نشریه پژوهش‌های زعفران ۲(۱۳۹۳) ۱۷۶-۱۶۷.

اثر محافظت اشعه عصاره آبی کلاله زعفران در لنفوسیت‌های خون محیطی انسان با استفاده از آزمون میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته‌ای

سمیرا صمیم‌پور [۱]، فرهنگ حداد [۲*]، پروانه ابریشم‌چی [۳] و محمد رضا قوام‌نصیری [۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلولی و ملکولی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- دانشیار ژنتیک سلولی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- دانشیار فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، دانشگاه فردوسی مشهد

۴- استاد رادیوتراپی انکولوژی، مرکز تحقیقات سرطان، گروه رادیوتراپی- انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

*- نویسنده مسئول: E-mail: haddad@um.ac.ir

صمیم‌پور، س.، حداد، ف.، ابریشم‌چی، پ.، و قوام‌نصیری، م.ر.، ۱۳۹۳. اثر محافظت اشعه عصاره آبی کلاله زعفران در لنفوسیت‌های خون محیطی انسان با استفاده از آزمون میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته‌ای. نشریه پژوهش‌های زعفران. ۲(۲): ۱۷۶-۱۶۷.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۰۳

چکیده

انسان در زندگی روزمره خود به دلایل مختلف در معرض عوامل اکسیدکننده از جمله پرتوها قرار می‌گیرد. تابش اشعه با تولید رادیکال‌های آزاد و واکنش‌گر، موجب آسیب دیدن لیپیدها، پروتیئن‌ها و اسیدهای نوکلئیک در سلول می‌شود. با این‌حال، به دلیل کارایی بسیار زیاد پرتوها در تشخیص و درمان بیماری‌ها، استفاده از آن‌ها هر روز دامنه گسترده می‌یابد. مطالعه بر روی محافظت‌کننده‌های پرتوی با منشا گیاهی امروزه اهمیت بالایی یافته است. در پژوهش حاضر، به منظور دستیابی به روشی جهت جلوگیری یا کاهش آسیب‌های کروموزومی ناشی از تابش اشعه گاما از عصاره آبی کلاله گیاه زعفران در سه غلظت ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده گردید. لنفوسیت‌های خون محیطی پس از تیمار با غلظت‌های فوق، تحت تابش ۲Gy اشعه گاما قرار گرفتند. برداشت سلول‌ها ۷۲ ساعت پس از شروع کشت، به دنبال تیمار با Cyto-b انجام شد و پس از رنگ‌آمیزی توسط گیمسای ۱۰٪، فروانی میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته‌ای محاسبه گردید. نتایج آزمون میکرونوکلئوس در سلول-های دو هسته‌ای نشان داد که عصاره زعفران قابلیت حفاظت از سلول‌ها را در مقابل اثرات مخرب اشعه گاما دارد و غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آن، به طور معنی‌داری ($p\leq0.01$)، فراوانی میکرونوکلئوس را در سلول‌های پرتو دیده کاهش داده و صدمات ناشی از اشعه را به نصف می‌رساند.

واژه‌های کلیدی: اشعه گاما، آسیب کروموزومی، تابش اشعه، عصاره آبی

مقدمه

انسان‌ها همواره در معرض منابع مختلف تابش پرتوهای یونیزان قرار دارند. برای مثال، می‌توان به پرتوگیری از منابع طبیعی نظیر رادون موجود در موادساختمانی و هوای استنشاقی، تابش‌های کیهانی، رادیونوکلئیدهای جذب شده از طریق آب، غذا یا تنفس و پرتوگیری‌های شغلی برای کارکنان نیروگاه‌های هسته‌ای، معادن ذغال سنگ و صنایع مرتبط با رادیو نوکلئیدها اشاره کرد. به علاوه، پرتونگاری تشخیصی، پزشکی هسته‌ای و پرتودرمانی نیز سهم زیادی در پرتودهی توسط منابع ساخته شده به دست بشر دارند (Rommens et al., 2001). تابش پرتوهای یونیزان به سلول‌ها و بافت‌های زنده موجب القای تنش اکسیداتیو شده که ضمن آن با افزایش سطح رادیکال‌های آزاد و گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن باعث برهم خوردن تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و عملکرد سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن و ناپایداری ژنتیکی و حتی مرگ سلول‌های آسیب‌دیده می‌شود (Riley, 1994; Morgan, 2003).

با توجه به اثرات مخرب تابش پرتوهای یونیزان، حفاظت از سیستم‌های بیولوژیک در مقابل اثرات ژنوتوکسیک آنها امری ضروری است. لذا پژوهش‌های متعددی برای طراحی داروهای حفاظتی مناسب و کاهش آثار زیان‌بار پرتو انجام شده است (Grdina et al., 2002). کاربرد کلینیکی اکثر حفاظت کننده‌ها ی شیمیایی به علت سمیت، عوارض و هزینه نسبتاً زیاد تولید آنها، چندان چندان رایج نمی‌باشد (Durakovic, 1993).

