, efforts are being made to identify new chemotherapeutic compounds that have fewer side effects or reduce their side effects on normal cells. Saffron has been considered by researchers in cancer treatment due to its various medicinal compounds. In this study, according to various reports on the anti-cancer effect of saffron, the anti-cancer properties of cultivated saffron in different regions of Iran was investigated against two breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231). First, aqueous and methanolic extracts were prepared from the samples and then their cytotoxic effect at different concentrations on the viability of both cell lines at 48 and 72 hours was investigated by MTT assay. The results showed that these extracts did not have a significant cytotoxic effect on the MDA-MB-231 cell line, but the effect of these extracts on the MCF-7 cell line was becoming evident at higher concentrations and increasing time. The cultivated saffron in Gonabad region had greatest cytotoxic effect. Also, the cytotoxic effect of the methanolic extracts was more than the aqueous extracts.

Keywords: Anticancer, Breast Cancer, Chemotherapy, Crocin, Saffron, Safranal.

* نویسنده مسئول: راحله شاکری Email: r.shakeri@uok.ac.ir

مقدمه

زعفران زراعی با نام علمی *Crocus sativus* از گیاهانی است که بخش کلاله[1] آن گران‌ترین ادویه جهان با خواص زیستی متعدد می‌باشد که در مناطق مختلفی از جهان به‌ویژه ایران، هند، یونان، اسپانیا، مراکش، چین، آذربایجان، ایتالیا، فرانسه، ترکیه، مصر، امارات متحده عربی، مکزیک، سوئیس، استرالیا، نیوزیلند و الجزایر کشت می‌شود. در طب سنتی از زعفران به‌عنوان ضددرد و آرامبخش برای درمان بیماری‌ها استفاده می‌شود (Siddique *et al*., 2020). کروسین[2]، کروستین[3]، سافرانال[4] و پیکروکروسین[5] از مهم‌ترین متابولیت‌های موجود در عصاره هیدروالکلی تهیه شده از کلاله زعفران هستند. کروستین یک دی‌کربوکسیلیک اسید غیرگلیکوزیله با ۴ واحد ایزوپرن[6] است که به صورت کروستین آزاد، متیل کروستین و ترانس‌دی‌متیل کروستین در زعفران یافت می‌شود. کروسین مشتق گلوکوزیدی کروستین است که مسئول رنگ زرد و نارنجی زعفران می‌باشد. کروسین‌ها انواع مختلفی دارند که استر دی‌جنتیوبیوزیل کروستین[7] با فرمول بسته ($C_{40}H_{64}O_{26}$) بیشترین غلظت را دارد. کروسین ازطریق هیدرولیز در بدن به کروستین تبدیل می‌شود. زعفران در کنار رنگ منحصر به فرد، طعم خاصی دارد که مربوط به یک ترکیب گلیکوزیدی با فرمول بسته ($C_6H_{26}O_7$) به نام پیکروکروسین است. سافرانال یک ترکیب مونوترپن آلدهیدی ($C_{10}H_{14}O$) فاقد رنگ است که به‌عنوان مهم‌ترین ماده شیمیایی در کلاله زعفران و مسئول بو و عطر آن به حساب می‌آید. سافرانال در اثر جدا شدن واحد قندی از پیکروکروسین بدست می‌آید. این عطر از طریق تجزیه آنزیمی و حرارتی در طول فاز ذخیره‌سازی تولید می‌شود (Verma & Middha, 2010).

مکانیسم دقیق فعالیت ضد سرطانی زعفران و اجزای آن هنوز به خوبی شناخته نشده‌است؛ با این حال، سازوکارهای متعددی مانند القای آپوپتوز، القای توقف چرخه سلولی، تنظیم کاهشی بیان ماتریکس متالوپروتئینازها و القای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در این زمینه پیشنهاد شده‌است. آپوپتوز[8] یک فرایند فیزیولوژیکی از مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده است که نقش حیاتی در تکامل و تمایز موجودات چند سلولی ایفا می‌کند. آپوپتوز با تغییرات سلولی ویژه نظیر انقباض سلولی، تجزیه هسته‌ای، متراکم‌شدن کروماتین و تکه‌تکه شدن DNA مرتبط است که در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شود (Khorasanchi *et al*., 2018). مشاهده شده‌است که تعدادی از داروهای شیمی‌درمانی و داروهای شیمیایی طبیعی اثرات ضدسرطانی خود را از طریق القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی اعمال می‌کنند. القای آپوپتوز توسط زعفران و ترکیبات فعال آن در سلول‌های سرطانی گزارش شده‌است. تعدیل یا مهار آپوپتوز نشانه‌ای از شروع و پیشرفت سرطان است، بنابراین القای آپوپتوز به‌عنوان یکی از بهترین راه‌کارها در درمان سرطان شناخته می‌شود. عوامل اجرایی آپوپتوز، پروتئازهایی به نام کاسپاز[9] هستند که به دو دسته کاسپازهای آغازکننده (مانند کاسپاز-۹ و -۸) و اجرایی (مانند کاسپاز-۳ و -۷) دسته‌بندی می‌شوند. Liu *et al*. (2014) گزارش کردند که اثرات ضدتوموری زعفران در سرطان ریه، از طریق القای آپوپتوز به واسطه کاسپازهای -۳، -۸ و -۹ است. گزارش شده است که کروسین با فعال کردن کاسپاز-۸، تنظیم افزایشی پروتئین پروآپوپتوزی Bax[10]، افزایش نفوذپذیری غشای داخلی

1. Stigmas
2. Crocin
3. Crocetin
4. Safranal
5. Picrocrocin
6. Isoprene
7. Di-Gentiobiosyl Crocetin

8. Apoptosis
9. Caspase
10. Bcl-2-associated X protein

میتوکندری و رهایی سیتوکروم C از میتوکندری سبب القای آپوپتوز و مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود. القای آپوپتوز به‌واسطه فعال‌شدن کاسپاز-۹ هم برای سلول‌های تیمارشده با کروسین و عصاره زعفران گزارش شده است. بنابراین القای آپوپتوز یک سازوکار کلیدی برای اثر ضدسرطانی زعفران و متابولیت‌های آن است (Lu *et al*., 2015).

در سال‌های اخیر بسیاری از محققان، گزارش کردند که عصاره‌های تام زعفران خواص ضدسرطانی مختلفی دارند (Tavakkol-Afshari *et al*., 2008). با توجه به این‌که اثر ضدسرطانی زعفران مربوط به ترکیبات کروسین، کروستین، پیکروکروسین و سافرانال است، ممکن است میزان این مواد بسته به شرایط جغرافیایی دچار تغییر شود. براین‌اساس با توجه به کشت زعفران در مناطق مختلف ایران، هدفِ این پژوهش بررسی و مقایسه خواص ضدسرطانی زعفران‌های کشت‌شده در مناطق مختلف ایران شامل گناباد، قائن، سروآباد، نجف‌آباد و کوهدشت است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

محیط کشت سلولی (RPMI 1640)، سرم جنین گاوی (FBS) و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین از شرکت GibcoBRL خریداری شدند. پلیت ۹۶ خانه کشت سلول از Nunc، دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) و متانول از Carlo Ebra، پودر MTT[1] و بافر فسفات از شرکت سیگما خریداری شدند.

