

دراسة تأثير المستخلص النباتي لمياسم الزعفران *Crocus sativus L.* في خلايا سرطان الكولون *CACO-2* في المختبر

³عروب المصري

²بسام سعد الله عيسى

¹ميادة قريشي

¹طالبة دراسات عليا (ماجستير) في كلية الزراعة - جامعة دمشق

²أستاذ في كلية الزراعة - جامعة دمشق

³الهيئة العامة للتقانة الحيوية قسم الحيوانات الطبية والحيوانية

الملخص:

يعد سرطان الكولون أكثر أنواع السرطان شيوعاً في جميع أنحاء العالم . يستخدم الزعفران في الطب الشعبي لعدة قرون .

عيوشية الخلايا السرطانية Cell Viability للخط الخلوي لسرطان الكولون 2 CACO-2 وسلوكيتها من خلال دراسة تأثيرها على هجرة الخلايا السرطانية Cell Migration حتى يتم الاستفادة منها .

تم استخدام الاستخلاص المائي الكحولي لمياسم الزعفران *Crocus sativus L.* وزرع الخلايا السرطانية للخط الخلوي CACO-2 وحضارتها مع تراكيز مختلفة من مستخلص الزعفران ومن ثم تقييم عيوشية الخلايا باستخدام مقاييسة MTT وهجرة الخلايا باستخدام Wound healing assay وذلك في المختبر In Vitro. نفذ البحث في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية دمشق

أظهرت النتائج بأن المستخلص النباتي للزعفران *Crocus sativus L.* له تأثير سام على خلايا CACO-2 وان التركيز المثبط لـ 45% تقريبا $300\mu\text{g}/\text{ml}$ ، وهذا التركيز نفسه يحرض هجرة الخلايا السرطانية والسبب يكمن بما يسمى التحول الظهاري الميزانشيمي Epithelial to Mesenchymal Transition – EMT

الكلمات المفتاحية: سرطان الكولون، الزعفران ، مقاييسة MTT ، مقاييسة هجرة الخلايا، التحول الظهاري الميزانشيمي

تاريخ الإبداع: 2023/4/29

تاريخ القبول: 2023/8/13



حقوق النشر: جامعة دمشق - سوريا،
يحقّظ المؤلّفون بحقوق النشر بموجب
الترخيص CC BY-NC-SA 04

Study of the effect of the plant extract of saffron stigmas (*Crocus sativus L.*) on CACO-2 colon cancer cells in vitro

Mayada Qaryshi ^{1*}

Bassam Saadallah Issa ²

Aroub Almasri ³

^{1*} Postgraduate student (Master) at the Faculty of Agriculture - Damascus University mayada.karishi92@damascusuniversity.edu.sy

²Professor at the Faculty of Agriculture - Damascus University

³National Commission for Biotechnology, Department of Medical and Animal Biology

Abstract :

Received:29 /4 /2023

Accepted: 13 /8 /2023



Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

Worldwide, colorectal cancer is the most common form of cancer. Saffron has been used in folk medicine for centuries.

In this research, the effect of saffron plant extract *Crocus sativus L.* was studied on the cell viability of colon cancer cell line CACO-2 and its behavior by studying its effect on cell migration so that it can be useful.

The hydro alcoholic extraction of *Crocus sativus L.* saffron stigmas was used, and the cancer cells of the CACO-2 cell line were cultured and incubated with different concentrations of saffron extract, and then cell viability was evaluated using the MTT assay as well as cell migration using the Wound healing assay in Vitro. The research was carried out in the "National Commission for Biotechnology" laboratories in Damascus.

The results showed that the plant extract of *Crocus sativus L.* had a toxic effect on CACO-2 cells, and the inhibitory concentration was approximately 45%, 300 μ g/ml. This same concentration stimulates the migration of cancer cells, and the reason lies in what is called Epithelial to Mesenchymal Transition – EMT.

Key Words: Colon Carcinoma , Saffron , MTT Assay , Cell Migration Assay , Mesenchymal Epithelial Transformation.

المقدمة:

يعد سرطان الكولون مساهماً أساسياً في عدد الوفيات التي يسببها السرطان بشكل عام، حيث يتم تشخيص مليون حالة جديدة سنوياً حول العالم (Hewish and Cunningham, 2011) ، حيث يُعد ثالث أنواع السرطان انتشاراً بحوالي 1.93 مليون حالة بعد سرطان الثدي 2.26 مليون حالة وسرطان الرئة 2.21 مليون حالة، وثاني سبب رئيسي من أسباب الوفاة من جراء السرطان بنسبة 935000 وفاة وذلك بحسب احصائيات منظمة الصحة العالمية (WHO) لعام 2020 world Health Organization (WHO) إن العلاجات الحديثة لهذا المرض مبنية على أساس العلاج الجراحي والعلاج الاشعاعي والعلاج الكيميائي أو جميعها معاً، لكن على الرغم من فوائد هذه العلاجات إلا أنها تمتلك تأثيرات جانبية تعود سلباً على صحة المريض، لا سيما العلاجات الكيميائية والاشعاعية التي تتسم بسميتها للأنسجة الطبيعية في الجسم أو بإحداث الطفرات الوراثية لخلاياه أو إضعاف الجهاز المناعي فيه وقد وجد أن هناك الكثير من الأعشاب التي أظهرت قدرة علاجية للأورام السرطانية (Katz, 2002).

