

خالص سازی کاروتنوئیدها و منوترپن آلدئیدهای زعفران ایران و بررسی اثر هریک بر ساختار DNA، هیستون H1 و کمپلکس H1-DNA

سیده زهرا بطحائی^۱، محبوبه اشرفی^۱، اعظم بوالحسنی^۲، بتول اعتمادی کیا^۳ و علی اکبر موسوی موحدی^۴

۱- دانشیار بیوشیمی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، تهران

c-mail: bathai_z@modares.ac.ir

۲- کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، ۳- کارشناس، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس.

۴- استاد، مرکز تحقیقات بیوشیمی - بیوفیزیک، دانشگاه تهران.

چکیده

زعفران خوراکی (*Crocus Sativus L.*) دارای خواص بیولوژیکی متفاوتی از جمله خاصیت ضدسرطانی است. در این تحقیق، علاوه بر تخلیص مواد مؤثر زعفران، دو سازوکار عمده ملکولی در ارتباط با این خاصیت زعفران یعنی اثر بر DNA، هیستون و کمپلکس H1-DNA مورد بررسی قرار گرفت. کاروتنوئیدها (کروسین، کروسیتین و دی متیل کروسیتین) و آلدئیدهای منوترپن (پیکروکروسین و سافرانال) موجود در زعفران ایران به عنوان اجزاء اصلی، توسط روش های مختلفی جداسازی و خالص سازی شد. نتایج TLC و HPLC نشان داد که کروسین و پیکروکروسین موجود در زعفران ایران به ترتیب از ۴ و ۳ زیرنوع تشکیل شده است. بنابراین، جزء اصلی و عمده کروسین ها و پیکروکروسین ها تخلیص شد و میان کنش هیستون H1 و DNA نه تنها با عضاره زعفران، بلکه با هریک از پنج جزء تخلیص شده از زعفران توسط روش های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی میان کنش زعفران و اجزاء آن با DNA مشاهده شد که اتصال تمام این لیگاندها از طریق اتصال به شیار کوچک صورت می گیرد و منجر به القاء تغییرات ساختاری در DNA می شود. همچنین در بررسی اثر این لیگاندها بر ساختار هیستون H1 مشاهده شد که این لیگاندها باعث فرونشانی نشر فلورسانس هیستون می شوند. با رسم نمودار اسکاجارد براساس فرونشانی نشر، مولفه های پیوندی n و K محاسبه گردید (n و K به ترتیب برابر ۰/۵۴ و 2×10^{-6} بدست آمد). طیف دورنگ نمایی دورانی (CD) نشان داد که این ترکیب های در غلظت کم با DNA میان کنش دارند که موجب تغییر ساختار از B-DNA به C-DNA می شود، هر چند که در غلظت های بالاتر، تغییر ساختاری بیشتری القاء می گردد، یعنی رج بندی بازها از بین می رود. همچنین نتایج حاصل از بررسی میان کنش H1-DNA در حضور و عدم حضور هر کدام از لیگاندهای فوق نشان داد که در حضور این اجزاء، میان کنش H1 با DNA حدود ۵ تا ۲۲ درصد کاهش یافت که بیشترین میزان کاهش، مربوط به سافرانال بود.

واژه های کلیدی: کروسین، کروسیتین، دی متیل کروسیتین، پیکروکروسین، سافرانال، هیستون H1، DNA، میان کنش.

مقدمه

برای جمع آوری یک کیلو زعفران، باید کلاله های بیش از ۱۵۰۰۰۰ گل با دقت و دانه دانه جدا شود. یکی از دلایل گرانی زعفران نیز همین وقتی است که باید صرف آماده سازی، بسته بندی و نگهداری آن بشود (Fernandez, 2004).

زعفران یا طلای قرمز گرانبهاترین چاشنی گیاهی دنیاست (تقریباً هر کیلو ۵۰۰ دلار) که ارزش آن به کلاله و خامه خشک شده گل زعفران خوراکی (*Crocus sativus L.*) مربوط است (شکل ۱). هر کلاله زعفران ۲ میلی گرم وزن و هر گل زعفران سه کلاله دارد. بنابراین

خالص‌سازی کاروتنوئیدها و منوترپن‌آلدئیدهای زعفران ایران و بررسی اثر هریک بر ساختار DNA، هستون H1 و کمپلکس HI-DNA می‌کنند. تولیدات اسپانیا که در حال حاضر بهترین و شاید اولین صادر کننده این گیاه گرانبهاست در سال بین ۰/۳ تا ۰/۵ تن در سال است (Fernandez, 2004).

تجزیه و تحلیل شیمیائی عصاره آبی کلاله زعفران حضور دو ترکیب عمده شیمیایی را نشان داده است (شکل ۲).

الف) کاروتنوئیدها

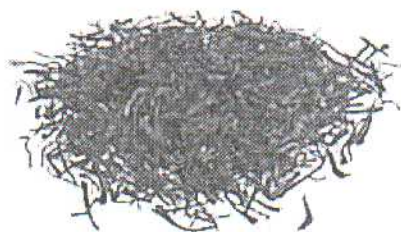
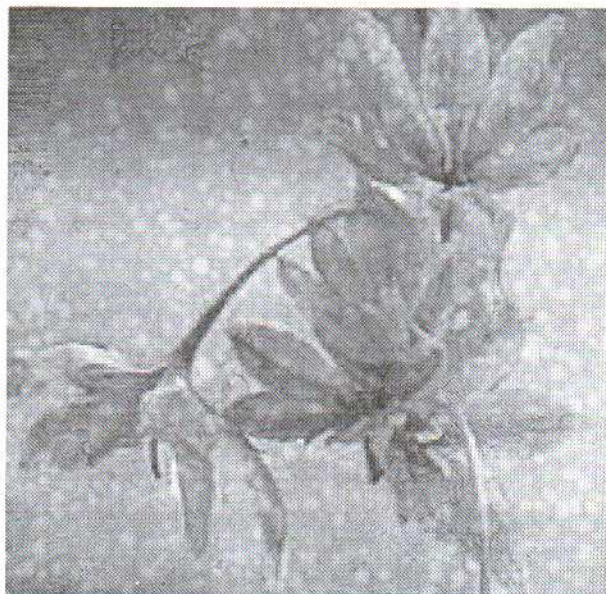
شامل آنالوگ‌های کروسین که به ۴ نوع تقسیم می‌شوند. این مواد مشتقات قنددار کروسین هستند. کروسین و مشتقات منو و دی متیله آن به میزان کمتری در زعفران یافت می‌شوند و می‌توان با روش ترکیبی میزان بیشتری از آن‌ها را تهیه کرد. کروسین اصلی و عمده، کروسین نوع I یا دی‌زانتیوبیوزیدکروسین (digentiobioside crocetin) است. مسئول رنگ زعفران، کروسین‌های آن هستند که بر خلاف دیگر کاروتنوئیدهای طبیعی، محلول در آب می‌باشند.