عصاره‌گیری

کلاله زعفران از پنج نقطه مختلف ایران شامل گناباد، نجف آباد اصفهان، سروآباد، قائن و کوهدشت لرستان جمع آوری شد که همه این نمونه‌ها از جنس کروکوس ساتیووس بودند. جهت عصاره‌گیری با روش خیساندن (Azmir *et al*., 2013)، یک گرم از هر کلاله پودر شده با ۶۰ میلی‌لیتر حلال (متانول یا آب) به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی با همزن مغناطیسی مخلوط شد و سپس ۲۴ ساعت در تاریکی جهت ته‌نشین شدن کلاله‌ها قرار گرفت. پس از اتمام انکوباسیون، محلول رویی صاف شده با کاغذ صافی، جمع‌آوری و به رسوبات باقیمانده ۶۰ میلی‌لیتر حلال اضافه شد و پس از انکوباسیون محلول رویی جمع‌آوری شد. عمل فوق سه بار و به مدت سه روز متوالی تکرار شد. محلول‌های جمع‌آوری شده نهایی با دستگاه روتاری تغلیظ شدند. محلول تغلیظ شده در یک شیشه ساعت در تاریکی و زیر هود به‌طور کامل خشک شد. عصاره خشک شده در شیشه ساعت توسط تیغه جمع‌آوری و در یک میکروتیوپ یا ویال ذخیره گردید. جهت تهیه غلظت‌های مختلف از عصاره، عصاره آبی در آب و عصاره متانولی در DMSO با غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حل شدند و برای مطالعات سلولی، غلظت‌های مختلف تهیه شد. لازم به ذکر است که عصاره‌های محلول در DMSO، به گونه‌ای رقیق شدند که درصد نهایی DMSO در تیمار سلولی یک درصد باشد. عصاره‌ها تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

کشت سلول

رده‌های سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری و در محیط RPMI1640 حاوی سرم جنین گاوی ۱۰ درصد کشت داده شدند. جهت مطالعات سلولی، سلول‌ها به تعداد ۱۵۰۰۰ سلول در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی سرم در هر چاهکِ پلیت ۹۶ خانه استریل و کف صاف توزیع شدند. پلیت به درون انکوباتور دارای CO_2 با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شد تا سلول‌ها بچسبند و مورفولوژی بگیرند. بعد از گذشت تقریبا ۱۶ساعت از

1. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

زمان کشت سلول در پلیت، غلظت‌های مختلف نمونه‌ها پس از ورتکس در زیر هود به چاهک‌های پلیت اضافه گردید و مجدد به انکوباتور منتقل شد. پس از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از عصاره‌ها، میزان بقای سلول‌ها با تست MTT سنجش شد (Mosmann, 1983).

تست MTT

MTT یک روش رنگ‌سنجی برای ارزیابی تعداد سلول‌ها زنده است. در این روش آنزیم سوکسینات دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول‌های زنده نمک تترازولیوم را به کریستال بنفش رنگ فورمازان تبدیل می‌کند که پس از حل کردن این کریستال‌ها در DMSO، در طول موج ۴۹۲ نانومتر جذب دارند (Van Meerloo *et al*., 2011). برای انجام تست MTT، پس از اتمام زمانِ تیمار سلول‌ها با عصاره‌ها، محیط کشت موجود در هر چاهک پلیت به‌طور کامل تخلیه و با ۲۰۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر جایگزین شد. پلیت حاوی محلول MTT به مدت ۴-۳ ساعت در انکوباتور CO_2 دار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس پلیت به‌طور کامل از محلول MTT تخلیه و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به چاهک‌ها اضافه شد. بعد از ۲۰- ۱۵ دقیقه، جذب هر چاهک با دستگاه پلیت ریدر با مدل Sunrise ساخت شرکت BioTek در طول موج ۴۹۲ قرائت شد.

تجزیه و تحلیل و آنالیز آماری داده‌ها

پس از قرائت میزان جذب هر چاهک، درصد مهار مطابق معادله (۱) محاسبه شد و با ترسیم منحنی درصد مهار در مقابل غلظت‌های مختلف عصاره، میزان IC_{50} (غلظتی از عصاره که سبب مرگ ۵۰ درصد از سلول‌ها می‌شود) محاسبه شد. آنالیز آماری نتایج با آزمون t-test و استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۶ انجام شد. *P*-value کمتر از ۰/۰۵ معنادار درنظر گرفته شد.

معادله (۱) = درصد مهار نتایج

$$\frac{\text{جذب نمونه تیمار شده با عصاره} - \text{جذب کنترل منفی}}{\text{جذب کنترل منفی}} \times ۱۰۰$$

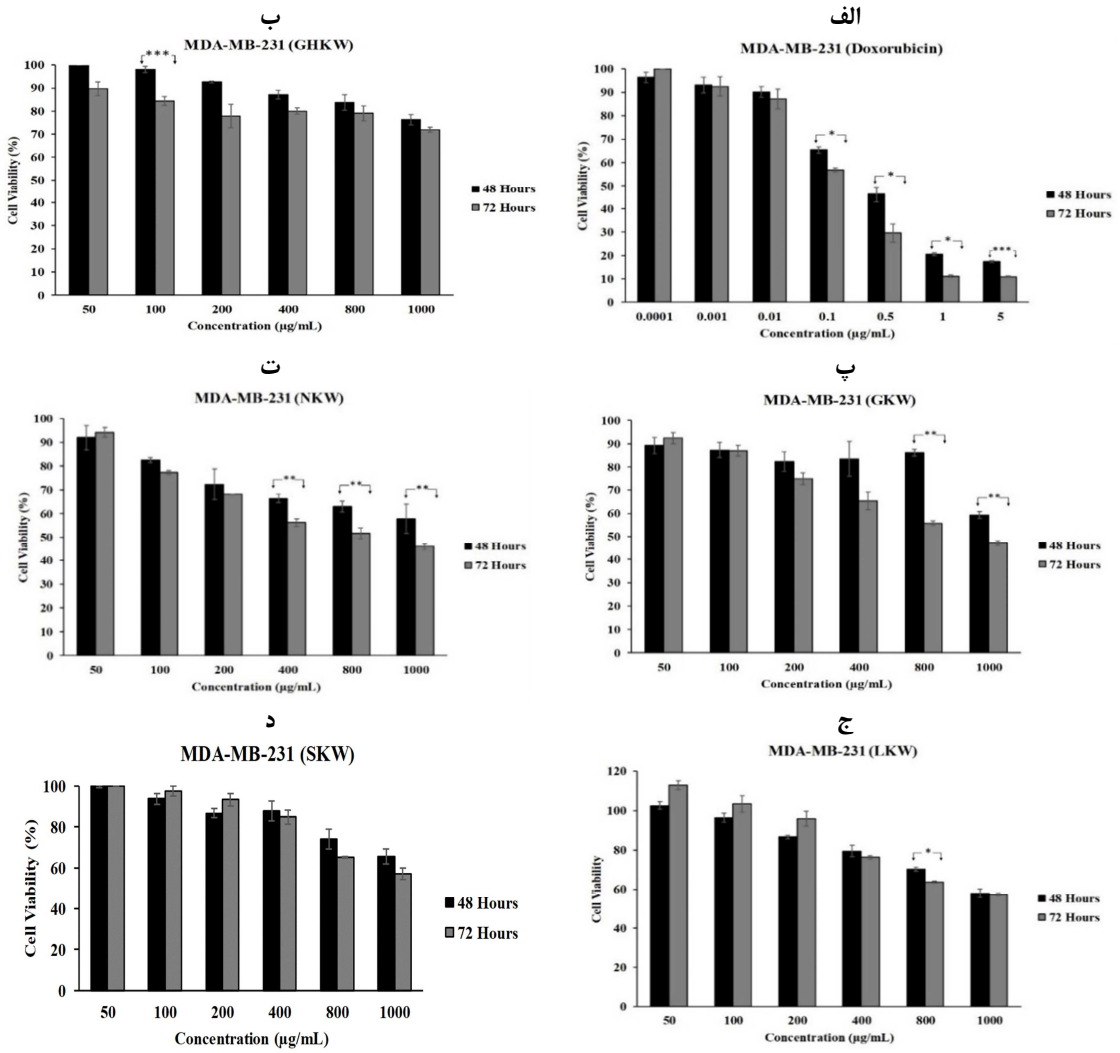
بررسی بقای سلول‌های MDA-MB-231 تیمارشده با عصاره آبی تهیه شده از کلاله زعفران

سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 با عصاره‌های آبی تهیه شده از کلاله زعفران‌های پنج نوع زعفران با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. از داروی شیمی‌درمانی دوکسوروبیسین به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. درصد بقای سلول‌های MDA-MB-231 در حضور دوکسوروبیسین و عصاره آبی کلاله پنج نوع زعفران در شکل ۱ نشان داده شده است. IC_{50} عصاره‌های آبی و دوکسوروبیسین در جدول ۱ قابل مشاهده است. همان‌طورکه در شکل ۱- ب مشاهده می‌شود، اثر غلظت‌های مختلف GHKW به‌استثنای غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر رده سلولی MDA-MB-231، در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت یکسان است. اثر GKW در غلظت‌های ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر رده سلولی MDA-MB-231 در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت، از نظر آماری معنی‌دار است، اما در غلظت‌های پایین‌تر اختلاف معنی‌داری در دو بازه زمانی وجود ندارد (شکل ۱- پ). اثر NKW در غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر رده سلولی MDA-MB-231 در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت، از نظر آماری معنی‌دار است، اما در غلظت‌های پایین‌تر اختلاف معنی‌داری در دو بازه زمانی مشاهده نشد (شکل ۱- ت). اثر LKW فقط در غلظت ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر رده سلولی MDA-MB-231 در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت، از نظر آماری معنی‌دار است، اما در سایر غلظت‌ها اختلاف معنی‌داری در دو بازه زمانی مشاهده نشد (شکل ۱- ج). تفاوت معنی‌داری در اثر

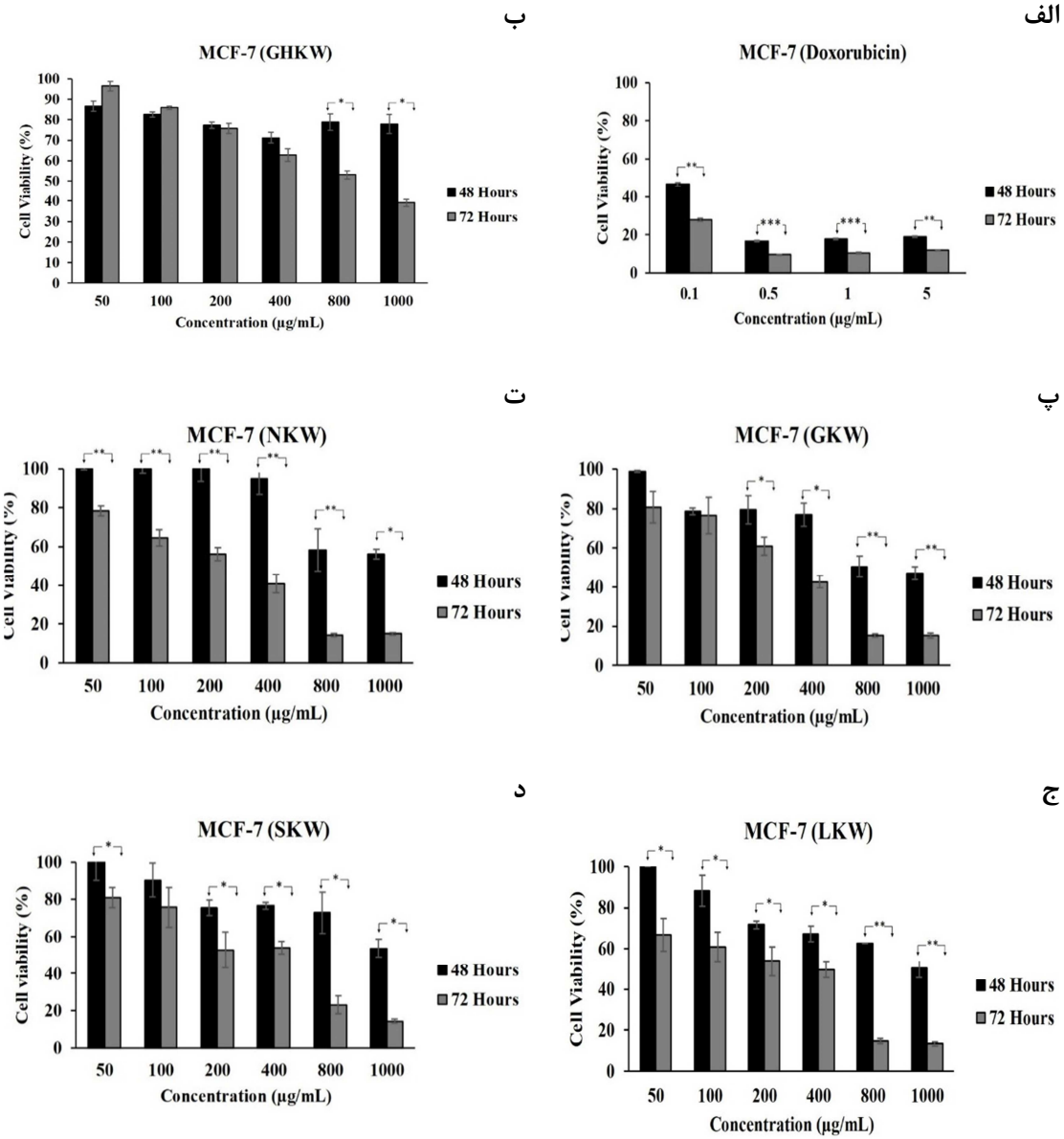
غلظت‌های مختلف SKW بر MDA-MB-231 در دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت مشاهده نشد (شکل ۱– د).