مطالعات فارماکولوژیکی اخیر، بر خواص آنتی‌اکسیدانی و محافظت اشعه‌ای گیاهان متمرکز شده و مشخص شده است که عصاره برخی از گیاهان با داشتن فعالیت آنتی‌اکسیدانی موجب تخفیف و یا خنثی شدن اثرات زیان‌بار تنش‌های اکسیداتیو می‌شوند (Hosseinimehr et al., 2009; Goel et al., 2010; Baliga et al., 2010).

زعفران از جمله گیاهانی است که در زندگی روزمره و طب سنتی کاربردهای فراوانی برای آن تعریف شده است. کاروتنوئیدهای موجود در کلاله این گیاه، با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی، مانع پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب ماکرومولکول‌های زیستی نظیر پروتئین‌ها و DNA شده (Premkumar et al., 2003; Bathaie et al., 2010)، محتوای آنتی‌اکسیدان درون سلولی نظیر گلوتاتیون را افزایش می‌دهد (Ochiai et al., 2004) و به این ترتیب، سلول‌ها را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کند (Ghadrdoost et al., 2011).

به علاوه، در سال‌های اخیر تحقیقات پزشکی و دارویی خواص درمانی متعددی نظیر خاصیت ضدسرطانی، کاهش مشکلات و بیماری‌های قلبی و عروقی، دیابت، حافظه و یادگیری، آرتریت روماتوئید و بیماری‌های کبدی را برای ترکیبات کاروتنوئیدی زعفران گزارش کرده‌اند (Kiasalari et al., 2012; Schmidt et al., 2007). گزارش‌های متعددی نیز در مورد اثر حفاظتی عصاره زعفران در برابر سمیت و خواص ژنوتوکسیک القا شده توسط عوامل شیمیایی مختلف در دسترس می‌باشند (Premkumar et al., 2001, 2003b; Schmidt et al., 2007).

پژوهش حاضر، آزمون میکرونوکلئوس را به عنوان یک تکنیک ساده و حساس برای ارزیابی آسیب‌های ژنتیکی در سطح کروموزوم انتخاب و با استفاده از آن، تأثیر محافظتی عصاره کاروتنوئیدی زعفران را در برابر آسیب‌های کروموزومی ناشی از تابش گاما، مورد ارزیابی قرار داد. امروزه آزمون میکرونوکلئوس به عنوان یک روش کارآمد جهت بررسی ناهنجاری‌های کروموزومی به کار گرفته می‌شود. آسیب‌های کروموزومی به صورت قطعات شکسته شده و یا حذف کامل یک کروموزم، در طی آنافاز تقسیم سلولی، بصورت اجزاء هسته‌ای کوچک یا میکرونوکلئوس، در سیتوپلاسم قابل مشاهده و شمارش سریع می‌باشند. فراوانی میکرونوکلئوس در کشت لنفوسیت خون محیطی بیومارکر مناسبی برای بررسی ناپایداری ژنتیکی ناشی از ژنوتوکسین‌ها است (Fenech, 2000).

امید است نتایج این بررسی، اطلاعات اولیه را برای انجام تحقیقات بیشتر و کامل تر در زمینه امکان استفاده از ترکیبات طبیعی، ساده و بدون ضرر، به عنوان روش تکمیلی برای ایجاد حفاظت در برابر پرتوها فراهم نماید.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره آبی زعفران

برای تهیه محلول پایه، پنج میلی‌گرم از پودر کلاله زعفران (نوین زعفران) به پنج میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت. پس از بی‌رنگ شدن کلاله‌های پودر شده، محتویات لوله به مدت ۱۰دقیقه با دور ۲۰۰۰rpm سانتریفوژ شدند. روشناور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تا حد خشک تبخیر گردید. پودر باقی‌مانده تا هنگام استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.
جهت تهیه غلظت‌های مورد نیاز از عصاره، پودر حاصله به محیط کشت فاقد سرم اضافه و سپس با عبور از فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرون، در زیر هود استریل گردید (Kiasalari et al., 2012).

نمونه‌گیری و کشت لنفوسیت‌های خون محیطی انسان

نمونه‌گیری از مردان داوطلب ۲۲ تا ۳۵ ساله، سالم، بدون سابقه استعمال دخانیات یا مصرف الکل، که رژیم غذایی آنان فاقد و یا دارای آنتی‌اکسیدان کمی بود، با استفاده از سرنگ هپارینه انجام شد. نمونه‌های خون کامل به لوله‌های حاوی محیط کشت RPMI 1640 (Biosera) که با ۱۵٪ سرم جنینی گاو(FBS)(Biosera) و ۱٪ PHA (Gibco) کامل شده بود، اضافه شدند. کشت در دمای ۳۷ °C و CO_2 به میزان ۵٪ انجام شد.