ينتج سرطان الكولون من تراكم التغيرات الوراثية والتغيرات فوق الوراثية في الجينات الورمية والجينات الكابحة للورم في الخلايا الظهارية للكولون الأمر الذي يحولها من خلايا طبيعية إلى خلايا سرطانية غدية (Hanahan and Weinberg, 2000) adenocarcinomas كما يعد الزعفران ذو سمية انتقائية للخلايا السرطانية وله خواص مضادة للطفرات و مخلبة للجذور الحرة ومحورة للاستجابة المناعية (Nilakshi et al., 2012) (p53-) و يحرض الزعفران الموت الخلوي المبرمج للخلايا السرطانية عن طريق استهداف الخلايا التي لديها عوز (-/+) (Gutheil et al., 2011)

تحتوي مياسم الزعفران على جليكوسيد الكروسين Crocin وهو المسؤول عن اللون الأصفر ، حيث درس Samarghanian وزملاؤه أن للكروسين المستخلص مائياً من مياسم الزعفران دور في زيادة تقويض النمو الخلوي للخلايا السرطانية للخط الخلوي لسرطان الرئة A549 المعاملة به بشكل طردي مع التركيز والزمن وذلك عن طريق تحفيز مسار الموت الخلوي المبرمج لتلك الخلايا (Samarghandian et al., 2013) .

بالإضافة إلى ذلك يحتوي الزعفران على البيوكروسين Picrocrocin المسؤول عن الطعم المميز للزعفران وألهيد السافرانال Safranal وله تعود الرائحة العطرة للزعفران ، وهذه المكونات الرئيسية للزعفران لا تسهم فقط في إعطائه الخصائص المذكورة لكنها ذات خواص طبية مفيدة جداً (Anastasaki et al., 2010) (Rezaee and Hosseinzadeh, 2013)

حيث أدى استخدام السافرانال و الكروسين المستخلصين من الزعفران إلى تثبيط تعبير جين BCR-ABL في خلايا K562 بفعالية أكبر مقارنة بال Imatinib (عقار طبي يستخدم في معالجة اللوكيميا) (Geromichalos et al., 2014) بالإضافة إلى تأثير الكروستين Crocetin في خلايا سرطان عنق الرحم HeLa وخلايا سرطان المبيض SKOV3 وخلايا سرطان الرئة A549 لوحده وبالمشاركة مع ال Vincristine حيث وجد أن هناك تثبيط ملحوظ للنمو الخلوي في الخطوط الآلية الذكر يتناسب بشكل طردي مع التركيز و الزمن المستخدم للمعالجة (Zhong et al., 2011)

تحتوي العديد من الخضار و الفواكه على الكثير من المركبات المضادة للسرطان مثل : البولي فينولات ، الكاروتينات، الفلافونيدات التي أثبتت فعاليتها المقاومة للسرطانات عبر العصور في المناطق التي تستهلك و تنتج النباتات الحاوية لها كالكرز والشاي والجزر وغيرها (Dragsted et al., 1993) (Wootton and Ryan, 2011)

بالإضافة إلى أن هناك الكثير من النباتات التي تمت دراستها و تحديد فعاليتها تجاه الخلايا السرطانية، بعض هذه النباتات اعتمد في الدساتير الدوائية وأصبح على شكل مستحضرات صيدلانية، مثل نبات (Bacopa (Brahmi Solanum nigrum(Blackberry) و (monnierii (Ghosh et al., 2011) (Svoboda et al., 1966)

درس في هذا البحث نوع من أنواع الزعفران المزروع وهو الزعفران السوسيni L. *Crocus sativus* نظراً لأهميته الطبية وانتشاره الواسع في أماكن مختلفة من العالم ودراسة مدى تأثير الخلاصة على عيوشية و هجرة الخلايا السرطانية للخط الخلوي لسرطان الكولون CACO-2 المزروعة في المختبر In-Vitro لأنها تمتاز بتكلفتها القليلة مقارنة مع استخدام حيوان التجربة بشكل كامل، وأنها سريعة بإعطاء النتائج، وتنتلاع مع الاتجاه العالمي لتخفيض إجراء الاختبارات على حيوانات التجربة بشكل عام، وتتوفر إمكانية التحكم بشروط التجارب والاختبارات في المختبر، كما تحد من مخاطر التجارب المرتبطة باختبار الخلاصات النباتية لنباتات سامة على سبيل المثال، وتصلح كمرحلة أولية قبل البدء بدراسة تأثير الخلاصات وفعاليتها على الخلايا السرطانية في جسم حيوان التجربة In-Vivo ومقارنتها مع البيانات المتوفرة والنتائج الأقرب لواقع بتأثيرها على الإنسان من خلال الدراسات الخلوية للثديات أكدت احدى الدراسات أن للزعفران المستخلص من 500gr من المياسم باستخدام الايتانول المائي (v/v) 80% دور في تحريض الموت الخلوي المبرمج لخلايا سرطان الكولون عن طريق استهداف الخلايا التي لديها عوز P53 (Bajbouj et al., 2012)

كما أكدت إحدى الدراسات التأثير السام للمستخلص المائي لمياسم الزعفران على خلايا الخط الخلوي TCC 5637 والخلايا الليفية للثدي L929 (Feizzadeh et al., 2008)

وللزعفران عدة آليات يعمل بها في الزجاج In-Vitro يعمل على تثبيط تكاثر RNA و DNA بشكل انتقائي في الخلايا الورمية للخطوط الخلوية التالية: A549 ، VA-13 ، WI-38 ، A-204 and HepG2 (Abdullaev and Frenkel, 1992) كما يعمل على تثبيط انتقائي للخلايا الورمية (Abdullaev, 2003) بالمقارنة مع خلايا بشرية سليمة (Hela ، A-204 and HepG2) بالإضافة إلى تحفيز الموت الخلوي المبرمج لخلايا سرطان الثدي MCF-7 (Mousavi et al., 2009)

المواد والطريق:

أولاً: الاستخلاص :EXTRACTION

العينات النباتية المستخدمة:

تم اخذ 1g من المياسم الجافة للزعفران *Crocus sativus L.* كما يشير الشكل (1) إلى مياسم الزعفران المستخدمة

(1):