ب) منوترپن آلدئیدها

پیکروکروسین مسئول طعم تلخ زعفران و مشتق بی‌قند آن، سافرانال، مسئول بوی معطر زعفران از این دسته هستند.

بنابراین سه عامل رنگ (کروسین‌ها)، طعم (پیکروکروسین) و عطر زعفران (سافرانال) در کلاله خشک آن جای دارند. لازم به ذکر است که ترکیبهای شیمیایی دیگری از جمله آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها، ویتامین‌ها، آمینو اسیدها، پروتئین، نشاسته، مواد معدنی و صمغ‌ها نیز به میزان بسیار کمتری نسبت به دو دسته فوق، در کلاله زعفران حضور دارند (Fernandez, 2004).

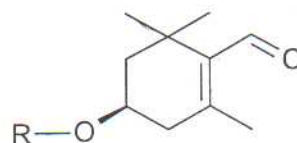
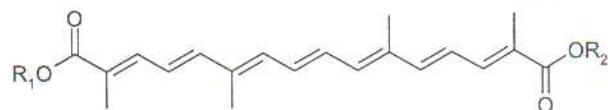
تا کنون اکثر مقاله‌های منتشر شده در خصوص استخراج و شناسایی تشکیل دهنده‌های زعفران و مطالعه در مورد آن‌ها، در مورد زعفران اسپانیا و به میزان کمتری در مورد زعفران یونان و هند بوده است. در مورد استخراج اجزاء مهم زعفران ایران تا قبل از فعالیت‌های گروه ما،



شکل ۱- راست: گل زعفران خوراکی (*Crocus Sativus L.*).

چپ: بخش خوراکی زعفران

زعفران ادویه گرانی است که به طور عمده به عنوان داروی گیاهی یا طعم و رنگ دهنده غذا در قسمت‌های مختلف دنیا استفاده می‌شود. منشاء اصلی زعفران از ایران، یونان و آسیای صغیر بوده که بعد کشت آن از قسمت شرق تا شمالی ترین نقاط چین و هند گسترش یافته است (Sastry et al., 1995). در حالی که کل تولید زعفران در دنیا ۲۰۵ تن در سال است، ایران حدود ۸۰٪ یعنی حدود ۱۶۰ تن زعفران در سال تولید می‌کند. خراسان به تنهایی ۶۶۰۰۰ هکتار زمین زیر کشت این محصول دارد که سالانه حدود ۱۳۷ تن محصول از آن برداشت می‌شود. کشمیر در هندوستان بین ۸ تا ۱۰ تن، یونان بین ۴ تا ۶ تن و مراکش بین ۰/۸ تا یک تن زعفران در سال تولید



عمده زعفران ایران یعنی کاروتنوئیدها (کروسین، کروسستین و دی‌متیل‌کروسستین) و منوترپن آلدئیدها (پیکروکروسین و سافراناال)، اثرات هر یک از اجزاء بر ساختار دو ماکرومولکول مهم یعنی DNA و هیستون H1 به عنوان سازوکارهای ملکولی محتمل در اعمال اثرات ضدسرطانی آن‌ها به طریق آزمایشگاهی (*in vitro*) بررسی گردد [بوالحسنی و همکاران، ۱۳۸۲؛ Bolhasani Ashrafi et al., 2005; et al., 2005b]. در مقاله حاضر با استفاده روشهای مختلف برخی جنبه‌های میان‌کنش DNA با عصاره زعفران و اجزاء مختلف آن و همچنین میان‌کنش هیستون H1 با منوترپن آلدئیدهای زعفران و اثر این ترکیبهای بر کمپلکس H1-DNA گزارش خواهد شد.

شکل ۲- بالا: ساختار کاروتنوئیدهای زعفران. در کروسستین R_1 و R_2 هیدروژن، در دی‌متیل‌کروسستین R_1 و R_2 گروه متیل و در کروسین R_1 و R_2 واحدهای گلوکز هستند. پایین: ساختار منوترپن آلدئیدهای زعفران. در سافراناال، R هیدروژن و در پیکروکروسین، واحد (های) گلوکز است.

تنها گزارشی که منتشر شده بود در مورد سنجشی است که با HPLC انجام گرفته بوده و کاروتنوئیدهای زعفران ایران، اسپانیا و تبت در آن شناسایی و مقایسه شده بودند (Sujata et al., 1992).

به طور خلاصه نقش کاروتنوئیدهای زعفران را می‌توان در دو عنوان خلاصه کرد:

الف) به عنوان مهارکننده واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال آزاد

ب) تعدیل‌کننده میان‌کنش‌های DNA - پروتئین به عنوان مثال اثر بر توپوایزومراز II (مسئول سنتز DNA)

یکی از اثرات بیولوژیک زعفران که به ویژه در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته، جلوگیری از رشد سلولهای سرطانی و ممانعت از ازدیاد و تقسیم این سلولهاست، در حالی که این ترکیب هیچ اثری بر سلولهای طبیعی ندارد (Nair et al., 1995). اثرات ضد سرطانی زعفران و به ویژه کاروتنوئیدهای تشکیل دهنده آن بر بعضی سوش‌های سلولی بررسی شده، اما در مورد تأثیر آن‌ها بر ساختارهای ملکولی گزارشی در دست نیست. در تحقیقاتی که اخیراً در آزمایشگاه ما صورت گرفته، سعی شده است تا پس از جداسازی پنج جزء

مواد و روشها

مواد

کلاله خشک زعفران خوراکی (*Crocus Sativus L.*) معروف به زعفران پوشالی از قائنات و کروسستین استاندارد از شرکت سیگما (Sigma) تهیه شد. حلال‌های مختلف و مواد مورد نیاز برای کروماتوگرافی (نظیر اکسید آلومینیم-۹۰، اکتیو خنثی، سیلیکاژل G-60) از شرکت مرک (Merck) تهیه شد که همگی با درجه خلوص بالا بود. اتیدیوم برماید (EtBr) و دودسیل‌تری‌متیل‌آمونیم‌برماید (DTAB) از شرکت سیگما تهیه شد. DNA با وزن ملکولی بالا و هیستون H1 از تیموس گوساله استخراج شد (Bathaie et al., 1999; Cole, 1989). بافر مورد استفاده در تمام آزمایشها، بافر تریس (tris-HCl) ۰/۰۵ مولار با pH برابر ۷/۴ بود.