تعیین غلظت‌های مناسب از عصاره زعفران جهت تیمار لنفوسیت‌های خون محیطی

اساس آزمون میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته ای، بر توانایی تقسیم این سلول‌ها استوار است (Fenech, 2000). برای تعیین غلظت‌هایی از عصاره زعفران که مانع ورود لنفوسیت‌های خون محیطی به مرحله تقسیم سلولی نشوند، شش غلظت ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۲۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، ۲۴ ساعت پس از شروع کشت، بر سلول‌های مورد مطالعه اثر داده شدند. برداشت سلول‌ها ۴۸ ساعت پس از شروع تیمار، با استفاده از mg/ml ۴ وین بلاستین (Gedeon Richter) انجام شد. شمارش سلول‌های متوقف شده در متافاز در مقابل سلول‌های اینترفازی، نمایان‌گر شاخص میتوزی یا درصد سلول‌های در حال تقسیم، در حضور غلظت‌های مختلف از عصاره بود. جهت تعیین شاخص میتوزی، سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف از عصاره آبی زعفران، پس از ۱۰ دقیقه سانتریفوژ در ۱۰۰۰rpm و حذف روشناور جمع آوری شدند. در مرحله بعد، پس از تیمار سلول‌ها با محلول هیپوتونیک کلرید پتاسیم ۰/۵۶٪ به مدت ۱۰ دقیقه و شستشو با محلول تثبیت‌کننده (اسیداستیک و متانول با نسبت یک به سه) لام‌ها تهیه گردیدند. از هر تیمار، ۶-۵ لام تهیه گردید. لام‌ها پس از خشک شدن در دمای محیط، به مدت ۲۰ دقیقه در محلول گیمسای ۱۰٪ قرار گرفتند و به دنبال آن شمارش سلول‌ها جهت تعیین شاخص میتوزی انجام شد. بر اساس نتایج حاصل از این مرحله، غلظت‌هایی از عصاره زعفران که اثر بازدارنده بر تقسیم لنفوسیت‌های کشت شده نداشتند، انتخاب گردیدند.

کشت لنفوسیت‌ها جهت بررسی اثر محافظتی عصاره زعفران در برابر تابش گاما

با بررسی شاخص میتوزی لنفوسیت‌های خون محیطی کشت شده در حضور غلظت‌های مختلف از عصاره زعفران، سه غلظت ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، جهت ادامه کار انتخاب شدند. نمونه خون کامل پنج داوطلب در چهار کشت موازی استفاده شد. بیست و چهار ساعت پس از شروع کشت، غلظت‌های مورد نظر به محیط‌های کشت اضافه گردیدند. پس از یک ساعت، نمونه‌ها در فلاسک‌های T_{25}، تحت تابش ۲Gy اشعه گامای حاصل از کبالت ۶۰ (بخش رادیوتراپی بیمارستان امید مشهد) با شدت ۱Gy در ثانیه قرار گرفتند. پس از پرتودهی، محیط کشت به لوله‌های مخصوص کشت خون محیطی بازگردانده شدند.
چهار کشت موازی تهیه شده برای هر نمونه، شامل کشت‌های تیمار شده با اشعه، تیمار شده با عصاره زعفران، کشت‌های تیمار شده با اشعه و عصاره زعفران به صورت توأم و در آخر کشت‌های کنترل بودند. بیست و چهار ساعت قبل از برداشت، سیتوکالاسین B (Sigma) با غلظت نهایی شش میکروگرم در میلی لیتر، به محیط کشت اضافه گردید. برداشت سلول‌ها ۷۲ ساعت پس از شروع کشت انجام شد.

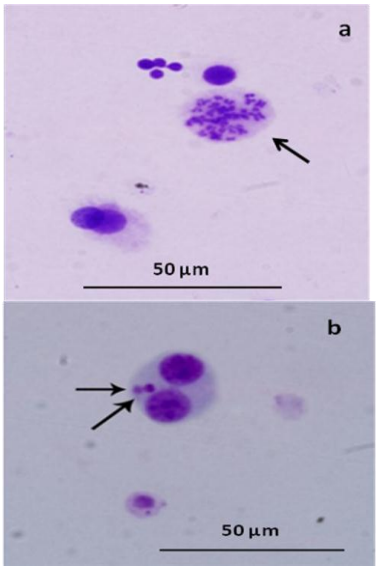
آزمون میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته‌ای

سلول‌های هر لوله کشت پس از جمع‌آوری، به مدت ۱۵ دقیقه با محلول هیپوتونیک کلرید پتاسیم ۵۶٪ تیمار گردیدند. پس از شستشو با محلول تثبیت‌کننده (محلول ۸:۱ اسید استیک به متانول) به مدت ۲۰ دقیقه، چند قطره از محلول شیری رنگ حاصله بر روی لام‌های تمیز پرتاب گردید و پس از خشک شدن در دمای محیط، با محلول گیمسای ۱۰٪ رنگ-آمیزی شدند.

