جامعة دمشق
كلية الزراعة
قسم التقانات الحيوية

تأثير الخلاصة النباتية للزعفران Crocus sativus L. في سرطان القولون في المختبر

Effect of Crocus sativus L. Extraction In Coloroctal Cancer In Vitro

اسم الطالب: ميادة منصور قريشي

اسم المشرف: بسام عيسى

الملخص

تم استخدام الاستخلاص المائي الكحولي لمياسم الزعفران *Crocus sativus* L. وزرع الخلايا السرطانية للخط الخلوي CACO-2 وحضنها مع تراكيز مختلفة من مستخلص الزعفران ومن ثم تقييم عيوشية الخلايا باستخدام مقايسة MTT وهجرة الخلايا باستخدام Wound healing assay وذلك في المختبر In Vitro
أظهرت النتائج بأن المستخلص النباتي للزعفران *Crocus sativus* L. له تأثير سام على خلايا CACO-2 وان التركيز المثبط ل 45% تقريبا 300µg/ml ، وهذا التركيز نفسه يحرض هجرة الخلايا السرطانية والسبب يكمن بما يسمى التحول الظهاري الميزانشيمي Epithelial to Mesenchymal Transition – EMT

القسم النظري

أولاً:الاستخلاص EXTRACTION : تم اخذ 1g من المياسم الجافة للزعفران .Crocus sativus L حيث تم الاستخلاص باستخدام Ethanol 80% (v/v) ثم تم حفظ المستخلص ليلة كاملة بالظلام ودرجة حرارة 4- ثم تم تكثيف المستخلص باستخدام المبخر الدوراني Rotary evaporator وأخيرا حفظ الخلاصة في أوعية مغلقة وعاتمة وبدرجة حرارة -20 c°. (Festuccia et al., 2014) .

ثانياً: الزرع الخلوي CELL CULTURE: تم زرع الخط الخلوي المشتق من سرطان الكولون CACO-2 ضمن فلاسكات زراعة خلوية في وسط (DMEM) منخفض الغلكوز مضافا اليه 10% مصل البقر الجنيني (FBS) و 200mM غلوتامين مياسر (L-glutamine) بالإضافة الى(100U/10mg) من المضادات الحيوية البنسيلين والستربتومايسين وتم حضن الفلاسكات في حاضنة CO2 بدرجة حراره 37 C° وبتركيز 5% من CO2 (Lab Tech-Lco-065 Al) المواد المستخدمة في زراعة الخلايا السرطانية من شركة Euroclone ما عدا وسط الزرع DMEM بدون أحمر الفينول من شركة Sigma(Hayward and Whitehead, 1992)

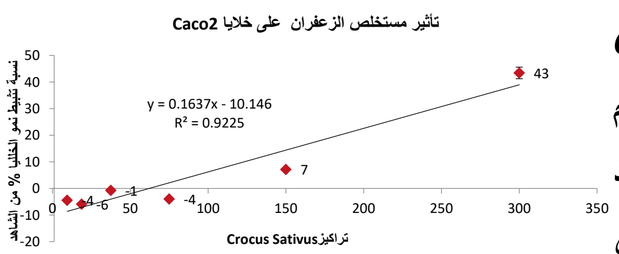
ثالثاً: دراسة تأثير الخلاصة النباتية على عيوشية الخلايا السرطانية Cell Viability:تم زرع خلايا CACO-2 في طبق زرع خلوي ذو 96 بئر بتركيز 4.7 X 105 خلية / مل تم إضافة 5 µl من التراكيز المختلفة من مستخلص الزعفران :
(300,150,75,37.5,18.75,9.37 µg/ml) التي تم إذابتها بـDMSO 200ml وكُرر كل تركيز من كل عينة 4 مرات وذلك لمدة 48 ساعة بعد ذلك تم سحب الطافي و إضافة 20µL من محلول(Sigma) MTT بتركيز 2mg/ml ثم حُضنت الخلايا لمدة 24 ساعة بعيدا عن الضوء حتى تشكلت البلورات البنفسجية اللون Formazan وأخيرا تم حل البلورات وذلك بسحب ملون MTT من الأطباق وإضافة 150 µl من مذيب DMSO حيث تركت لمدة 30 دقيقة وتمت قراءة الامتصاصية باستخدام جهاز قارئ أطباق الإليزا (sco) على طول موجة 540 نانومتر وطول موجة مرجعية 630 نانومتر