روشها

۱) استخراج اجزاء مهم زعفران ایران

استخراج و خالص‌سازی این اجزاء با اصلاحات و تغییراتی در روش‌های ارائه شده در مراجع مختلف به صورت ذیل انجام شد.

خالص سازی کاروتنوئیدها و منوترین آلدئیدهای زعفران ایران و بررسی اثر هریک بر ساختار DNA، هیستون H1 و کمپلکس HI-DNA شدن در حضور دی کلرومتان: دی اتیل اتر (۵۰: ۵۰) انجام شد.

ج) جداسازی سافرانال و کروسستین

عصاره گیری پودر کلالة خشک زعفران با آب ۷۰ درجه سانتیگراد انجام شد و بعد pH محلول با اسید کلریدریک به یک رسید. پس از تغلیظ تحت خلأ، جزء فرار (سافرانال) در تله سرمایی در ۷۸- درجه سانتیگراد جمع آوری و جزء غیر فرار (کروسستین) توسط دسیکاتور خشک شد. عمل تخلیص با آب و اسید کلریدریک انجام شد. رسوب در تاریکی در دمای ۴ درجه سانتیگراد ذخیره شد.

خلوص و شناسایی ساختار تمام اجزاء جدا شده با استفاده از روشهای اسپکتروفتومتری (UV-Vis)، کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC)، طیف سنجی مادون قرمز (IR)، طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته (-NMR ¹³C, ¹H- 500) و اندازه گیری نقطه ذوب (m.p.) آنها انجام شد (Bolhasani et al., 2005b).

۲) مطالعه میان کنش هر یک از اجزاء زعفران با DNA و هیستون H1 یا کمپلکس آن دو

الف) روش اسپکتروفتومتری

تمام اندازه گیری های طیف سنجی نوری در این تحقیق با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر دوپرتوی شیمادزو (Shimadzu) مدل ۳۱۰۱ انجام شد. در این مطالعه ابتدا طیف جذبی عصاره زعفران و بعد هر یک از تشکیل دهنده های آن (به طور خالص) رسم شد. در مرحله بعد، به منظور بررسی اثر هر یک از تشکیل دهنده های زعفران بر ساختار DNA یا هیستون H1 (هر دو از تیموس گوساله استخراج شد) از تیتراسیون اسپکتروفتومتری استفاده گردید.

همچنین میان کنش HI-DNA در حضور اجزاء متفاوت زعفران با این روش بررسی شد. به این منظور ابتدا میان کنش هیستون H1 طبیعی با DNA مطالعه شد.

الف) تخلیص پیکروکروسین و کروسین

عصاره گیری از پودر کلالة خشک زعفران در تاریکی و در دمای اتاق با هگزان نرمال و سپس اتانول ۵۰٪ صورت گرفت. سپس نمونه روی ستون اکسید آلومینیم گذاشته شد. ستون ابتدا با اتانول ۵۰٪ و سپس اتانول ۵۰٪ و اسید استیک شستشو داده شد. نمونه های ۴ میلی لیتری جمع آوری و جذب هر بخش در دو طول موج ۲۵۰ و ۴۴۰ نانومتر قرائت گردید. در لوله های اولیه پیکروکروسین ها جمع آوری و سپس مجموعه کروسین ها از ستون خارج شد. مراحل جداسازی اجزاء توسط روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) نیز پیگیری شد (Iborra et al., 1992). اجزاء بدست آمده توسط دستگاه لیوفیلیز کننده به پودر تبدیل گردید.

برای جداسازی نوع غالب کروسین از سایر کروسین ها، پس از حل شدن پودر کروسین ها در حلال، از ستون سیلیکاژل-۶۰ و از اتیل استات: اتانول: آب با نسبت حجمی ۲:۳:۱۰ به عنوان فاز متحرک استفاده گردید. در ارتباط با جداسازی نوع غالب پیکروکروسین نیز از همین روش استفاده شد ولی فاز متحرک n- بوتانول: اسید استیک: آب با نسبت حجمی ۱:۱:۴ بود. همچنین فرم های اصلی پیکروکروسین و کروسین با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک نیز جدا شد که نتایج مشابهی با روش قبل به دست آمد. اجزاء بدست آمده توسط دستگاه لیوفیلیز کننده به پودر تبدیل و برای مرحله بعد در فریزر نگهداری شد.

ب) تولید دی متیل کروسستین

عصاره گیری پودر کلالة خشک زعفران به ترتیب توسط هگزان، دی اتیل اتر و متانول ۸۰٪ با استفاده از سیستم سوکسیله انجام شد. ترکیب دی متیل کروسستین (به منظور افزایش مقدار آن) توسط هیدرولیز قلیایی عصاره حاصل با پتاس ۱۰٪ انجام شد و تخلیص توسط عصاره گیری با دی کلرومتان صورت گرفت. کریستالیزه

محلول DNA با غلظت ثابت، همان حجم از بافر در لوله‌های آزمایش ریخته و طیف نثری آن‌ها رسم شد. اختلاف شدت نشر لیگاند در دو حالت آزاد و پیوندی بیانگر میزان فرونشانی نشر بود که از آن برای محاسبه مولفه های پیوندی (به طریق ذیل) استفاده شد (Gupta & Ali, 1984):

برای بدست آوردن معادله اسکاچارد، v از نسبت میزان نشر در هر لحظه به میزان نشر حداکثر محاسبه شد. با توجه به معلوم بودن غلظت کل DNA و v می‌توان غلظت لیگاند پیوند شده را محاسبه نمود. از روی غلظت‌های کل لیگاند و لیگاند پیوند شده، غلظت لیگاند آزاد محاسبه و بعد منحنی اسکاچارد رسم می‌گردد. روابط در زیر نشان داده شده است:

$$v = Q/Q_{\max} \quad C_b = v \cdot [DNA]$$

$$C_f = C_t - C_b$$

از رسم نمودار تجربی $v/[D]$ بر حسب v مقدار عددی m یعنی حداکثر تعداد جایگاه‌های پیوندی بر جفت بازهای DNA و ثابت پیوند ذاتی (K) بدست آمد.