شمارش سلولی

شمارش سلولی با بزرگنمایی ۱۰۰۰x انجام شد. در مرحله اول، جهت تعیین شاخص میتوزی، سلول‌های دارای کروموزوم‌های متافازی در مقابل سلول‌های اینترفازی شمارش شدند (شکل a-۱).

در مرحله دوم، جهت برآورد صدمات وارده به کروموزوم‌ها، فراوانی میکرونوکلئوس، بر اساس تعداد سلول‌های دو هسته‌ای دارای میکرونوکلئوس (شکلb-۱) در کل سلول‌های دو هسته-ای شمارش شده، محاسبه گردید.



شکل ۱- الف) لنفوسیت متافازی تیمار شده با وین بلاستین ب) لنفوسیت اشعه دیده دو هسته‌ای دارای میکرو نوکلئوس

Fig.1-a) Vinblastine treated lymphocyte in metaphase b) Irradiated binucleated lymphocyte containing micronucleus

پیکان‌ها نشان‌دهنده میکرونوکلئوس هستند.

Micronucleus is pointed.

تجزیه تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از تست آماری Tuckey در سطح معنی‌داری $p\leq0.05$ استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از بررسی اثر عصاره زعفران بر شاخص میتوزی لنفوسیت‌ها

نتایج حاصل از تأثیر شش غلظت مختلف از عصاره زعفران بر لنفوسیت‌های خون محیطی، در جدول ۱ نشان داده شده است.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که شاخص میتوزی در لنفوسیت‌های تیمار شده با دو غلظت ۲۵۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره در مقایسه با گروه کنترل، به طرز معنی‌داری کاهش می‌یابد ($p\leq$۰/۰۵)، در حالی‌که غلظت های ۵۰۰ تا ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت میتوزی لنفوسیت‌ها نداشتند. از آنجا که روش بررسی صدمات القایی اشعه مبتنی بر توانایی تقسیم سلولی می‌باشد، جهت انجام مراحل بعدی، سه غلظت ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر انتخاب شدند.

جدول ۱- مقایسه تأثیر غلظت‌های مختلف از عصاره کلاله زعفران بر میانگین شاخص میتوزی (MI) لنفوسیت‌های خون محیطی انسان

Table 1- Comparison of the effect of different doses of saffron extract on Mitotic index (MI) of Human peripheral lymphocytes

	غلظت عصاره آبی زعفران ($\mu g.\ ml^{-1}$) Doses of saffron extract ($\mu g.\ ml^{-1}$)						
	شاهد Control	250	500	1000	1200	1500	2000
شاخص میتوزی (MI) (Mean±SD)	71.4±2.6	32.8±1.4*	55.3±1.8	55.5±2.1	49.7±3.3	68.2±4.1	37.3±3.2*

* اختلاف معنی‌دار با کنترل ($P\leq0.05$)

Statistical difference with control ($P\leq0.05$)*

نتایج حاصل از بررسی اثر حفاظتی عصاره زعفران بر صدمات کروموزومی ناشی از تابش گاما

تأثیر سه غلظت ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰$\mu g.ml^{-1}$ از عصاره زعفران بر لنفوسیت‌های خون محیطی در جدول ۲ نشان داده شده است. بررسی آماری نتایج نشان داد که سه غلظت استفاده شده زعفران در این آزمایش باعث افزایش معنی‌داری در فراوانی میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته‌ای نشده است ($p\leq$۰/۰۰۱).

جدول ۲- نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت‌های مختلف از عصاره زعفران بر فراوانی میکرونوکلئوس در لنفوسیت‌های خون محیطی

Table 2- Effect of different doses of Saffron extract on frequency of micronucleus in peripheral blood lymphocytes

	غلظت عصاره آبی زعفران ($\mu g.\ ml^{-1}$) Doses of saffron extract ($\mu g.\ ml^{-1}$)			
	کنترل Control	500	1000	1500
فراوانی میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته‌ای (Mean±SD) Frequency of Mn in Binucleated Cells	0.32±0.24	0.25±0.15	0.34±0.20	0.26±0.13

نتایج بررسی اثر محافظت اشعه‌ای غلظت‌های مختلف عصاره زعفران در جدول ۳ نشان داده شده است. تیمار سلول‌های تابش دیده با دو غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره، سبب کاهش معنی‌دار در فراوانی میکرونوکلئوس در لنفوسیت‌های دو هسته‌ای در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده با عصاره زعفران گردید ($p\leq0.01$). نتایج نشان می‌دهد که غلظت ۵۰۰$\mu g.ml^{-1}$ از عصاره آبی زعفران، بیشترین تأثیر محافظتی را در برابر تابش داشته و فراوانی میکرونوکلئوس را در سلول‌های تابش دیده تقریباً به نصف می‌رساند.