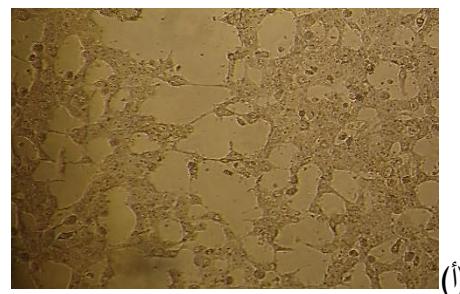
المياسم الجافة من الزعفران *Crocus sativus L.* التي تم استخدامها

تم اعتماد العمل بطريقة الاستخلاص المائي الكحولي حيث تمأخذ 1g من المياسم الجافة للزعفران المستوردة من إيران *Crocus sativus L.* ثم طحن المياسم بالجبن بشكل جاف، بعد ذلك تم اضافة 20ml من الإيثانول 80% ثم تم حفظ المستخلص ليلة كاملة بالظلام ودرجة حرارة 4-4 مع التحريك المستمر في اليوم التالي تم ترشيح كامل محلول إلى إنبوب 50ml باستخدام ورق نشاف Watman 0.5 وثم أخذ الرشاحة السابقة و تكييفها باستخدام المبخر الدواري Rotary evaporator حتى يتم التخلص من الذيب ثم تم وزن الخلاصة الناتجة وأخيرا حفظ الخلاصة في أوعية مغلقة وعائمة وبدرجة حرارة 20 °C (Festuccia et al., 2014).

ثانياً: الزرع الخلوي CELL CULTURE

تم زرع الخيط الخلوي المشتق من سرطان الكولون CACO-2 ضمن فلاسكات زراعة خلوية في وسط Dulbecco's DMEM (Modified Eagle Medium) منخفض الغلوكوز مع ملون أحمر الفينول مضافاً إليه 10% مصل البقر الجنيني (FBS) و 200mM غلوتامين مياسر (L-glutamine) بالإضافة إلى (100U/10mg) من المضادات الحيوية البنسلين والستريوتومايسين وتم حضن الفلاسكات في حاضنة CO_2 بدرجة حرارة 37 °C وبتركيز 5% من CO_2 (Lab Tech-Lco-065 Al) المواد المستخدمة في زراعة الخلايا السرطانية من شركة Euroclone ما عدا وسط الزرع DMEM بدون أحمر الفينول من شركة Hayward and Sigma (Whitehead, 1992)

(ب)



الشكل(2): (أ) خلايا CACO-2 في بداية الزرع (ب) خلايا CACO-2 حققت نسبة امتلاء أكثر من 90%

ثالثاً: دراسة تأثير الخلاصة النباتية على عيوشية الخلايا السرطانية Cell Viability

تمت مقاييسة حيوية الخلايا باتباع طريقة الفورمازان Formazan والتعليمات المرفقة لعينة الـ MTT [Dimethylthiazol 2,5-diphenyltetrazolium bromide-4,5-(3-yl)-2-] (Langdon, 2004)

وبعد مبدأ المقايسة على إرجاع محلول الـ MTT من خلال الأنزيمات المفرزة من مقدرات الخلايا السرطانية الحية إلى بلورات فورمازان Formazan كما يلي :

تم زرع خلايا CACO-2 في طبق زرع خلوي ذو $96 \text{ بئر بتركيز } 4.7 \times 10^5 \text{ خلية / مل}$ لمدة 24 ساعة ثم سحب الطافي من جميع أبار وأضيف $100 \mu\text{L}$ من وسط زرع جديد 5% FBS و $95 \mu\text{L}$ من وسط الزرع الجديد إلى آبار العينات، تم إضافة $1 \mu\text{l}$ من التراكيز المختلفة من مستخلص الزعفران :

(300,150,75,37.5,18.75,9.37 $\mu\text{g/ml}$) التي تم إذابتها بـ

200ml DMSO (Dimethyl Sulfoxide) وكرر كل تركيز من كل عينة 4 مرات وذلك لمدة 48 ساعة،

بعد ذلك تم سحب الطافي و إضافة $20 \mu\text{L}$ من محلول MTT (Sigma) بتركيز 2mg/ml وذلك بحل مسحوق الملون في وسط الزرع (Dulbecco's Modified Eagle Medium) DMEM بدون أحمر الفينول ثم رُشح باستخدام مرشحات $0.22 \mu\text{m}$ (Millipore) ثم حضنت الخلايا لمدة 24 ساعة بعيداً عن الضوء بحيث تغطي بورق الألمنيوم حتى تشكلت البلورات البنفسجية اللون Formazan وأخيراً تم حل البلورات وذلك بسحب ملون MTT من الأطباق وإضافة $150 \mu\text{l}$ من مذيب DMSO إلى كل حبة وذلك لإذابة بلورات الفورمازان المتشكلة، 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

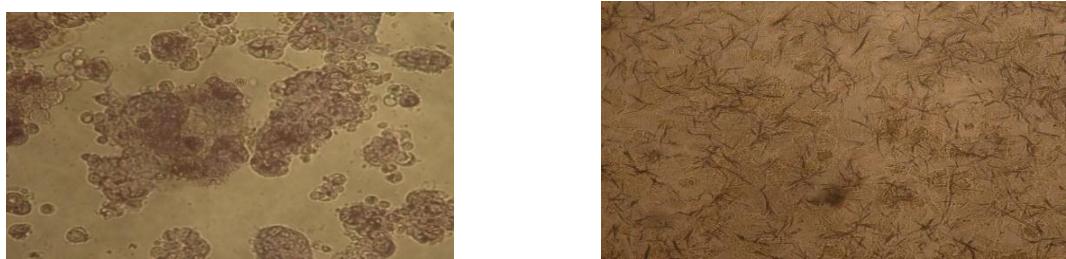
يعتمد مبدأ المقايسة على إحداث شق بشكل خطى في المستعمرات السرطانية وتسمى طريقة التئام الجرح Wound healing assay ويلاحظ بعد 48 - 24 ساعة أن الشق قد عاد وامتلاً بالخلايا من جديد وهذا دليل على هجرة الخلايا وانتقالها وذلك وفق الخطوات التالية:

تم زرع الخلايا السرطانية في طبق 24 بئر بتركيز $4.7 \times 10^5 \text{ خلية / مل}$ (يحتوى 10% FBS) حتى تغطي 90% من المساحة ثم تم تجوية الخلايا (حرمانها من المصل serum starved) لمدة 24 ساعة وذلك ضمن وسط خال من المصل ثم تم غسل الخلايا بـ 1X PBS مع التحريك ثم سحب المحلول و التخلص منه بعد ذلك تم إضافة $500 \mu\text{l}$ من وسط الزرع إلى آبار الشاهد control (بدون تطبيق الخلاصة النباتية) و $490 \mu\text{l}$ من وسط الزرع DMEM (يحتوى 10% FBS 10% Fetal Bovine Serum FBS) إلى آبار العينات مع $10 \mu\text{L}$ من الخلاصة النباتية ذات التركيز (300,150,75 mg/ml) أخيراً حضن الطبق ضمن شروط الزرع (درجة حرارة 37°C وتركيز 5% CO_2) وتم التقاط الصور للجرح في الأزمنة التالية (0 - 24 - 48 ساعة) وقياس حجم الجرح في ثلاثة مواقع عشوائية بشكل عمودي على الجرح.

خامساً: النتائج

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

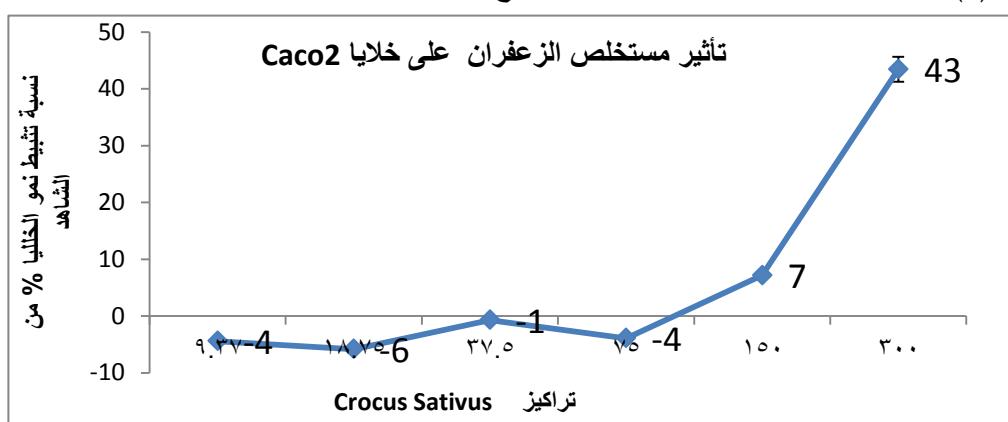
أظهرت التجارب التي طبقت على الخلايا السرطانية للخط الخلوي CACO-2 باستخدام مجموعة من التراكيز وهي : (300,150,75,37.5,18.75,9.37 $\mu\text{g/ml}$) من المستخلص النباتي للزعفران *Crocus sativus L.* تأثير هذا المستخلص على عيوشية هذه الخلايا التي تم حسابها باستخدام ملون MTT حيث تشكلت البلورات البنفسجية اللون Formazan الناتجة عن تفاعل الملون مع أنزيمات الديهايدروجيناز في الميتوكوندريا



(ب)

(أ)

الشكل(3): (أ) بلورات الفورمازان الارجوانية غير المنحلة المتشكلة في الآبار (ب) تلون خلايا CACO-2 باللون البنفسجي عند إضافة MTT تم رسم الخط البياني الذي هو عبارة عن العلاقة بين حيوية الخلايا وسلسلة التراكيز المستخدمة من المستخلص النباتي للزعفران *Crocus sativus L.* مع المعادلة المعبرة عنها الشكل(4)، 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 المكون الفعال الموجود في المستخلص حيث أن التراكيز 150 $\mu\text{g/ml}$ أدى لتبطط حوالي 10% من خلايا CACO-2 والتركيز 300 $\mu\text{g/ml}$ أدى لتبطط حوالي 45% من خلايا CACO-2. كما تبين من الشكل (5) أن الارتباط Correlation كان قوياً جداً وبلغ مقداراً يعادل $R=0.960$ ويأخذ شكل خطياً في العلاقة بين



نسبة تثبيط الخلايا وسلسلة تراكيز الخلاصة النباتية للزعفران *Crocus sativus L.* المطبقة عليها