همچنین از مطالعات فلوری متری برای بررسی تغییرات ساختاری هیستون HI در حضور کاروتنوئیدها و منورترین آلدئیدهای زعفران استفاده شد. به این منظور ابتدا طول موج‌های برانگیختگی و نثری پروتئین (HI) تعیین شد. طول موج برانگیختگی حدود $275/2$ نانومتر و طول موج نثری $308/8$ نانومتر بدست آمد. شکاف‌ها طوری تنظیم شد که میزان نشر حدود ۵۰ درصد باشد. مطابق روش ذکر شده در بالا و طبق فرمول‌های فوق (با این تفاوت که به جای غلظت DNA غلظت هیستون HI گذاشته شد) نمودارهای اسکاچارد برای میان‌کنش هیستون HI با این لیگاندها رسم گردید.

نتایج

الف- نتایج استخراج

در شروع مطالعات جداسازی، تخلیص و شناسایی کاروتنوئیدها و منورترین آلدئیدها با استفاده از زعفران

حجم‌های مختلفی از محلول غلیظ HI با حجم ثابتی از محلول DNA با غلظت ثابت مخلوط شد. غلظت نهایی DNA ($0/037$ میلی مولار جفت باز (mMbp)) و حجم محلول‌های هیستون طوری انتخاب شد که نسبت نهایی مولی DNA به پروتئین HI در لوله‌های مختلف بین ۵ تا ۳۰۰ باشد. پس از نگهداری لوله‌ها به مدت یک ساعت در لرزاننده (shaker) در دمای اتاق، به مدت ۷ دقیقه در 14000 دور در دقیقه سانتریفوژ شد. درصد تشکیل رسوب (درصد تشکیل کمپلکس پروتئین - DNA) با قرائت جذب DNA باقی‌مانده در محلول رویی و بر اساس رابطه زیر محاسبه و نمودارهای لازم رسم گردید:

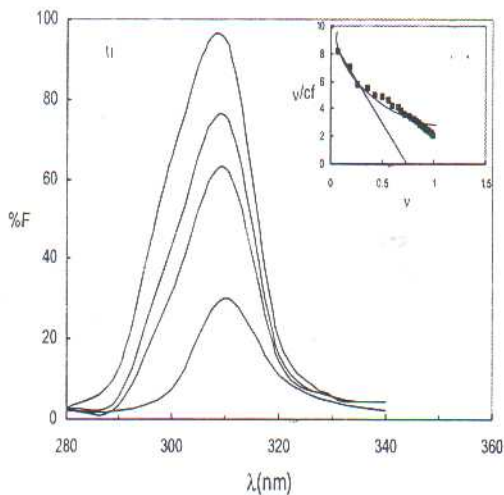
$$\%P = [1 - (A_{260} \text{ Sup} / A_{260} \text{ DNA})] \times 100$$

در مرحله بعد، هیستون HI با غلظت مؤثر از هر یک از اجزاء زعفران به طور جداگانه میان‌کنش داده شد و بعد میان‌کنش هیستون دگرگون شده توسط این مواد با DNA به روش فوق بررسی شد.

ب) روش اسپکتروفلوری متری

مطالعات فلورسانس با دستگاه فلوری متر شیمادزو مدل RF-5000 انجام شد. در تمام آزمایشها سرعت روبش تند، حساسیت بالا و شکاف‌ها برای هر دو طول موج برانگیختگی و نشر ۵ نانومتر در نظر گرفته شد. این روش برای تعیین مولفه های پیوندی کروستین (مهمترین کاروتنوئید موجود در زعفران) با DNA مورد استفاده قرار گرفت. طول موج نثری کروستین $571/2$ نانومتر تعیین گردید. بعد از تنظیم کلی شرایط آزمایش، میان‌کنش لیگاند و DNA از طریق پایش فلورسانس ذاتی لیگاند در دو حالت آزاد و پیوند شده به DNA مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش، در نمونه‌هایی با حجم یکسان، حجم ثابتی از DNA با غلظت یکسان (معادل $0/0804$ میلی مولار باز) ریخته شد، در حالی که غلظت دارو در محدوده بین $0/01$ تا $0/08$ میلی مولار، رو به افزایش بود. همین آزمایش دوباره تکرار شد با این تفاوت که به جای

خالص‌سازی کاروتنوئیدها و منوترپن‌آلدنیدهای زعفران ایران و بررسی اثر هریک بر ساختار DNA، هیستون H1 و کمپلکس H1-DNA کاهش نشر هیستون H1 با افزایش غلظت پیکروکروسین یا سافرانال، بیانگر تأثیر این لیگاند بر ساختار پروتئین، پس از میان‌کنش با آن است. در حضور پیکروکروسین، حداکثر نشر به میزان ۳ نانومتر به سمت راست یعنی طول موج های بلندتر جابه‌جا شد. با استفاده از این داده‌ها، نمودار اسکاچارد برای اتصال پیکروکروسین به هیستون، رسم و با ترسیم یک خط مماس بر نمودار (شکل ۴)، مولفه های پیوندی محاسبه گردید. مقادیر n (تعداد جایگاههای پیوندی) و K (ثابت پیوند ذاتی) به ترتیب برابر ۰/۷۴ و $1/2 \times 10^4 M^{-1}$ بدست آمد. محاسبه این مولفه برای سافرانال امکان‌پذیر نبود، زیرا سافرانال مایع است و محاسبه مولاریته آن کار دشوار و حتی با امکانات موجود غیر ممکن است.