نتیجه‌گیری

قرار گرفتن خواسته و یا ناخواسته در معرض تابش پرتوهای یونیزان به دلایل مختلف شغلی و درمانی و به دنبال آن صدمات احتمالی بافتی و سلولی امری اجتناب ناپذیر می‌باشد. پژوهش حاضر جهت بررسی صدمات ناشی از تابش اشعه گاما به لنفوسیت‌های خون محیطی انسان در شرایط *in vitro* و امکان کاهش این صدمات صورت پذیرفت. در این مطالعه، تابش اشعه گاما با شدت ۲Gy به لنفوسیت‌های خون محیطی، میزان میکرونوکلئوس را از مقدار پایه ۰/۳۲ درصد به ۱۲/۸۱ در صد افزایش داد. در سایر مطالعات صورت پذیرفته با شدت‌های مشابه و یا شدت‌های نزدیک به ۲Gy از این اشعه نیز فراوانی میکرونوکلئوس در سلول‌های کنترل و لنفوسیت‌های اشعه دیده در همین محدوده گزارش شده است (Hosseinimehr et al., 2009; 2011).

جدول۳- نتایج حاصل از بررسی اثر حفاظت لنفوسیت‌های خون محیطی با سه غلظت عصاره زعفران در برابر تابش ۲Gy اشعه گاما

Tables 3- Protective effects of three doses saffron extract against 2Gy Gamma irradiation

		تابش اشعه گاما(2Gy) Gamma Irradiation(2Gy)			
		غلظت عصاره آبی زعفران ($\mu g.\ ml^{-1}$) Doses of saffron extract ($\mu g.\ ml^{-1}$)			
	شاهد Control	0.0	500	1000	1500
فراوانی میکرونوکلئوس در سلول‌های دو هسته‌ای (Mean±SD) Frequency of Mn in Binucleated Cells	0.32±0.24	12.81±5.66[a]	5.35±2.77[a,b]	8.82±4.22[a,b]	9.55±3.98[a]

[a] اختلاف معنی‌دار با کنترل($p\leq0.01$). [b] اختلاف معنی‌دار با گروه غلظت ۰.۰ عصاره ($p\leq0.01$).

Statistical difference with control ($p\leq0.01$) [a], statistical difference with dose 0.0 of saffron extract ($p\leq0.01$) [b].

تابش پرتوهای یونیزان به بافت‌ها و سلول‌های زنده با تولید ROS، سبب القای شکستگی در مولکول DNA می‌شود (Morgan, 2003). شکستگی در مولکول DNA، در صورت تعمیر ناموفق به نوبه خود منجر به بوجود آمدن ناهنجاری‌های ساختاری کروموزومی از قبیل شکستگی‌های کروماتیدی و کروموزومی می‌گردد. قطعات حاصل از شکسته شدن کروموزوم‌ها، پس از پایان تقسیم هسته در مجاورت مهارکننده سیتوکینز در سیتوپلاسم سلول‌های دو هسته‌ای به شکل

هسته‌های کوچک یا میکرونوکلئوس قابل مشاهده و شمارش خواهند بود. افزایش در فراوانی میکرونوکلئوس نشان‌دهنده صدمات وارد به کروموزوم‌ها می‌باشد (Fenech, 2000; Norppa et al., 2003). بر پایه این اتفاقات، تابش اشعه یونیزان در مطالعات صورت پذیرفته همواره باعث افزایش صدمات کروموزومی در سلول‌های تحت تابش شده است (Selvan et al., 2014; Dyomina & Pylypchuk 2013; Tanaka et al., 2014).

با توجه به صدمات گسترده بافتی و سلولی ناشی از تابش اشعه یونیزان، جستجو برای یافتن مواد محافظتی در برابر آن، همواره از موضوعات مورد توجه در پزشکی هسته‌ای بوده است. محافظ‌های پرتوی با منشاء شیمیایی عمدتاً به تقلید از گلوتاتیون‌ها، دارای عامل تیول هستند، اما استفاده کلینیکی از آن‌ها به دلیل عوارض جانبی‌شان محدود می‌باشد (Grinda et al., 2006). یک محافظ اشعه مناسب باید ارزان قیمت بوده و مصرف آن اثرات سوء نداشته باشد. لذا جهت یافتن محافظت-کننده پرتوی مناسب که بتوانند جایگزین محافظت‌کننده‌های با منشاء شیمیایی شوند، توجهات به سمت مواد طبیعی و گیاهی رایج در پزشکی سنتی و یا در زندگی روزمره با خاصیت آنتی‌اکسیدانی که بتوانند با اتصال به رادیکال‌های آزاد تمایل آنها را برای اتصال به بیومولکول‌های زیستی سلول کاهش دهند، جلب شده است (Hosseinimehr et al., 2009; 2011; Goel et al., 2010; Del Bano et al., 2006).