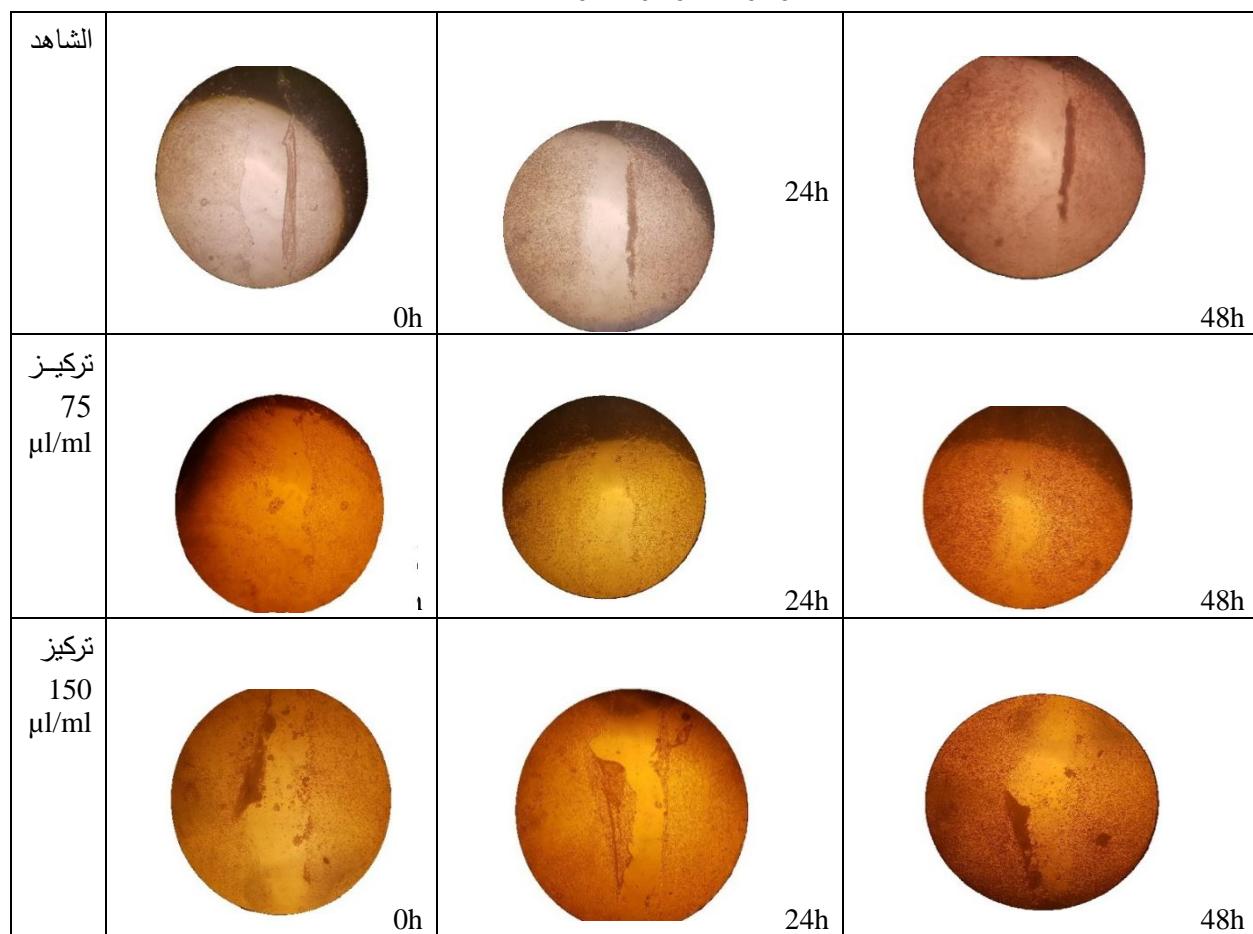
الشكل(4): تأثير التراكيز المختلفة للخلاصة النباتية للزعفران *Crocus sativus L.* في عيوشية الخلايا السرطانية للخط الخلوي CACO-2 و معامل الارتباط

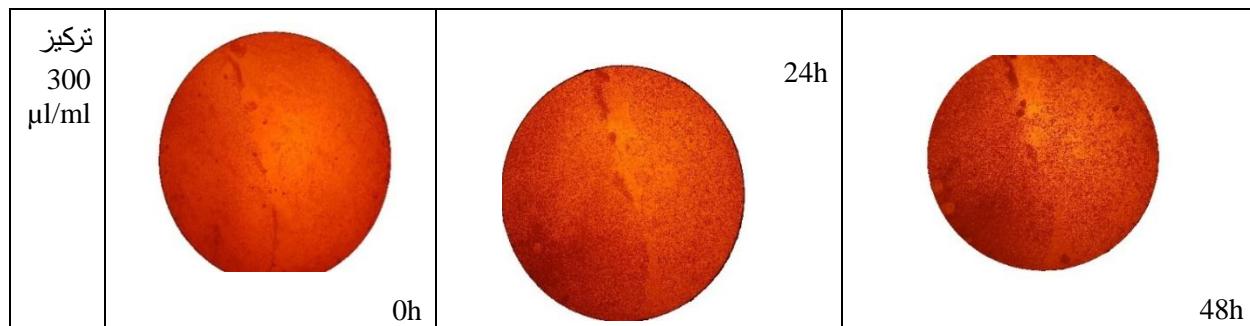
الشكل(5) : تأثير التراكيز المختلفة للخلاصة النباتية للزعفران *Crocus sativus L.* في خلايا CACO-2 والعلاقة بين النسبة المئوية لتنشيط نمو الخلايا و تراكيز الخلاصة

وتم اختيار ثالث تراكيز من منحنى السمية الخلوية لمستخلص النباتي للزعفران *Crocus sativus L.* وهي (300.150,75 mg/ml) وذلك لدراسة تأثيرها على سلوكية هذه الخلايا.

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

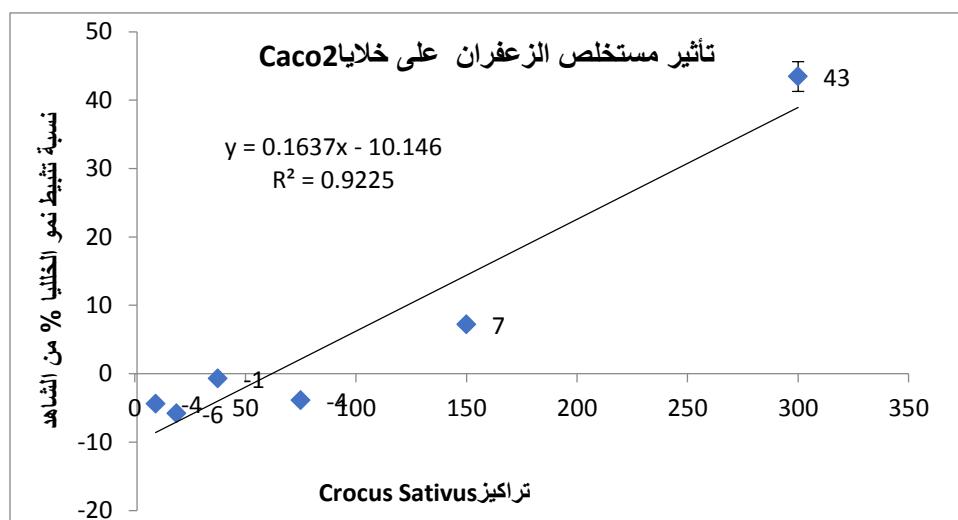
تم قياس المسافة بين حافتي الشق (μm) بثلاث مواضع مختلفة بكل حجرة من الحجرات الطبق ذو 24 بئر بعد تطبيق تراكيز مختلفة من الخلاصة النباتية للزعفران *Crocus sativus L.* خلال 24 و 48 ساعة و يبين الجدول (1) امتلاء الشق في خلايا سرطان الكولون CACO-2 نتيجة تطبيق الخلاصة النباتية لنبات الزعفران بالتراكيز المدروسة.