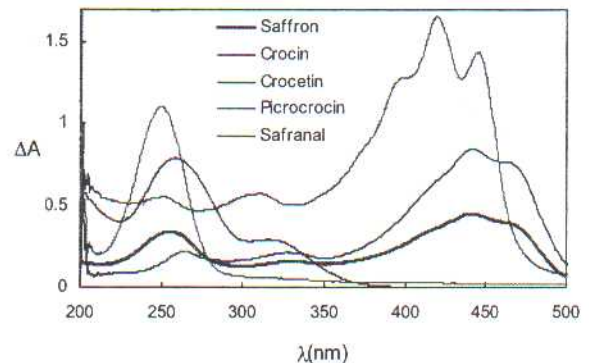
شکل ۴- الف: تغییرات درصد نشر هیستون H1 در حضور پیکروکروسین و ب: نمودار اسکاچارد برای میان‌کنش این ترکیب با پروتئین.

ج- تعیین مولفه های پیوندی میان‌کنش کروسین با DNA

روش اسپکتروفلوری متری برای تعیین مولفه های پیوندی میان‌کنش کروسین با DNA بکار برده شد. این روش برای لیگاندهایی نظیر کروسین که نشر آنها پس از اتصال به DNA کاهش می‌یابد، بکار می‌رود و با استفاده از میزان فرونشانی نشر کمپلکس لیگاند- DNA می‌توان

قائانات انجام شد. نتایج جداسازی اجزاء زعفران تا مرحله تولید کروسین(ها)، کروسیتین، دی‌متیل‌کروسیتین، سافرانال و پیکروکروسین (ها) در سال ۲۰۰۵ منتشر شد (Bolhasani et al., 2005b). نتایج حاصل از روشهای کروماتوگرافی TLC و HPLC وجود چهار نوع کروسین و سه نوع پیکروکروسین در زعفران ایران را نشان داد. در این تحقیق، نوع کروسین اصلی (کروسین ۱) و پیکروکروسین اصلی (نوع ۱) از انواع دیگر جدا و پس از شناسائی برای مراحل بعدی نگهداری شد.

عصاره زعفران دارای سه پیک جذب مجزا در طول موج‌های ۲۵۵، ۳۲۷ و ۴۴۲ نانومتر می‌باشد. پیک‌های جذبی متمایز برای کاروتنوئیدهای زعفران در ۴۴۰ نانومتر و برای پیکروکروسین در ۲۵۰ نانومتر و برای سافرانال در ۳۱۵ نانومتر مشاهده می‌شود (شکل ۳). در اثر میان‌کنش عصاره زعفران با DNA و یا هیستون H1، تغییراتی در طیف‌های جذبی این ترکیب‌های ایجاد می‌شود که حاکی از برقراری پیوند است.



شکل ۳- طیف جذبی زعفران و هر یک از تشکیل دهنده‌های آن

ب- میان‌کنش منوترپن‌آلدنیدهای زعفران با هیستون H1 میان‌کنش اجزاء زعفران با هیستون H1 توسط روشهای مختلف اسپکتروفوتومتری و فلوری متری مطالعه شد. بخشی از این مطالعات که در مورد کاروتنوئیدهای زعفران بود، در مقاله دیگری به چاپ رسید (Ashrafi et al., 2005). در این مقاله میان‌کنش منوترپن‌آلدنیدهای زعفران ایران با H1 ارائه می‌شود.

این دو ماکروملکول (تشکیل ۹۷٪ درصد رسوب) با نسبت حدود ۳۵ جفت باز DNA به هر ملکول HI صورت می‌گیرد که ناشی از اتصال هر دو بخش سرکروی و دنباله کربوکسیل HI به DNA است (Buche et al., 1993). نتایج مربوط به کاهش در تشکیل این کمپلکس در حضور کاروتنوئیدهای زعفران در مقاله قبلی نشان داده شد (Ashrafi et al., 2005, ۲۰۰۵). در اینجا به بررسی اثر منوترین آلدئیدهای زعفران (پیکروکروسین و سافرانا) بر این کمپلکس می‌پردازیم.

در غلظت ثابت پیکروکروسین (۰/۲ میلی مولار)، ۵٪ کاهش در میزان تشکیل کمپلکس HI با DNA مشاهده شد، در حالی که سافرانا (۱۵۰ میکرولیتر) کاهش ۲۲ درصدی در تشکیل کمپلکس HI با DNA را سبب می‌شود. جدول شماره ۱ نسبت اتصال DNA به HI را در ۵۰٪ رسوب برای تمام تشکیل دهنده‌های زعفران نشان می‌دهد.

اطلاعاتی در مورد چگونگی اتصال از لحاظ کمی و کیفی بدست آورد (Gupta & Ali, 1994). تغییرات نشر کروسین در حضور DNA و غیاب آن در شکل ۵ الف نشان داده شده است. نمودار اسکاچارد برای اتصال کروسین به DNA تیموس گوساله رسم شد (شکل ۵ ب). همان طور که در نمودار ملاحظه می‌گردد در حضور کروسین منحنی اسکاچارد به صورت هذلولی شکل بدست می‌آید که با استفاده از رسم مماس بر منحنی، می‌توان مقادیر مولفه های پیوندی یعنی n و K را محاسبه کرد. این مولفه ها برای میان کنش کروسین با DNA عبارتند از: $n = 0.54$ و $K = 2 \times 10^6 M^{-1}$.

د- اثر تشکیل دهنده‌های زعفران بر کمپلکس HI-DNA

شکل ۶ درصد تشکیل کمپلکس HI با DNA را در بافر تریس و در دمای اتاق در حضور و غیاب لیگاندهای مورد نظر نشان می‌دهد. منحنی رسوب DNA توسط هیستون شکل سیگموئیدی دارد و حداکثر میزان اتصال

جدول ۱: مقایسه مولفه های پیوندی تشکیل دهنده‌های زعفران با هیستون HI و کاهش درصد تشکیل کمپلکس HI-DNA در حضور این ترکیبهای. با توجه با مایع بودن سافرانا، محاسبه مولفه های پیوندی برای آن امکان پذیر نبود. میزان اتصال جفت بازهای DNA به هیستون در ۵۰٪ P₅₀، در غیاب هر یک از لیگاندها، حدود ۶۰ و حداکثر رسوب، ۹۸٪ بود.