بررسی‌ها نشان داده‌اند که از بین مواد طبیعی و با منشاء گیاهی، آنها که حاوی کارتنوئیدهایی مثل لیکوپن، βکاروتن و کروسین هستند، خاصیت محدودکننده تأثیر رادیکال‌های آزاد را دارا می‌باشند (Srinivasan et al., 2009; Abraham et al., 1993; Ghadrdoost et al., 2011). زعفران از جمله گیاهان با مصرف زیاد در زندگی روزمره است که دارای خواص درمانی در طب سنتی نیز می‌باشد. در راستای جستجو برای یافتن مواد محافظت کننده در برابر اشعه یونیزان و در ادامه کارهای قبلی(Haddad et al., 2009; Davari et al., 2012)، تأثیر محافظتی عصاره این گیاه مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج این پژوهش نشان داد که تیمار نمونه‌ها با عصاره زعفران، یک ساعت قبل از پرتودهی، فراوانی میکرونوکلئوس القاء شده با تابش گاما را در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده تا نصف کاهش می‌دهد. عصاره آبی زعفران حاوی مقادیر زیادی از کاروتنوئیدهاست، که اصلی ترین آنها کروسین[1] و کروستین[2] می‌باشند (Karimi et al., 2010). کاهش صدمات ناشی از تابش اشعه می‌تواند به دلیل توانایی محافظتی کروستین موجود در عصاره آبی زعفران باشد. کروستین با خنثی‌سازی و جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد پراکسید هیدروژن حاصله از تابش اشعه، صدمات سلولی و بافتی ناشی از این عوامل را از بین برده و یا به شدت کاهش می‌دهد (Martinez-Tome et al., 2001; Assimopoulou et al., 2005; Tseng et al., 1995).

از طرف دیگر، کارتنوئیدهای کلاله زعفران موجب تحریک تولید و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر گلوتاتیون S ترانسفراز و گلوتاتیون پراکسیداز و آنتی-اکسیدان‌های غیرآنزیمی همانند گلوتاتیون سیتوزولی که باعث کاهش سطح گونه‌های آزاداکسیژن می‌گردند، می‌شود (Wang et al., 1991a,b; Bathaie et al., 2010; Das et al., 2004).

در کنار توانایی زعفران در جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد پراکسید هیدروژن و افزایش سطح و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، پژوهش‌های متعددی نشان می‌دهند که ترکیبات کارتنوئیدی مختلف موجود در عصاره زعفران با توانایی اتصال به DNA باعث کاهش آسیب‌های ناشی از رادیکال های آزاد می‌شوند (Kanakis et al., 2007, 2009). توانایی کروستین موجود در زعفران در جلوگیری از القای صدمات به DNA توسط عوامل مختلف، نشان داده شده است. کروستین بطور بارزی سبب کاهش صدمات به DNA و سمیت سلولی ناشی از آفلاتوکسین B_1 در *in vitro* می‌شود (Wang et al., 1991a; b). با توجه به نتایج مطالعات متعددی که نقش محافظتی اشعه زعفران را نشان می‌دهند، این احتمال وجود دارد که کاهش صدمات وارده به کروموزوم‌های لنفوسیت‌های خون محیطی در این مطالعه نیز، ناشی از توانایی روبش و خنثی-سازی رادیکال‌های آزاد تولید شده در نتیجه تابش گاما، محافظت مستقیم DNA در برابر گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن و همچنین در ارتباط با افزایش فعالیت و بیان آنزیم‌های آنتی-اکسیدان، تحت تأثیر کارتنوئیدهای موجود در عصاره باشد.

1- Crocin
2- Crocetin

مطالعه حاضر بار دیگر نقش محافظتی زعفران را در برابر تابش اشعه گاما بخوبی نشان داده و با نتایج حاضر می‌توان امیدوار بود تا در مواردی که احتمال قرارگیری افراد در برابر تابش‌های یونیزان وجود دارد، از زعفران به عنوان یک محصول گیاهی با مصرف آسان خوراکی، استفاده وسیع و کاربردی صورت پذیرد.

قدردانی

این پژوهش با کمک مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد در ارتباط با طرح پژوهشی به شماره ۳/۱۵۲۱۸ به انجام رسید که از این بابت مراتب قدردانی نویسندگان مقاله اعلام می‌گردد.

منابع

Abraham, S.K., Sarma, L., Kesavan, P.C., 1993. Protective effects of chlorogenic acid, curcumin and beta-carotene against gamma-radiation-induced *in vivo* chromosomal damage. Mutat. Res. 303(3), 109-112.

Assimopoulou, A.N., Sinakos, Z., Papageorgiou, V.P., 2005. Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents. Phytother. Res. 19(11), 997-1000.

Baliga, M.S., Rao, S., 2010. Radioprotective potential of mint: a brief review. J. Cancer Res. Ther. 6(3), 255-262.

Bathaie, S.Z., Mousavi, S.Z., 2010. New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 50(8), 761-786.