الجدول (1) : يمثل تجربة مقايسة هجرة الخلايا باستخدام طريقة Wound healing assay

بعد قياس نسبة املاء الثقب وجد أن هذه النسبة ازدادت بزيادة التركيز المستخدم من خلاصة نبات الزعفران وقد أحدثت التراكيز بعد 48 ساعة املاء الثقب (6).
نسبة املاء (26.5, 49.7, 76 mg/ml) عالتوالي التراكيز (75, 150, 300).

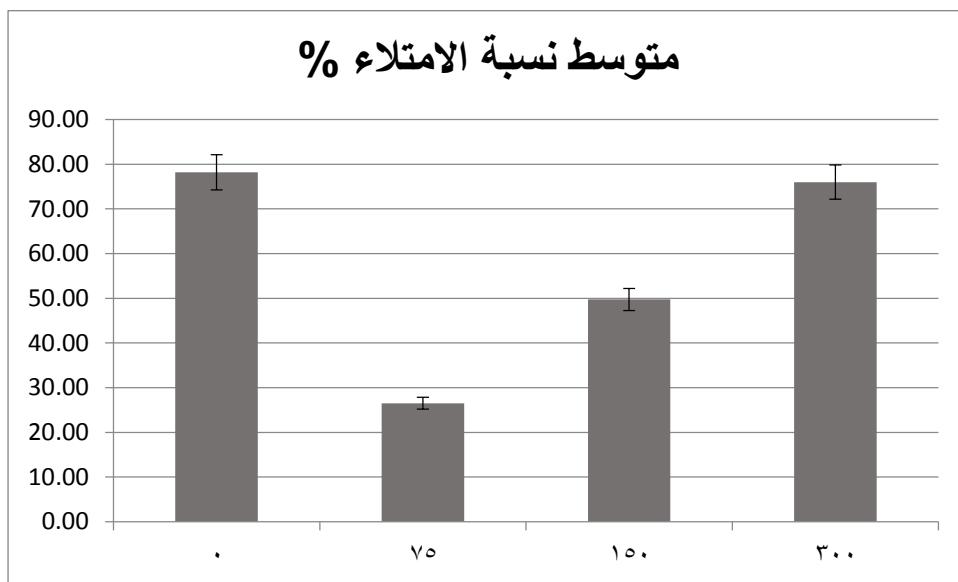


الشكل (6): تأثير تراكيز المستخلص النباتي للزعفران *Crocus sativus L.* على هجرة الخلايا السرطانية CACO-2 خلال الزمن 24 و 48 ساعة حيث أن النتائج عبارة عن المتوسط \pm الانحراف المعياري mean \pm SD جدول (2) حُللت نتائج متوسط نسبة الاملاء للتراكيز المستخدمة باستخدام برنامج SPSS.17 عن طريق اختبار Anova one way و أظهرت نتائج التحليل وجود فروق معنوية بين التراكيز المختلفة حيث كانت قيمة $P < 0.05$ عند قيمة F محسوبة = 12.605 وانحراف معياري كلي 30.1.

وباستخدام اختبار L.S.D حُددت أفضل المعاملات حيث كانت القيمة 22.4 ، وبالتالي ظهر أن متوسط نسبة الاملاء عند التراكيز $75\mu\text{g}/\text{ml}$ كان الأقل معنويًا بمتوسط قدره 26.5 ثم $150\mu\text{g}/\text{ml}$ بمتوسط قدره 49.7 بينما كان التراكيز $300\mu\text{g}/\text{ml}$ غير معنوي مع الشاهد بمتوسط قدره 76.

الجدول(2):قيم المسافة بين حافتي الشق (متوسط ثلات مواضع) بعد تطبيق تراكيز مختلفة من المستخلص النباتي للزعفران *Crocus sativus L.* خلال 24 و 48 ساعة حيث أن النتائج عبارة عن المتوسط \pm الانحراف المعياري mean \pm SD والأحرف في الجدول تمثل الفروق المعنوية بين المتوسطات :

متوسط نسبة الامتلاء %			
75 μ g/ml	150 μ g/ml	300 μ g/ml	Control
26.52 ^a \pm 16.59	49.73 ^b \pm 19.9	76 ^c \pm 25.3	78.19 ^c \pm 29.1



سادساً: المناقشة:

لواحظ من خلال النتائج أن المستخلص المائي الكحولي للزعفران *Crocus sativus L.* يملك تأثيراً ساماً على الخلايا السرطانية للخط الخلوي CACO-2 حيث كان التركيز المثبط ل 45% من الخلايا هو 300 μ g/ml وهذا يتوافق مع الدراسات المرجعية للخطوط السرطانية الأخرى (Premkumar and Ramesh, 2010)

يلاحظ أن التركيزات العالية من الزعفران آمنة بالنسبة لبعض الخطوط السرطانية مثل: A549, L929, HCT116, TCC 5637 ولها تأثيرات مؤيدة للاستدرومات في خطوط أخرى (Feizzadeh et al., 2008) ، (Samarghandian et al., 2013) ، (Bajbouj et al., 2012)

يلاحظ بأن المستخلص النباتي للزعفران *Crocus sativus L.* مصدر غني بالمواد المثبطة لنمو الخلايا السرطانية حيث يبدي فعالية مضادة للسرطان بقيمة 300 μ g/ml وهي أقل من القيمة الوسطية 260-950 μ g/ml crocin (D'Alessandro et al., 2013)

من خلال البحث في الدراسات المرجعية لم يتم العثور على أية دراسة تم فيها دراسة تأثير المستخلص النباتي للزعفران *Crocus sativus L.* على هجرة الخلايا السرطانية وهذا يقود إلى أهمية هذه الدراسة .