نوع لیگاند	$Ka (M^{-1})$	n	حداکثر P% (تقریبی)	کاهش در P%	میزان اتصال (bpDNA/HI) در P ₅₀ %
پیکروکروسین	$1/2 \times 10^4$	۰/۷۴	٪۹۳	۵	۵۲
سافرانا	-----	---	٪۷۶	۲۲	۴۵
کروسین	$3/8 \times 10^4$	۰/۵۷	٪۹۲	۶	۵۶
کروستین	$7/2 \times 10^4$	۰/۸۱	٪۸۸	۱۰	۵۳
دی متیل کروستین	$7/5 \times 10^4$	۰/۸۲	٪۸۶	۱۲	۴۶

پیشگیری کننده از وقوع سرطان نیز نام برده شده است (Abdullaev, 2002 ; Nair et al., 1995). اکثر تحقیقاتی که تاکنون در این زمینه صورت گرفته، مطالعاتی است که در مورد عصاره یا اجزاء مهم زعفران بر سوش‌های سلولی یا حیوانات آزمایشگاهی بوده و تأثیر آن‌ها بر ساختارهای

بحث

فعالیت ضدسرطانی عصاره زعفران در مقابل طیف گسترده‌ای از تومورهای موشی و سوش‌های سلولی سرطانی در انسان گزارش و از این ترکیب نه تنها به عنوان گیاهی با اثرات دارویی، بلکه به عنوان عامل

خالص‌سازی کاروتنوئیدها و منوترپن‌آلدئیدهای زعفران ایران و بررسی اثر هریک بر ساختار DNA، هیستون H1 و کمپلکس HI-DNA می‌تواند با القاء تغییرات کلی یا جزیی بر ساختار DNA، فعالیت آن را کنترل نماید.

همان‌طور که در بخش‌های قبلی گفته شد، به دنبال گزارشهای متعدد درباره خواص ضدسرطانی زعفران، به دنبال روشن شدن سازوکار عمل احتمالی آن، بر آن شدیم تا نخست مهمترین اجزاء زعفران ایران را که عوامل رنگ، عطر و طعم آن هستند، از این گیاه ارزشمند جدا و خالص، و بعد با توجه به سازوکارهای ارائه شده در بالا، اثر عصاره زعفران و هریک از تشکیل دهنده‌های فوق را بر ساختار DNA، هیستون H1 و کمپلکس این دو ماکرومولکول به طریق آزمایشگاهی (*in vitro*) بررسی نماییم.

الف- استخراج اجزاء زعفران

بیشتر مقاله‌هایی که در خصوص استخراج اجزاء زعفران و مطالعات در مورد این تشکیل دهنده‌ها منتشر شده است در مورد زعفران اسپانیا و به میزان کمتری در مورد زعفران یونان و هند بوده است. درمورد استخراج اجزاء مهم زعفران ایران تنها در سنجشی که با HPLC انجام گرفته است، کاروتنوئیدهای زعفران ایران، اسپانیا و تبت شناسایی و مقایسه شده‌اند. در مقاله‌ای که اخیراً منتشر شد، در ارتباط با جداسازی و تخلیص سه کاروتنوئید مهم زعفران یعنی کروستین، کروستین و دی متیل کروستین و دو منوترپن‌آلدئید آن یعنی پیکروکروستین و سافرانال بود (Bathaie et al., 2006). نتایج تحقیقات ما نشان داد که در زعفران ایران ۴ نوع کروستین وجود دارد که نوع مهم آن کروستین ۱ یا دی ژانتیوبیوزید کروستین است. همچنین نتایج این بررسی نشان داد که پیکروکروستین زعفران ایران نیز سه نوع می‌باشد که نوع اصلی (یا پیکروکروستین ۱) آن از سافرانال متصل یک گلوکز (سافرانال گلیکوزیده) ساخته شده است. در طیف‌های بدست آمده، مشاهده شد که اختلاف سه نوع پیکروکروستین و چهار نوع کروستین در تعداد قندهای

ملکولی مطالعه نشده است. تنها میان‌کنش ملکولی ارائه شده، میان‌کنش کروستین با آلبومین سرم است (Zsila et al., 2001; Miller et al., 1982; Zsila et al., 2002).

همان‌طور که می‌دانیم، در هنگام شروع رونویسی از ژن‌ها، در مرحله اول و قبل از اتصال عوامل رونویسی به ژن، باید DNA از هیستون‌ها جدا و آزاد شود و به این منظور دگرگونی‌های (modifications) مختلفی در سطح هیستون‌ها صورت می‌گیرد. از جمله این دگرگونی‌ها می‌توان از استیله شدن، فسفریله شدن و متیله شدن نام برد (Van Hold & Zlatanova, 1996; Allfery, 1997). عوامل مختلف فیزیولوژیک، غیرفیزیولوژیک (پاتولوژیک) و دارویی در داخل سلول بر این میان‌کنش تأثیر می‌گذارند و با اثر بر ساختار DNA یا هیستون‌ها، موجب سست شدن میان‌کنش هیستون-DNA با تفکیک کامل آن می‌شوند و به این ترتیب شرایط را برای حمله عوامل رونویسی به DNA فراهم می‌نمایند. با توجه به اینکه از میان هیستون پروتئین‌ها، ساختار کروماتین به شدت تحت تأثیر میان‌کنش هیستون رابط و DNA رابط است و قدم اول در شروع رونویسی، سست یا جدا شدن این کمپلکس است (Zlatanova, 2000)، بنابراین در مطالعه حاضر این مکانیزم به عنوان سازوکار احتمالی اثر ترکیبهای ضد سرطان (مثل زعفران) که در نهایت می‌تواند منجر به فعال شدن رونویسی از ژن‌های بازدارنده تومور بشود، مورد بررسی قرار گرفت.