بررسی بقای سلول‌های MCF-7 تیمارشده با عصاره آبی تهیه شده از کلاله زعفران

درصد بقای سلول‌های MCF-7 در حضور دوکسوروبیسین و پنج نمونه عصاره آبی کلاله زعفران در شکل ۲ قابل مشاهده است. IC_{50} عصاره‌های آبی نمونه‌ها و دوکسوروبیسین در جدول ۱ آمده است. همان‌طور که در شکل ۲– ب مشاهده می‌شود GHKW در مدت زمان ۴۸ ساعت در همه غلظت‌ها بر سلول MCF-7 بی‌اثر است. اثر GHKW بر MCF-7 در دو بازه ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت، فقط در غلظت‌های ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر معنی‌دار است. اثر GKW بر MCF-7 در دو بازه ۴۸ و ۷۲ ساعت، در غلظت‌های بیشتر از ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر معنی‌دار است (شکل ۲– پ). اثر NKW و LKW بر MCF-7 در دو بازه ۴۸ و ۷۲ ساعت، در همه غلظت‌ها معنی‌دار است (شکل ۲– ت و ج). اثر SKW بر MCF-7 در هر دو بازه زمانی، در همه غلظت‌ها به‌استثنای غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر معنی‌دار است (شکل ۲– د).



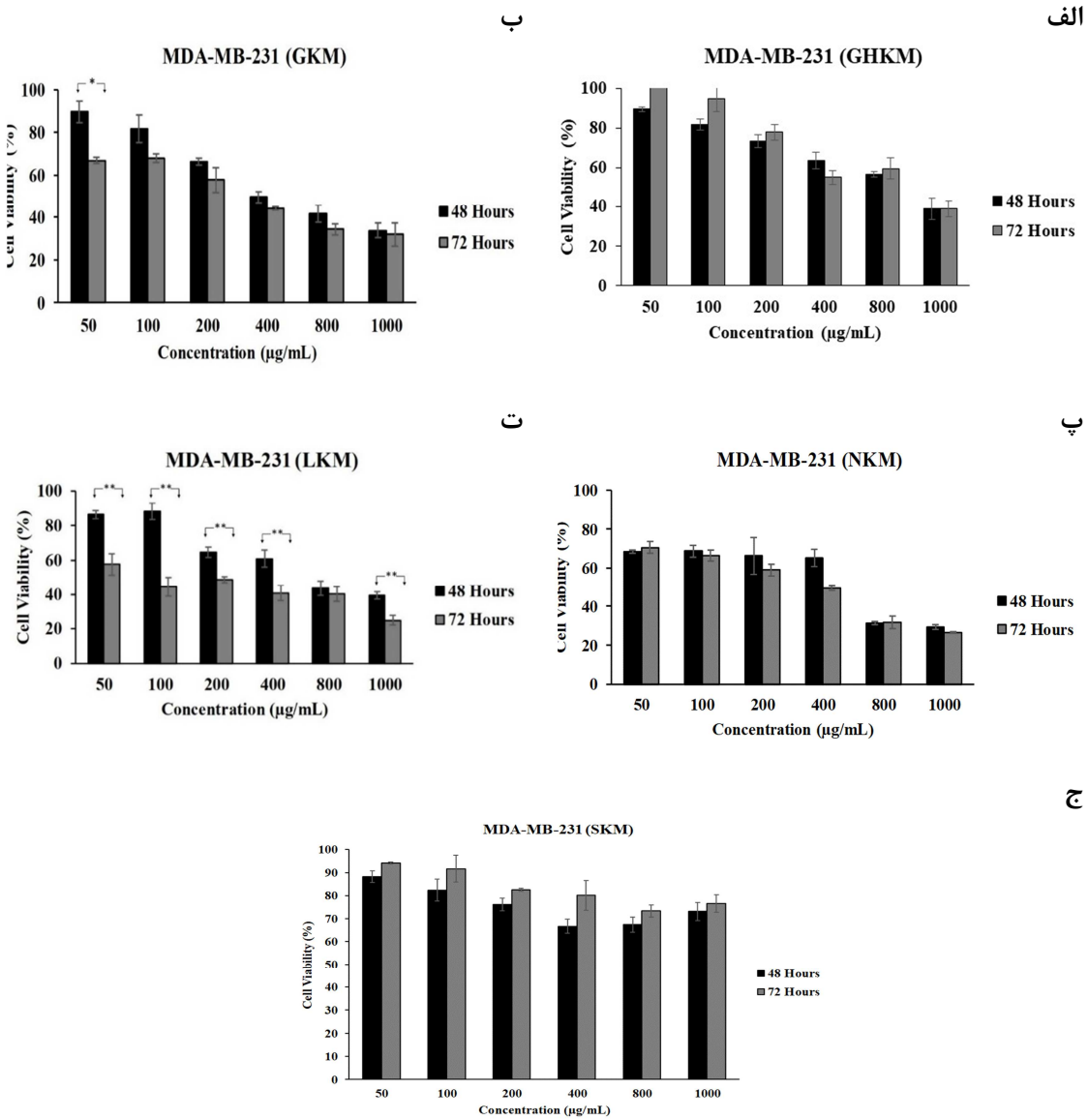
شکل ۱. نمودار درصد بقای سلول‌های MDA-MB-231 تحت تیمار غلظت‌های متفاوت دوکسوروبیسین (الف)، عصاره آبی زعفران قائن (ب)، زعفران گناباد (پ)، زعفران نجف‌آباد (ت)، زعفران کوهدشت (ج) و زعفران سروآباد (د) در مدت زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل ± دامنه تغییرات می‌باشد. p value کمتر از ۰/۰۵ معنادار درنظر گرفته شد (* $p < 0.05$، ** $p < 0.01$، *** $p < 0.001$).



شکل ۲. نمودار درصد بقای سلول‌های MCF-7 تحت تیمار غلظت‌های متفاوت دوکسوروبیسین (الف)، عصاره آبی زعفران قائن (ب)، زعفران گناباد (پ)، زعفران نجف‌آباد (ت)، زعفران کوهدشت (ج) و زعفران سروآباد (د) در مدت زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل ± دامنه تغییرات می‌باشد. p value کمتر از ۰/۰۵ معنادار درنظر گرفته شد (* p <0.05، ** p<0.01، *** p <0.001).