من خلال مقارنة نتائج تأثير المستخلص النباتي للزعفران *Crocus sativus L.* على عيوشية و هجرة خلايا الخط الخلوي CACO-2 تبين أن التركيز المثبط 300 μ g/ml يحرض هجرة الخلايا السرطانية والسبب يكمن فيما يلي :

▪ معظم أنواع الأورام السرطانية لدى البالغين هي سرطانات ظهارية تنشأ عن نمو غير طبيعي للخلايا الظهارية التي تبطن الأسطح وتجاويف الأعضاء مثل الثدي والقولون والكبد والرئتين والخلايا الظهارية هي خلايا مكتملة التمايز وثابتة في مكانها لا تنتقل في حين تتمكن الخلايا المتوسطة من الهجرة بسهولة وفي الجنين هناك عملية تدعى عملية التحول الظهاري - الميزانشيمي EMT تسمح للخلايا الظهارية باكتساب خصائص الخلايا المتوسطة وأن تنتقل مواقعها لتعود بعد ذلك إلى النمط الظهاري بواسطة عملية التحول الميزانشيمي - الظهاري MET لتنابع تشكيل البنى الجسدية . تشارك عملية التحول الظهاري - الميزانشيمي أيضا في انتقال الورم وهذه العملية تسمح للخلايا السرطانية الظهارية - مكتملة التمايز والثابتة في موضعها- باكتساب خصائص الخلايا المتوسطة الأكثر قدرة على الغزو (Gunasinghe et al., 2012)

▪ ترتبط عملية التحول الظهاري- الميزانشيمي EMT بالأحداث داخل الخلية بما في ذلك التطور الجنيني والثام الجروح وتطور الأعضاء وتطور السرطان (Thiery, 2002)،

▪ يشارك في التبديل بين الطرازين الظاهريين في علم الأمراض البشري المصفوفات خارج الخلية ECMs (شبكات متعددة المكونات تحيط بالخلايا في الأنسجة هذه الشبكات إلزامية لبقاء الخلية ونموها وتمايزها وكذلك تنظيم الأنسجة) في الواقع يمكن للبنية الأساسية ECM بالإضافة إلى دورها الداعم، معالجة وتقديم عدد كبير من الإشارات إلى الخلايا، والتي تنظم سلوكها في النهاية، الأهم من ذلك أن الإشارات المشتقة من ECM متورطة بشكل حاسم في عملية EMT أثناء تكوين الأورام (Tzanakakis et al., 2018).

▪ بالإضافة إلى ذلك أثناء غزو الخلايا السرطانية والورم الخبيث تقوم الخلايا بهضم جزيئات ECM عن طريق تخليق وتوظيف مجموعة كبيرة ومتعددة من الأنزيمات، من بينها تعد مصفوفة البروتينات المعدنية MMPs هي المساهم الرئيسي في تدهور ECM بواسطة الخلايا السرطانية (Cui et al., 2017).

▪ أثناء الحياة الجنينية يتم إنتاج MMPs بشكل أساسي وهي مهمة لتكوين الأعضاء في الأنسجة البالغة يتم التعبير عن MMPs عند مستويات منخفضة إلى غير قابلة للاكتشاف حيث يتم تنظيمها فقط أثناء إعادة تشكيل الأنسجة الفيزيولوجية أو في العمليات التفاعلية مثل الالتهاب واصلاح الجروح (Vandooren et al., 2013 ، ، Itoh, 2015).

ومن هنا نستنتج:

- أنه من الممكن أن الجرح المحدث ووجود خلايا المعطلة p53 حرض الخلايا السرطانية على فرط التعبير عن MMPs وخاصة MMP-9 (أحد بروتينات مصفوفة البروتينات المعدنية وهو مؤشر تشخيصي فعال لمرضى سرطان القولون) الأمر الذي أدى إلى تدهور ECM وبالتالي المساهمة في عملية التحول EMT (Lee et al., 2018 ، ، Powell et al., 2014).

وإذا تم توثيق أن الخلايا التي تخضع لعملية التحول الظهاري - الميزانشيمي EMT تتحمل المؤثرات الخارجية بشكل أفضل مما يؤدي إلى إظهار هذه الخلايا لصفة المقاومة للعلاج Q1 الكيميائي والأشعاعي وبالتالي يمكن أن الخلايا اكتسبت صفة المقاومة للمستخلص المطبق (Thiery et al., 2009).