از طرفی بسیاری از داروهای ضدسرطان به DNA متصل شده و با اثر بر ساختار آن، فرآیندهای درون سلولی مرتبط، همچون همانندسازی یا رونویسی را، مهار یا کنترل می‌کنند. این داروها معمولاً "به شیارهای بزرگ یا کوچک DNA متصل می‌شوند (groove binding) و یا بین جفت بازهای DNA فرومی‌روند که در این صورت فرورونده (intercalators) نامیده می‌شوند (Geriestanger & Wemmer, 1995). هر یک از سازوکارهای اتصال فوق

رج‌بندی مناسب بین بازها از بین رفته (unstacking) است. نتایج مشابهی نیز در اثر میان‌کنش DNA با سورفکتانت‌های کاتیونی مشاهده و گزارش شده بود (Braun et al., 2003).

نتیجه مطالعات بررسی مقاومت DNA نسبت به غیرطبیعی شدن توسط یک پاک‌کننده کاتیونی (دودسیل تری‌متیل آمونیوم برماید یا DTAB)، نشان داد که پایداری DNA در حضور کاروتنوئیدها و منوترین آلدئیدهای زعفران کاهش می‌یابد. محاسبه انرژی آزاد $\Delta G(H_2O)$ در حضور این لیگاندها، کاهش این مولفه مهم را نشان داد؛ یعنی در حضور عصاره یا هر یک از اجزاء زعفران، به دلیل تغییرات ساختاری القاء شده در DNA، این مولکول پایداری خود را از دست داده و میزان کمتری از DTAB برای غیرطبیعی کردن کامل آن نیاز می‌باشد (بوالحسنی و همکاران، ۱۳۸۲؛ Bolhasani et al., 2005).

در این مقاله به ارائه نتایج مطالعات پیوندی می‌پردازیم. بررسی فرونشانی نشر کروسین که تنها کاروتنوئید طبیعی محلول در آب است، در حضور DNA روش دیگری بود که برای مطالعه میزان پیوند شدن این لیگاند استفاده شد. همان‌طور که در نتایج نشان داده شد، مقدار $n = 0.54$ بدست آمد که بیانگر اتصال یک مول کروسین به ازاء هر دو جفت باز DNA است. با توجه به مقدار بدست آمده برای ثابت پیوند ذاتی ($M^{-1} \times 10^6 = 2$) مشاهده می‌شود که این مقدار تقریباً در حدود ثابت پیوندی سایر لیگاندهایی است که از طریق اتصال به شیار کوچک به DNA متصل می‌شوند. از آنجایی که نشر فلورسانس سایر تشکیل دهنده‌های زعفران کم است یا اصلاً نشر ندارند، بنابراین مطالعات پیوندی برای این ترکیبها صورت نگرفت.

ج- میان‌کنش اجزاء زعفران با هیستون H1

بررسی میان‌کنش اجزاء زعفران با هیستون H1 نشان داد که تمام آن‌ها بر ساختار این پروتئین اثر می‌گذارند، هر چند که این اثرات کمی با یکدیگر متفاوت است.

متصل به آنهاست. نتایج نشان می‌دهند که اجزاء مهم تشکیل دهنده زعفران ایران با زعفران اسپانیا یکسان است به جز وجود سه نوع پیکروکروسین که در زعفران ایران برای اولین بار مشاهده و گزارش می‌شود.

برای مطالعه اثرات اجزاء مهم زعفران اعم از کاروتنوئیدها و آلدئیدهای تک‌ترپنی موجود در آن بر ساختار دو ماکرومولکول مهم یعنی DNA و هیستون H1، در این تحقیق از روشهای مختلفی استفاده شد که از آن جمله می‌توان به روشهای اسپکتروفتومتری، اسپکتروفلوری متری و CD اشاره کرد.

ب- میان‌کنش اجزاء زعفران با DNA

با افزایش کاروتنوئیدها (کروسین، کروسین و دی‌متیل کروسین، مشتق صناعی کروسین) و همچنین در اثر میان‌کنش منوترین آلدئیدهای زعفران با DNA تغییراتی در طول موج‌های جذبی هر یک از ترکیبهای ایجاد شد. همچنین تغییراتی در طیف CD (دورنگ نمایی دورانی) مربوط به DNA و پایداری آن حاصل شد که در مجموع بیانگر میان‌کنش این ترکیبها با DNA و القاء تغییر ساختاری در آن بود (بوالحسنی و همکاران، ۱۳۸۲؛ Bolhasani et al., 2005).

همچنین نتایج مطالعات منتشر شده در مقاله‌های قبلی که با روش فلورسانس و از طریق رقابت در اتصال لیگاند دوم (تشکیل دهنده‌های زعفران) با اتیدیوم برماید در اتصال به DNA صورت گرفته بود، سازوکار اتصال تشکیل دهنده‌های زعفران به DNA را به صورت پیوند به شیار کوچک تأیید کرد (بوالحسنی و همکاران، ۱۳۸۲؛ Bolhasani et al., 2005). نتایج بررسیهای انجام شده با CD نیز نه تنها این نتایج را تأیید کرد، بلکه نشان داد که در حضور اجزاء زعفران، در ساختار DNA تغییراتی به صورت انتقال از فرم B به C صورت می‌گیرد که با بالا رفتن غلظت لیگاندها از هم پاشیدگی در ساختار و حذف پیکها در نواحی ۲۷۵ و ۲۴۸ نانومتر دیده شد. این نتایج حاکی از این است که در غلظت‌های بالاتر این لیگاندها،

خالص سازی کاروتنوئیدها و منوترین آلدئیدهای زعفران ایران و بررسی اثر هریک بر ساختار DNA، هیستون H1 و کمپلکس HI-DNA آن میان کنش الکترواستاتیک برقرار می کنند افزایش یافته و این ناشی از القاء تاخوردگی بیشتر در پروتئین و فرورفتن بیشتر تیروزین به مرکز هیدروفوب آن است (Jordano *et al.*, 1983 ; Giacotti *et al.*, 1980) (Bathaie *et al.*, 2003). از آنجایی که نتایج فعلی نشان دهنده کاهش نشر پروتئین در حضور این لیگاندهاست، می توان چنین نتیجه گرفت که شاید میان کنش با پیکروکروسیپین و سافراناال موجب باز شدن تاخوردگی پروتئین شده و با خروج تیروزین از مرکز هیدروفوب پروتئین، نشر کاهش یافته است. به طور کلی تأثیرات محیطی ناشی از وجود لیگاندها بر پرتو فلورسانس را می توان ناشی از عوامل بی تشعشعی (radiationless) دانست که باعث کاهش مقدار محصول کوانتومی یا خاموشی پرتوی فلورسانس می شود. به هر حال اظهار نظر قطعی در مورد چگونگی تغییر ساختاری این پروتئین در حضور این لیگاندها، نیازمند مطالعات بیشتر می باشد، ولی با رسم نمودارهای اسکاچارد بر اساس فرونشانی نشر و محاسبات مولفه های پیوندی مشاهده گردید که ۰/۵۷ مول کروسیپین، ۰/۸۲ مول دی متیل کروستین و ۰/۷۴ مول پیکروکروسیپین به ازاء هر مول پروتئین پیوند شده است.