Das, I., Chakrabarty, R.N., Das, S., 2004. Saffron can prevent chemically induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. Asian Pac. J. Cancer Prev. 5(1), 70-76.

Davari, H., Haddad, F., Moghimi, A., Rahimi M.F., Ghavamnasiri M.R., 2012. Study of radioprotective effect of green tea against gamma irradiation using Micronucleus assay on binucleated human lymphocytes. IJBMS. 15(5), 1026-1031.

Del Baño, M. J., Castillo, J., Benavente-García, O., Lorente, J., Martín-Gil, R., Acevedo, C., Alcaraz, M., 2006. Radioprotective-antimutagenic effects of rosemary phenolics against chromosomal damage induced in human lymphocytes by gamma-rays. J. Agric. Food Chem. 54(6), 2064-2068.

Durakovic, C.A., 1993. Radioprotective agents in medicine. Arh. Hig. Rada. Toksilokol. 44(4), 331-354.

Dyomina, E.A., Pylypchuk, O.P., 2013. Formation peculiarities of radiation-induced aberrations of chromosomes in human cells under the modifying influence of chemical agents (comparative aspects). Probl. Radiac. Med. Radiobiol. 18, 330-337.

Fenech, M., 2000. The in vitro miclronucleus technique. Mutat Res. 455(1-2), 81-95.

Ghadrdoost, B., Vafaei, A.A., Rashidy-Pour, A., Hajisoltani, R., Bandegi, A.R., Motamedi, F., Haghighi, S., Sameni, H.R., Pahlvan, S., 2011. Protective effects of saffron extract and its active constituent crocin against oxidative stress and spatial learning and memory deficits induced by chronic stress in rats. Eur. J. Pharmacol. 667(1-3), 222-229.

Goel, A., Aggarwal, B.B., 2010. Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs. Nutr. Cancer. 62(7), 919-930.

Grdina, D.J., Murley, J.S., Kataoka, Y., 2002. Radioprotectants: current status and new directions. Oncology. 63(2), 2-10.

Haddad, F., Moghimi, A., Salmani, A., Rahimi, M.F., Ghawam-Nasiri, M.R., 2009. Analysing the radioprotective effect of *Cotoneaster Nummularia* in mouse bone marrow cells Using Micronucleus assay. J. Cell Mol. Res. 1(2), 77-83.

Hosseinimehr, S.J., Ahmadi, A., Beiki, D., Habibi, E., Mahmoudzadeh, A., 2009. Protective effects of hesperidin against genotoxicity induced by (99m) Tc-MIBI in human cultured lymphocyte cells. Nucl. Med. Biol. 36(7), 863-867.

Hosseinimehr, S.J., Mahmoudzadeh, A., Ahmadi, A., Ashrafi, S.A., Shafaghati, N., Hedayati, N., 2011. The radioprotective effect of *Zataria multiflora* against genotoxicity induced by gamma irradiation in human blood lymphocytes. Cancer Biother. Radiopharm. 26(3), 325-329.

Kanakis, C.D., Tarantilis, P.A., Tajmir-Riahi, H.A., Polissiou, M.G., 2007. DNA interaction with saffron's secondary metabolites safranal, crocetin, and dimethylcrocetin. DNA Cell Biol. 26(1), 63-70.

Kanakis, C.D., Tarantilis, P.A., Pappas, C., Bariyanga, J., Tajmir-Riahi, H.A., Polissiou, M.G., 2009. An overview of structural features of DNA and RNA complexes with saffron compounds: Models and antioxidant activity. J. Photochem. Photobiol. B. 95(3), 204-212.

Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., Jaafar, H.Z., 2010. Evaluation of *Crocus sativus* L. stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity. Molecules. 15(9), 6244-56.

Kiasalari, Z., Khalili, M., Ghanbarian, L., 2012. The effect of aqueous *Crocus sativus* L. (saffron) extract on learning and memory in male streptozotocin-induced diabetic rats. Razi J. Medic. Sci. 19(95), 44-51. [in Persian With English Summary].

Martinez-Tome, M., Jiménez, A.M., Ruggieri, S., Frega, N., Strabbioli, R., Murcia, M.A., 2001. Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives. J. Food Prot. 64(9), 1412-1419.

Morgan, W.F., 2003. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: II. radiation-induced genomic instability and bystander effects *in vivo*, clastogenic factors and transgenerational effects. Radiat. Res. 159(5), 581-596.

Norppa, H., Falck, G.C., 2003. What do human micronuclei contain? Mutagenesis. 18(3), 221-233.

Ochiai, T., Ohno, S., Soeda, S., Tanaka, H., Shoyama, Y., Shimeno, H., 2004. Crocin prevents the death of rat pheochromyctoma (PC-12) cells by its antioxidant effects stronger than those of alpha-tocopherol. Neurosci. Lett. 362(1), 61-64.