التمويل: هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم التمويل (501100020595)

References:

1. 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.
2. 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.
3. Anastasaki, E. G., Kanakis, C. D., Pappas, C., Maggi, L., Zalacain, A., Carmona, M., . . . Polissiou, M. G. (2010). Quantification of crocetin esters in saffron (*Crocus sativus L.* L.) using Raman spectroscopy and chemometrics. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(10), 6011-6017.
4. Bajbouj, K., Schulze-Luehrmann, J., Diermeier, S., Amin, A., & Schneider-Stock, R. (2012). The anticancer effect of saffron in two p53 isogenic colorectal cancer cell lines. *BMC complementary and alternative medicine*, 12, 1-9.
5. Cui, N., Hu, M., & Khalil, R. A. (2017). Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. *Progress in molecular biology and translational science*, 147, 1-73.
6. D'Alessandro, A. M., Mancini, A., Lizzi, A. R., De Simone, A., Marroccella, C. E., Gravina, G. L., . . . Festuccia, C. (2013). *Crocus sativus L.* stigma extract and its major constituent crocin possess significant antiproliferative properties against human prostate cancer. *Nutrition and cancer*, 65(6), 930-942.
7. Dragsted, L. O., Strube, M., & Larsen, J. (1993). Cancer-Protective Factors in Fruits and Vegetables: Biochemical and Biological Background. *Pharmacology & toxicology*, 72, 116-135.
8. Feizzadeh, B., Afshari, J. T., Rakhshandeh, H., Rahimi, A., Brook, A., & Doosti, H. (2008). Cytotoxic effect of saffron stigma aqueous extract on human transitional cell carcinoma and mouse fibroblast. *Urology journal*, 5(3), 161-167.
9. Festuccia, C., Mancini, A., Gravina, G. L., Scarsella, L., Llorens, S., Alonso, G. L., . . . Lenzi, A. (2014). Antitumor effects of saffron-derived carotenoids in prostate cancer cell models. *BioMed research international*, 2014.
10. Gutheil, W., Reed, G., Ray, A., Anant, S., & Dhar, A. (2012). Crocetin: an agent derived from saffron for prevention and therapy for cancer. *Current pharmaceutical biotechnology*, 13(1), 173-179.
11. Geromichalos, G. D., Papadopoulos, T., Sahpazidou, D., & Sinakos, Z. (2014). Safranal, a *Crocus sativus L.* L constituent suppresses the growth of K-562 cells of chronic myelogenous leukemia. *In silico and in vitro study*. *Food and chemical toxicology*, 74, 45-50.
12. Ghosh, T., Maity, T. K., & Singh, J. (2011). Evaluation of antitumor activity of stigmasterol, a constituent isolated from *Bacopa monnieri* Linn aerial parts against Ehrlich Ascites Carcinoma in mice. *Oriental Pharmacy & Experimental Medicine*, 11, 41-49.
13. Gunasinghe, N. D., Wells, A., Thompson, E. W., & Hugo, H. J. (2012). Mesenchymal–epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31, 469-478.
14. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.
15. Hayward, I. P., & Whitehead, R. H. (1992). Patterns of growth and differentiation in the colon carcinoma cell line LIM 1863. *International journal of cancer*, 50(5), 752-759.
16. Hewish, M., & Cunningham, D. (2011). First-line treatment of advanced colorectal cancer. *The Lancet*, 377(9783), 2060-2062.
17. Itoh, Y. (2015). Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biology*, 44, 207-223.

18. Katz, A. E. (2002). Flavonoid and botanical approaches to prostate health. *The Journal of Alternative & Complementary Medicine*, 8(6), 813-821.
19. Langdon, S. P. (2004). Cell culture contamination: an overview. *Cancer cell culture: methods and protocols*, 309-317.
20. Lee, S. Y., Ju, M. K., Jeon, H. M., Lee, Y. J., Kim, C. H., Park, H. G., . . . Kang, H. S. (2018). Oncogenic metabolism acts as a prerequisite step for induction of cancer metastasis and cancer stem cell phenotype. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.
21. 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.
22. Nilakshi, N., Gadiya, R., Abhyankar, M., & Champalal, K. D. (2011). Detailed profile of *Crocus sativus*. *Int J Pharma Bio Sciences*, 2(1), 530-540.
23. Powell, E., Piwnica-Worms, D., & Piwnica-Worms, H. (2014). Contribution of p53 to Metastasis p53 and Metastasis. *Cancer discovery*, 4(4), 405-414.
24. Premkumar, K., & Ramesh, A. (2010). Anticancer, antimutagenic and antioxidant potential of saffron: an overview of current awareness and future perspectives. *Functional plant science and technology*, 4, 91-97.
25. Rezaee, R., & Hosseinzadeh, H. (2013). Safranal: from an aromatic natural product to a rewarding pharmacological agent. *Iranian journal of basic medical sciences*, 16(1), 12.
26. Samarghandian, S., Borji, A., Farahmand, S. K., Afshari, R., & Davoodi, S. (2013). *Crocus sativus L.* (saffron) stigma aqueous extract induces apoptosis in alveolar human lung cancer cells through caspase-dependent pathways activation. *BioMed research international*, 2013.
27. Svoboda, G. H., Poore, G. A., Simpson, P. J., & Boder, G. B. (1966). Alkaloids of *Acronychia Baueri* Schott I: Isolation of the alkaloids and a study of the antitumor and other biological properties of acronycine. *Journal of pharmaceutical sciences*, 55(8), 758-768.
28. Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews cancer*, 2(6), 442-454.
29. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *cell*, 139(5), 871-890.
30. Tzanakakis, G., Kavasi, R. M., Voudouri, K., Berdiaki, A., Spyridaki, I., Tsatsakis, A., & Nikitovic, D. (2018). Role of the extracellular matrix in cancer-associated epithelial to mesenchymal transition phenomenon. *Developmental Dynamics*, 247(3), 368-381.
31. Vandooren, J., Van den Steen, P. E., & Opdenakker, G. (2013). Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 48(3), 222-272.
32. Wootton-Beard, P. C., & Ryan, L. (2011). Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Research International*, 44(10), 3135-3148.
33. Zhong, Y.-j., Shi, F., Zheng, X.-l., Wang, Q., Yang, L., Sun, H., . . . Qin, Y. (2011). Crocetin induces cytotoxicity and enhances vincristine-induced cancer cell death via p53-dependent and-independent mechanisms. *Acta Pharmacologica Sinica*, 32(12), 1529-1536.