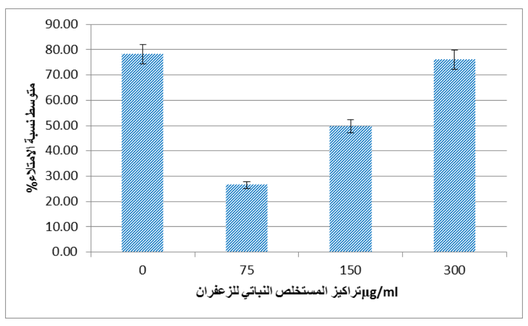
رابعاً: دراسة تأثير الخلاصة النباتية على هجرة الخلايا Cell Migration: يعتمد مبدأ المقايسة على زرع الخلايا السرطانية في طبق 24 بئر بتركيز(4.7x105 خلية /مل) ضمن وسط DMEM ثم تم تجويع الخلايا ثم احاث شق بشكل طولي بعد ذلك تم إضافة وسط الزرع إلى آبار الشاهد ووسط الزرع مع الخلاصة النباتية ذات التركيز (300.150,75 mg/ml) الى آبار العينات أخيرا حضن الطبق ضمن شروط الزرع وتم التقاط الصور للجروح في الأزمنة التالية (48 - 24 – 0 ساعة) وقياس حجم الجرح في ثلاثة مواقع عشوائية بشكل عمودي على الجرح.

النتائج والمناقشة

1- نتائج ومناقشة تأثير الخلاصة النباتية للزعفران *Crocus sativus* L. على عيوشية الخلايا السرطانية Cell Viability :

تم رسم الخط البياني الذي هو عبارة عن العلاقة بين حيوية الخلايا وسلسلة التراكيز المستخدمة من المستخلص النباتي للزعفران *Crucus sativus* L. مع المعادلة المعبرة إذ لوحظ من خلال هذه المنحنيات أن الخلاصة النباتية للزعفران *Crocus sativus* L. لديها تأثير سام على الخلايا السرطانية للخط الخلوي CACO-2 وأن التراكيز الدنيا من المستخلص لم تحدث أي تأثير (9.37,18.75,37.5,75) ثم ازداد تأثير المستخلص مع زيادة التراكيز وذلك بسبب زيادة تركيز المواد الفعالة الموجودة في المستخلص حيث أن التركيز 150 µg/ml أدى لتثبيط حوالي 10% من خلايا CACO-2 والتركيز 300µg/ml أدى لتثبيط حوالي 45% من خلايا CACO-2





- نتائج ومناقشة تأثير الخلاصة النباتية للزعفران *Crocus sativus* L. على هجرة الخلايا السرطانية Cell Migration:

بعد قياس نسبة امتلاء الشق وجد أن هذه النسبة ازدادت بزيادة التركيز المستخدم من خلاصة نبات الزعفران وقد أحدثت التراكيز (75، 150، 300) mg/ml نسبة امتلاء (76،49.7،26.5)% حُللت نتائج متوسط نسبة الامتلاء للتراكيز المستخدمة باستخدام برنامج SPSS.17 عن طريق اختبار Anova one way ، وأظهرت نتائج التحليل أن التركيز المثبط 300 µg/ml يحرض هجرة الخلايا السرطانية والسبب يعود عملية التحول الظهاري- الميزانشيمي EMT (Thiery, 2002)

المراجع

Abdullaev, F. I. (2003). Antitumor effect of saffron (Crocus sativus L. L.): overview and perspectives. Paper presented at the I International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology 650.

Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. Nature Reviews Cancer, 2(6), 442-454.

Gezici, S. (2019). Comparative anticancer activity analysis of saffron extracts and a principle component, crocetin for prevention and treatment of human malignancies. Journal of Food Science and Technology, 56(12), 5435-5443.