بررسی بقای سلول‌های MDA-MB-231 تیمارشده با عصاره متانولی تهیه‌شده از کلاله زعفران

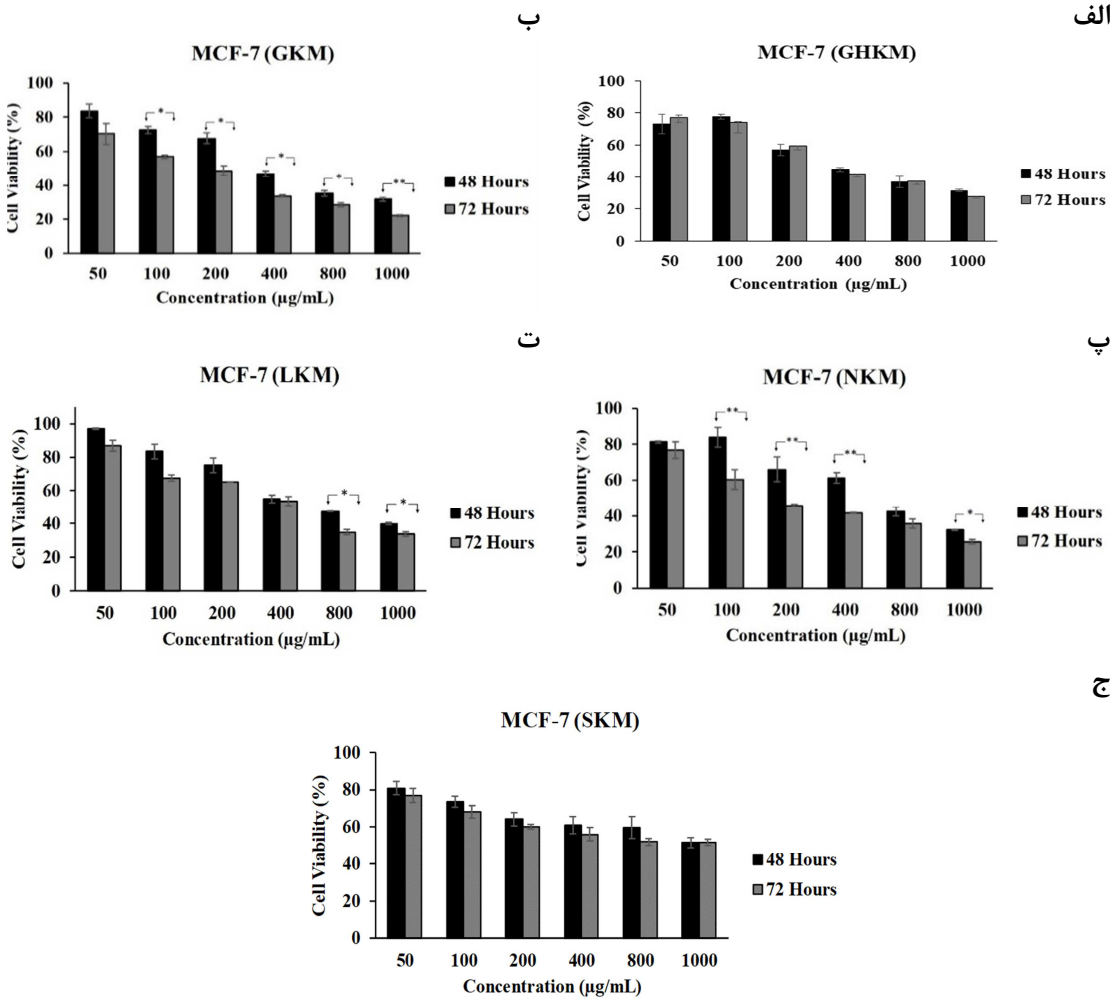
درصد بقای سلول‌های MDA-MB-231 در حضور عصاره متانولی کلاله پنج نوع زعفران در شکل ۳ قابل مشاهده است. IC_{50} عصاره‌های متانولی عصاره‌ها در جدول ۱ قابل مشاهده است. براساس نتایج به‌دست آمده، نمونه‌های GHKM، NKM و SKM در هیچ کدام از غلظت‌ها بر رده سلولی MDA-MB-231 در دو بازه ۴۸ و ۷۲ ساعت اثر سیتوتوکسیک نداشتند (شکل ۳- الف، پ و ج). اثر GKM بر MDA-MB-231 فقط در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر معنی‌دار بود (شکل ۳- ب). LKM در همه غلظت‌ها به استثنای غلظت ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بر سلول‌های MDA-MB-231 اثر سیتوتوکسیک معنی‌داری داشت (شکل ۳- ت).



شکل ۳. نمودار درصد بقای سلول‌های MDA-MB-231 تحت تیمار غلظت‌های متفاوت عصاره متانولی زعفران قائن (الف)، زعفران گناباد (ب)، زعفران نجف‌آباد (پ)، زعفران کوهدشت (ت) و زعفران سروآباد (ج) در مدت زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل ± دامنه تغییرات می‌باشد. p value کمتر از ۰/۰۵ معنادار درنظر گرفته شد (* $p<0.05$، ** $p<0.01$، *** $p<0.001$).

بررسی بقای سلول‌های MCF-7 تیمارشده با عصاره متانولی تهیه‌شده از کلاله زعفران

درصد بقای سلول‌های MCF-7 در حضور عصاره متانولی کلاله پنج نوع زعفران در شکل ۴ قابل مشاهده است. IC_{50} عصاره‌های متانولی نمونه‌ها در جدول ۱ قابل مشاهده است. براساس نتایج به‌دست آمده، اثر GHKM و SKM بر MCF-7 در هیچ کدام از غلظت‌ها در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت معنی‌دار نیست (شکل ۴- الف و ج). اثر GKM بر MCF-7 در همه غلظت‌ها به‌استثنای غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به صورت معنی‌داری با افزایش زمان، بیشتر می‌شود (شکل ۴- ب). اثر سیتوتوکسیک NKM بر MCF-7 در همه غلظت‌ها به استثنای غلظت ۵۰ و ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با افزایش زمان به‌طور معنی‌داری بیشتر می‌شود (شکل ۴- پ). اثر LKM بر MCF-7 فقط در غلظت ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با افزایش زمان بیشتر می‌شود (شکل ۴- ت).



شکل ۴. نمودار درصد بقای سلول‌های MCF-7 تحت تیمار غلظت‌های متفاوت عصاره متانولی زعفران قائن (الف)، زعفران گناباد (ب)، زعفران نجف‌آباد (پ)، زعفران کوهدشت (ت) و زعفران سروآباد (ج) در مدت زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت. نتایج میانگین سه آزمایش مستقل ± دامنه تغییرات می‌باشد. p value کمتر از ۰/۰۵ معنادار درنظر گرفته شد (* p <0.05، ** p<0.01، *** p <0.001).