Premkumar, K., Abraham, S.K., Santhiya, S.T., Gopinath, P.M., Ramesh, A., 2001. Inhibition of genotoxicity by saffron (*Crocus sativus* L.) in mice. Drug Chem. Toxicol. 24(4), 421-848.

Premkumar, K., Abraham, S.K., Santhiya, S.T., Ramesh, A., 2003. Protective effects of saffron (*Crocus sativus* L.) on genotoxins-induced oxidative stress in Swiss albino mice. Phytother. Res. 17(6), 614-617.

Riley, P.A., 1994. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. Int. J. Radiat. Biol. 65(1), 27-33.

Rommens, C., Ringeard, C., Hubert, P., 2001. Exposure of red bone marrow to ionising radiation from natural and medical sources in France. J. Radiol. Prot. 21(3), 209–219.

Schmidt, M., Betti, G., Hensel, A., 2007. Saffron in phytotherapy: pharmacology and clinical uses. Wien. Med. Wochenschr. 157(13-14), 315-319.

Selvan, G.T., Bhavani, M., Vijayalakshmi, J., Paul Solomon. F.D., Chaudhury, N.K., Venkatachalam, P., 2014. Delayed mitogenic stimulation decreases DNA damage assessed by micronucleus assay in human peripheral blood lymphocytes after (60)co irradiation. Dose Response. 12(3), 498-508.

Srinivasan, M., Devipriya, N., Kalpana, K.B., Menon, V.P., 2009. Lycopene: An antioxidant and radioprotector against gamma-radiation-induced cellular damages in cultured human lymphocytes. Toxicol. 262(1), 43-49.

Tanaka, K., Satoh, K., Kohda, A., 2014. Dose and dose-rate response of lymphocyte chromosome aberrations in mice chronically irradiated within a low-dose-rate range after age adjustment. Radiat. Prot. Dosimetry. 159(1-4), 38-45.

Tseng, T.H., Chu, C.Y., Huang, J.M., Shiow, S.J., Wang, C.J., 1995. Crocetin protects against oxidative damage in rat primary hepatocytes. Cancer Lett. 97(1), 61-67.

Wang, C.J., Shiow, S.J., Lin, J.K., 1991a. Effects of crocetin on the hepatotoxicity and hepatic DNA binding of aflatoxin B_1 in rats. Carcinogenesis. 12(3), 459-462.

Wang, C.J., Shiah, H.S., Lin, J.K., 1991b. Modulatory effect of crocetin on aflatoxin B1 cytotoxicity and DNA adduct formation in C3H10T1/2 fibroblast cell. Cancer Lett. 56(1), 1-10.

Effect of radioprotective aqueous extract for stigma saffron in peripheral human blood lymphocytes using cytokinesis-blocked Micronucleus assay

Samira Samimpor [1], Farhang Haddad[2*], Parvaneh Abrisham-chi[3] and Mohammad-Reza Ghavamnasiri[4]

1- MSc student, Deptartment of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad
2- Associate Professor, Deptartment of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad
3- Associate Professor, Deptartment of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad
4- Professor, Deptartment of Radiotherapy-Oncology, Centre for Cancer Research, Mashhad University of Medical Sciences

*- Corresponding author E-mail: haddad@um.ac.ir

Samimpor, S., Haddad, F., Abrisham-chi, P., and Ghavamnasiri, M.R., 2015. Effect of radioprotective aqueous extract for stigma saffron in peripheral human blood lymphocytes using cytokinesis-blocked Micronucleus assay. Journal of Saffron Research. 2(2): 167-176.

Submitted: 24-12-2014
Accepted: 03-03-2015

Abstract

Humans in their daily life and activities are exposed to oxidizing agents such as ionizing radiation. Ionizing radiation is able to damage the tissues, cells and their macromolecules, especially DNA. The free hydroxyl and proxyl radicals produced by ionizing irradiation have the main role in inducing these damages. However, because of its usefulness in medical activities for diagnostic and treating proposes, it is still widely being used. In this study, in order to achieve a suitable way to prevent or reduce the chromosomal damages caused by gamma radiation, three doses of aqueous extract of saffron, including 500, 1000 and 1500 $\mu g.ml^{-1}$, were used under the designed protocol. Human peripheral blood lymphocytes were treated with these three doses and then exposed to 2Gy gamma radiation. Cells were harvested seventy two hours post culture initiation following Cyto-b treatment. Cytokinesis-Blocked human lymphocytes were Giemsa stained and the frequency of Micronucleus in binucleated cells was calculated. The result of the micronucleus assay in binucleated cells showed that aqueous extract of saffron was able to protect the cells against harmful chromosomal effect of irradiation and at the doses of 500 and 1000 $\mu g.ml^{-1}$ the frequency of micronucleus in irradiated cells was decreased to half compared to non-treated cells ($p \leq 0.01$).

Keywords: Aqueous extract, Ionizing radiation, chromosomal effect