جدول ۱. مقادیر IC_{50} دوکسوروبیسین، عصاره آبی و متانولی نمونه کلاله زعفران پنج نقطه مختلف ایران، سافرانال و کروسین در کشت دو بعدی برای رده‌های سلولی MDA-MB-231 و MCF-7.

	عصاره	IC_{50} (µg/mL)			
		MDA-MB-231		MCF-7	
		۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
عصاره آبی	قائن (GHKW)	>۱۰۰۰	>۱۰۰۰	>۱۰۰۰	۵۲۴/۵۹ ± ۹/۹۳
	گناباد (GKW)	>۱۰۰۰	۱۰۶۲ ± ۵۹/۴۱	۸۵۳/۶۸ ± ۱۲/۳	۲۵۰/۸۵ ± ۲۲/۹۴
	نجف آباد (NKW)	>۱۰۰۰	۱۰۰۰ ± ۲۸/۲۶	>۱۰۰۰	۳۲۳/۶۴ ± ۱۰/۰۶
	کوهدشت (LKW)	>۱۰۰۰	۱۱۶۶/۷۰ ± ۸۷/۵۹	۱۰۳۲/۶۱ ± ۳۷/۷۷	۳۰۱/۰۶ ± ۸۱/۵۲
	سروآباد (SKW)	>۱۰۰۰	>۱۰۰۰	>۱۰۰۰	۴۳۵/۵۳ ± ۳۳/۲۴
عصاره متانولی	قائن (GHKM)	۹۰۷/۲۸ ± ۶۸/۸۹	۱۰۳۷/۶۶ ± ۱۴۷/۵۱	۳۰۹/۱۹ ± ۱۳/۸۴	۳۰۰/۹۵ ± ۲/۱۱
	گناباد (GKM)	۶۱۶ ± ۱۰/۹۳	۵۸۴/۳۸ ± ۳۰/۱۷	۳۶۷/۹۱ ± ۱۱/۴۷	۱۶۷/۷۴ ± ۱۴/۷۵
	نجف‌آباد (NKM)	۵۰۵/۲۹ ± ۲۱/۶۷	۴۶۴/۸۱ ± ۱۸/۰۳	۶۲۸/۸۸ ± ۱۱/۱۱	۲۱۶/۶۵ ± ۳۴/۷۶
	کوهدشت (LKM)	۴۳۴/۵۳ ± ۱۷/۳۷	۲۴۲/۲۲ ± ۱۲/۱۱	۶۱۲/۸۷ ± ۲۱/۶۱	۴۰۲/۰۵ ± ۴۰/۰۹
	سروآباد (SKM)	>۱۰۰۰	>۱۰۰۰	۱۱۲۶/۹۲ ± ۱۱۶	۸۹۶/۱۵ ± ۱۸۸/۳۴
کنترل مثبت	دوکسوروبیسین	۰/۱۵ ± ۰/۰۱	۰/۰۵ ± ۰/۰۱	۰/۰۲ ± ۰/۰۰۳	۰/۰۱ ± ۰/۰۰۰۰۶

بحث و نتیجه‌گیری

زعفران یک گیاه دارویی و با ارزش است که به‌طور طبیعی از کلاله خشک گل *Crocus sativus* به‌دست می‌آید. زعفران را می‌توان برای اهداف چندگانه از جمله کمک به هضم غذا، آرام‌بخش، ناتوانی، سقط جنین، درمانی برای استفراغ، بیماری‌های قلبی و عروقی و سرطان استفاده کرد. گزارش شده‌است زعفران در پیش‌گیری از چندین بیماری مانند آترواسکلروز، تومور، آریتمی و پوکی استخوان مؤثر است (Hatziagapiou & Lambrou, 2018). Abdullaev & Frenkel (1992) میلادی مهار قابل توجه تشکیل کلونی و سنتز DNA و RNA سلولی در سلول‌های سرطانی دهانه رحم (HeLa) تحت تیمار با عصاره زعفران را گزارش کردند. گزارش شده است که عصاره زعفران می‌تواند بدون داشتن اثر سمی بر سلول‌های غیرسرطانی رده L929، تکثیر سلول سرطانی رده MCF-7 را به صورت وابسته به غلظت و زمان با IC_{50} برابر با ۱۸/۵±۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کاهش دهد (Mousavi *et al*., 2009). IC_{50} عصاره زعفران بر رده سلول‌های سرطانی کبد (HepG2)، دهانه رحم (HeLa)، کولون (HT-29) و پانکراس (TC1) به ترتیب برابر با ۰/۸، ۰/۹۵، ۰/۹۷ و ۱/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شده‌است (Abdullaev, 2002). سازوکارهای مختلفی مانند مهار همانندسازی اسیدهای نوکلئیک، تولید رادیکال آزاد و میان‌کنش با توپوایزومراز II برای اثرات ضدسرطانی زعفران و مواد تشکیل‌دهنده آن ارائه شده‌است (Mousavi *et al*., 2009). تجویز عصاره زعفران به صورت خوراکی و موضعی در موجود زنده، سبب کاهش سرعت رشد تومور و افزایش طول عمر حیوانات آزمایشگاهی می‌شود (Kianbakht, 2008).

با توجه به گزارش‌های متعدد در ارتباط با اثر ضدسرطانی و سیتوتوکسیک زعفران زراعی، IC_{50}های مختلفی برای عصاره‌های زعفران گزارش شده است. عوامل مختلفی مانند شرایط جغرافیایی کشت نمونه، شیوه عصاره‌گیری و نوع عصاره‌گیری در نوسان IC_{50} دخیل هستند. در پژوهش‌های قبلی انجام‌شده توسط Shakeri *et al*. (2018)، عصاره اتانولی زعفران زراعی تهیه شده از قائن با وجود داشتن مقادیر بسیار بالای سافرانال و سایر مواد مؤثره، فاقد اثر سیتوتوکسیک قابل‌توجهی بر روی سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 و MCF-7 بود. زعفران به‌طور وسیع در مناطق شمال شرقی ایران کشت می‌شود، در سال‌های اخیر، این ادویه گرانبها در سایر مناطق ایران از جمله غرب کشور هم کشت شده است. با وجود این‌که زعفران خواص دارویی مختلفی از جمله خاصیت ضدسرطانی دارد، آیا زعفران‌های کشت داده‌شده در مناطق مختلف جغرافیایی از نظر اثر سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی با یکدیگر اختلافی دارند؟ از این رو در این پژوهش خاصیت ضدسرطانی کلاله زعفران کشت داده شده در مناطق مختلف ایران شامل گناباد، سروآباد، نجف‌آباد، لرستان و قائن بررسی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره‌های آبی هر پنج نوع زعفران دارای اثر سیتوتوکسیک بر رده سلولی MDA-MB-231 با IC_{50} بالاتر از ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر هستند. با وجود این‌که اثر همه عصاره‌های آبی بر سلول MDA-MB-231 در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت وابسته به غلظت بود، اما به جز عصاره‌های آبیِ گناباد و نجف‌آباد، اثر سایر عصاره‌ها بر سلول MDA-MB-231 وابسته به زمان نبود. اثر سیتوتوکسیک همه عصاره‌های متانولی به جز عصاره نمونه سروآباد بر سلول MDA-MB-231 بیشتر از اثر سیتوتوکسیک عصاره‌های آبی بود. اثر سیتوتوکسیک اکثر عصاره‌های متانولی به جز نمونه لرستان مانند اثر سیتوتوکسیک عصاره‌های آبی بر سلول MDA-MB-231 وابسته غلظت بود اما با افزایش زمان اثر سیتوتوکسیک به‌طور معنی‌داری بیشتر نشده بود. کمترین IC_{50} در میان عصاره‌های متانولی بر رده MDA-MB-231 مربوط

به نمونه لرستان است. MDA-MB-231، یک رده سلولی سرطان پستان با قدرت تهاجمی بالا است که معمولاً مقاومت بیشتری به ترکیبات سیتوتوکسیک دارد (Neve *et al*., 2006). همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود IC_{50} دوکسوروبیسین بر رده سلولی MDA-MB-231 بیشتر از IC_{50} این دارو بر رده MCF-7 است که بیانگر مقاومت بیشتر سلول‌های MDA-MB-231 به داروی دوکسوروبیسین است. نتایج بررسی بقای سلول‌های MCF-7 در حضور عصاره‌های آبی نشان داد که اثر سیتوتوکسیک همه عصاره‌های آبی به جز عصاره نمونه قائن، وابسته به غلظت و زمان است. عصاره آبی نمونه قائن فقط در غلظت‌های بالا وابسته به زمان بود. در میان عصاره‌های متانولی، عصاره متانولی نمونه نجف‌آباد و گناباد وابسته به غلظت و زمان بود. هر دو عصاره آبی و متانولی زعفران گناباد دارای کمترین IC_{50} بر رده سلولی MCF-7 هستند. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، IC_{50} اکثر عصاره‌های متانولی به جز نمونه سروآباد بر سلول MCF-7 کمتر از IC_{50} عصاره‌های آبی بر همین رده سلولی است که نشانگر اثر سیتوتوکسیک بالاتر عصاره‌های متانولی در مقایسه با عصاره‌های آبی است. به نظر می‌رسد با متانول ترکیبات سیتوتوکسیک بیشتری از زعفران استخراج می‌شود. Khosravi *et al*. (2013) گزارش کردند که عصاره تام زعفران قائن بر رده سلولی HT125 فاقد اثر سیتوتوکسیک است. Tavakkol-Afshari *et al*. (2008) گزارش کردند که عصاره اتانولی زعفران مشهد، بر سلول‌های HepG2 و HeLa در مدت زمان ۷۲ ساعت به‌ترتیب با IC_{50}های برابر با ۶۵۰ و ۷۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مؤثر است. Ahmadnia *et al*. (2020) گزارش کردند که عصاره آبی زعفران قائن در غلظت ۱۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سبب گرانوله‌شدن و کاهش تعداد سلول‌های سرطانی PC3 پس از ۷۲ ساعت می‌شود. گزارش‌های متعددی در ارتباط با خواص ضدسرطانی زعفران کشت شده در ایران تحت شرایط *In vitro* و *In vivo* منتشر شده است که خاستگاه جغرافیایی آن‌ها استان‌های خراسان رضوی و جنوبی است. در مطالعه‌ای گزارش شده که به‌طور کلی زعفران در استان خراسان رضوی و جنوبی با کیفیت بالایی تولید می‌گردد و توسعه کشت آن در همه مناطق استان‌های مذکور و یا ایران توصیه نمی‌گردد و ممکن است باعث افزایش تولید زعفران با کیفیت پایین گردد که هیچ ارزش اقتصادی برای ایران ندارد (Kaveh & Salari, 2018). زعفران متابولیت‌های مختلفی دارد که خاستگاه جغرافیایی یکی از عوامل مؤثر در میزان این متابولیت‌ها است. مناطق مختلف جغرافیایی از نظر ترکیب خاک، میزان و نوع املاح با یکدیگر متفاوت هستند. مقایسه محتویات متابولیکی زعفران‌های کشت‌شده در هفت منطقه استان خراسان رضوی نشان داده است که این زعفران‌ها با وجود تشابه در محتویات متابولیکی از نظر پنج نوع متابولیت شامل سافرانال، مگاستیگما ۴-۶-۸ ترین، گائین، ایکوزان و ویتامین E با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارند. سافرانال به‌عنوان یک متابولیت دارای خواص ضدسرطانی، در زعفران کاشمر کمترین مقدار و در زعفران زاوه بیشترین مقدار را داشت (Mousavi *et al*., 2021). با توجه به تفاوت وسیع شرایط اقلیمی و خاستگاه جغرافیایی زعفران‌های موردمطالعه در این پژوهش، به نظر می‌رسد این زعفران‌ها از نظر متابولیت‌های دارای خواص ضدسرطانی با یکدیگر اختلاف داشته باشند که شناسایی آن‌ها نیازمند مطالعات بیشتر است.

مقدار نسبی ترکیبات فرّار و همچنین ترکیبات محلول در آب زعفران، ابزار مناسبی برای ارزیابی کیفیت زعفران در مراکز تولیدی است. یکی از روش‌های بررسی میزان این ترکیبات در زعفران استفاده از تست استاندارد ISO3632 است که با خواندن جذب محلول آبی یک درصد زعفران خشک به‌صورت مستقیم به‌ترتیب در طول موج‌های ۲۵۷

(پیکروکروسین)، ۳۳۰ (سافرانال) و ۴۴۰ (کروسین) نانومتر با استفاده از کووت کوارتز یک سانتی‌متری توسط دستگاه اسپکتروفتومتری UV-Vis تعریف می‌شود (Giorgi *et al*., 2017). در یک پژوهش، براساس تست ISO3632 مقدار کروسین برابر ۱/۱۵±۲۲۶/۳۱، مقدار سافرانال برابر ۰/۸۷±۵۴/۱۳ و مقدار پیکروکروسین برابر ۰/۹۳ ± ۱۱۷/۲۶ در محلول آبی یک درصد، براساس ماده خشک نمونه زعفران مربوط به مشهد به‌ترتیب برابر با ۱/۱۵± ۲۲۶/۳۱، ۰/۸۷ ± ۵۴/۱۳ و ۰/۹۳ ± ۱۱۷/۲۶ گزارش شده‌است (Sharayei, 2014). در این مطالعه نیز طبق استاندارد ISO 3632 نمونه سروآباد در دسته دوم کیفیت، نمونه‌های گناباد، نجف‌آباد و کوهدشت در دسته سوم کیفیت قرار گرفته و نمونه قائن در این دسته‌بندی قرار نگرفت. زعفران قائن کمترین مقدار کروسین و پیکروکروسین را در مقایسه با سایر زعفران‌ها داشت. نتایج بررسی کیفیت زعفران‌ها در این پژوهش نشان داد که زعفران قائن کیفیت پایین‌تری نسبت به سایر زعفران‌ها دارد. در مطالعه‌ای توسط کاوه و سالاری، کیفیت زعفران‌های تولیدی در مراکز عمده تولید استان‌های خراسان رضوی و جنوبی بررسی و مقایسه شده است. زعفران قائن هم یکی از موارد موردبررسی در پژوهش فوق بوده است که درخصوصیات کیفی از نظر استاندارد ملی یا ایزوکیفیت پایین‌تری نسبت به سایر مناطق داشت (Kaveh & Salari, 2018). در این پژوهش ارتباط خاصی بین کیفیت زعفران و اثر سیتوتوکسیک آن‌ها مشاهده نشد.

عصاره‌های آبی و متانولی کلاله زعفران‌های مختلف اثر سیتوتوکسیک قابل توجهی بر رده سلولی MDA-MB-231 نداشتند. درحالی‌که عصاره‌های آبی و متانولی کلاله همان نمونه‌ها بر رده سلولی MCF-7 اثر سیتوتوکسیک داشتند. بیشترین اثر مربوط به نمونه آبی و متانولی زعفران گناباد بود و اثر سیتوتوکسیک نمونه متانولی بیشتر از نمونه آبی بود. بنابراین براساس نتایج به‌دست‌آمده، زعفران زراعی کشت شده در گناباد دارای اثر سیتوتوکسیک بیشتری بر MCF-7 است. به‌نظر می‌رسد با حلال متانول ترکیبات سیتوتوکسیک بیشتری از کلاله زعفران‌ها به‌ویژه نمونه گناباد خارج شده‌است.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر در قالب پایان‌نامه دانشجوی کارشناسی ارشد و تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه کردستان انجام شد. از دانشگاه کردستان و آزمایشگاه بیوشیمی و سلولی گروه علوم زیستی، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Abdullaev, F. & Frenkel, G. (1992). The effect of saffron on intracellular DNA, RNA and protein synthesis in malignant and non-malignant human cells. BioFactors (Oxford, England); 4(1): 43-45.

Abdullaev, F.I. (2002). Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). Experimental biology and medicine; 227(1): 20-25.

Ahmadnia, H.; Afshari, J. T.; Tabeshpour, J.; Rostami, M. Y.; Mansourian, E.; Rezayat, A. A.; *et al*. (2020). Cytotoxic effect of saffron stigma aqueous extract on human prostate cancer and mouse fibroblast cell lines. Urology Journal; 16(7): 6331-6331.

Azmir, J.; Zaidul, I.S.M.; Rahman, M.M.; Sharif, K.M.; Mohamed, A.; Sahena, F.; *et al*. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. Journal of food engineering; 117(4): 426-436.

Giorgi, A.; Pentimalli, D.; Giupponi, L; & Panseri, S. (2017). Quality traits of saffron (*Crocus sativus* L.) produced in the Italian Alps. Open Agriculture; 2(1): 52-57.

Hatziagapiou, K.; Lambrou, G. I. (2018). The protective role of *Crocus sativus* L. (Saffron) against ischemia-reperfusion injury, hyperlipidemia and atherosclerosis: nature opposing cardiovascular diseases. Current cardiology reviews; 14(4): 272-289.

Kaveh, H.; Salari, A. (2018). Study and comparison of saffron quality produced in major centers of production in Khorasan provinces. Saffron agronomy and technology; 6(2): 209-218.

Khorasanchi, Z.; Shafiee, M.; Kermanshahi, F.; Khazaei, M.; Ryzhikov, M.; Parizadeh, M.R.; el al. (2018). Crocus sativus a natural food coloring and flavoring has potent anti-tumor properties. Phytomedicine; 43: 21-27.

Khosravi, A.; Faridhoseini, R.; Jabbari Azad, F.; Yousefzadeh, H.; Moghiman, T.; Vaez Tabasi, M.; *et al*. (2013). Studying the Inhibitory Effect of Saffron Extract on Adenocarcinoma of Colon Cell Line. Medical Journal of Mashhad; 56(5): 283-288.

Kianbakht, S. (2008). A systematic review on pharmacology of saffron and its active constituents. Journal of medicinal plants; 7: 1-23.

Liu, D.D.; Ye, Y.L.; Zhang, J.; Xu, J.N.; Qian, X.D.; Zhang, Q. (2014). Distinct pro-apoptotic properties of Zhejiang saffron against human lung cancer via a caspase-8-9-3 cascade. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention; 15(15): 6075-6080.

Lu, P.; Lin, H.; Gu, Y.; Li, L.; Guo, H.; Wang, F; *et al*. (2015). Antitumor effects of crocin on human breast cancer cells. International journal of clinical and experimental medicine; 8(11): 20316.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods; 65(1-2): 55-63.

Mousavi, S. H.; Tavakkol-Afshari, J.; Brook, A.; Jafari-Anarkooli, I. (2009). Role of caspases and Bax protein in saffron-induced apoptosis in MCF-7 cells. Food and Chemical Toxicology; 47(8): 1909-1913.

Mousavi, S. M.; Khoshkam, M.; Feizi, J. (2021). Comparison of metabolic profile in different Saffron samples based on their geographical origin using gas chromatography-mass spectroscopy techniques (GC-MS). Saffron agronomy and technology; 9(2): 177-191.

Neve, R. M.; Chin, K.; Fridlyand, J.; Yeh, J.; Baehner, F. L.; Fevr, T.; el al. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. Cancer cell; 10(6): 515-527.

Shakeri, R.; Radjabian, T.; *et al*. (2018). Investigation the anticancer properties of the extracts from stigma and corm of Crocus pallasii subsp. Haussknechtiicompared with Crocus Sativus, Shahed University.

Sharayei, P.; Eynafshar, S.; Kamali, A.; Nyazmand, R. (2014). Effect of Type and Concentration of Wall Material on Microencapsulated Saffron Color Compounds by Freeze Drying. Journal of agricultural Engineering Research; 15(1): 25-38.

Siddique, H.R., H. Fatma, and M.A. Khan, Medicinal properties of saffron with special reference to cancer-a review of preclinical studies. In: Maryam Sarwat, Sajida Sumaiya. Saffron. Academic Press. 2020: p. 233-244.

Tavakkol-Afshari, J.; Brook, A. & Mousavi, S.H. (2008). Study of cytotoxic and apoptogenic properties of saffron extract in human cancer cell lines. Food and Chemical Toxicology; 46(11): 3443-3447.

Van Meerloo, J.; Kaspers, G. J. & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. Cancer cell culture, Springer: 237-245.

Verma, R.S.; Middha, D. (2010). Analysis of saffron (*Crocus sativus* L. stigma) components by LC–MS–MS. Chromatographia; 71(1): 117-123.

COPYRIGHTS
© 2022 by the authors. Lisensee PNU, Tehran, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY4.0) (http:/creativecommons.org/licenses/by/4.0)