د- اثر بر میان کنش HI-DNA

از آنجایی که کمپلکس های HI-DNA به عنوان مدلی از کروماتین مطالعه می شود (Van Hold & Zlatanova, 1997)، بررسی میان کنش این دو ماکرومولکول در حضور اجزاء مختلف زعفران به عنوان یکی از سازوکارهای محتمل برای اثرات این اجزاء، در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفت. با توجه به این که میان کنش این دو ماکرومولکول به طور عمده از طریق پیوندهای الکترواستاتیک صورت می گیرد، پس از تشکیل کمپلکس در شرایط آزمایشگاهی رسوب تشکیل می شود که می توان میزان آن را به روش اسپکتروفتومتری که روش استاندارد است، اندازه گیری کرد (Buche *et al.*, 1993). منحنی رسوب DNA توسط HI، سیگموئیدی شکل و

همان طور که ذکر شد، تنها مطالعه ای که تا کنون در مورد اثر اجزاء زعفران با پروتئین ها در متون به چشم می خورد مربوط به کروستین و میان کنش آن با آلبومین پلاسماست (Miller *et al.*, Zsila *et al.*, 2002 ; Zsila *et al.*, 2001) (1982).

تغییرات مشاهده شده در طیف های اسپکتروفتومتری هیستون H1 تحت اثر این جزء، بسیار شبیه به نتایج بدست آمده برای آلبومین است. در حضور هیستون H1 طیف جذبی کروستین به میزان ۶ نانومتر به طرف راست یا طول موج های بلندتر جابه جا می شود که در مطالعه ارائه شده در سال ۲۰۰۱ در ارتباط با اثر کروستین بر آلبومین سرم نیز چنین جابجایی به میزان ۷ نانومتر بیان شده است (Zsila *et al.*, 2001). علت این جابه جایی پیک این است که به رغم وجود گروه های کربوکسیل در دو انتهای کروستین که مشابه با دیگر کاروتنوئیدهاست، به دلیل نداشتن واحد قندی، ویژگی هیدروفوبیکی آن غالب است. بنابراین با اتصال این لیگاند و غیرقطبی شدن محیط اطراف پروتئین، جابه جایی در طول موج های جذبی یا نشری به طرف طول موج های بلندتر مشاهده می شود. در مورد دی متیل کروستین و کروسیپین نیز تغییرات جذبی مشاهده شد که در مقاله اخیر ما به تفصیل در مورد آن بحث شده است (Ashrafi *et al.*, 2005).

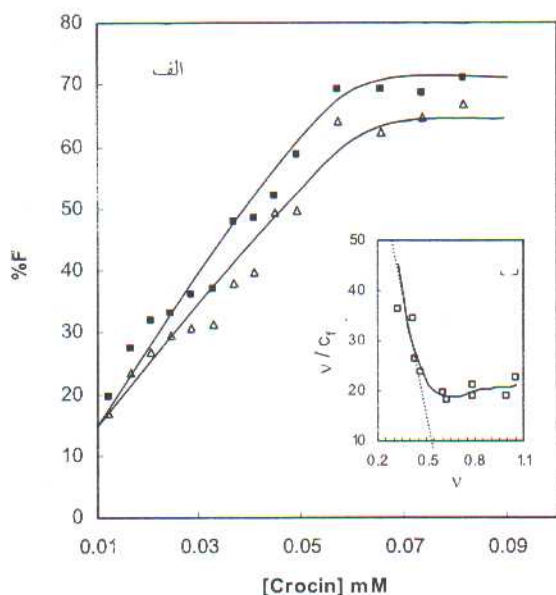
در میان کنش با منوترین آلدئیدهای زعفران یعنی پیکروکروسیپین و سافراناال، در غلظت های بالا اختلالاتی در تغییرات جذبی این لیگاندها و هیستون H1 مشاهده گردید که نیاز به روش های حساستری برای بررسی بیشتر رانشان داد. بنابراین، از روش فلوریمتری برای مطالعه استفاده شد. نتایج نشان داد که طیف نشری هیستون در حضور این دو ماده دچار تغییر شده و نشر ذاتی پروتئین که به خاطر حضور تیروزین-۷۲ در مرکز پروتئین است و به عنوان یک ره نشان فلورسانس داخلی استفاده می شود، کاهش می یابد. مطالعات قبلی ما و سایر محققان نشان داده بود که نشر این پروتئین در حضور لیگاندهایی که با

نتیجه گیری کلی

زعفران ایران دارای چهار نوع کروسین و سه نوع پیکروکروسین است که از این جهت با زعفران سایر نقاط دنیا تفاوت دارد. تمام اجزاء زعفران تغییرات شدید ساختاری در DNA ایجاد می‌کنند. حتی کروسین در غلظت‌های بالا به طور واضح باعث رسوب DNA می‌شود. میان‌کنش هر یک از اجزاء با هیستون H1 نیز باعث القاء تغییر ساختاری در این هیستون می‌شود. در بررسی میان‌کنش هیستون H1 با DNA در حضور اجزاء استخراج شده از زعفران کاهش ۵ تا ۲۲ درصدی در تشکیل کمپلکس H1 - DNA برای این اجزاء مشاهده شد.

سپاسگزاری

بدین وسیله مراتب تشکر خود را از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس بابت تأمین هزینه این پروژه و سایر همکاری‌ها اعلام می‌نمایم. همچنین از آقای دکتر محمد رضا بهنیا به خاطر همکاری‌های بی‌شائبه در تهیه زعفران خالص و با کیفیت، قدردانی می‌گردد.

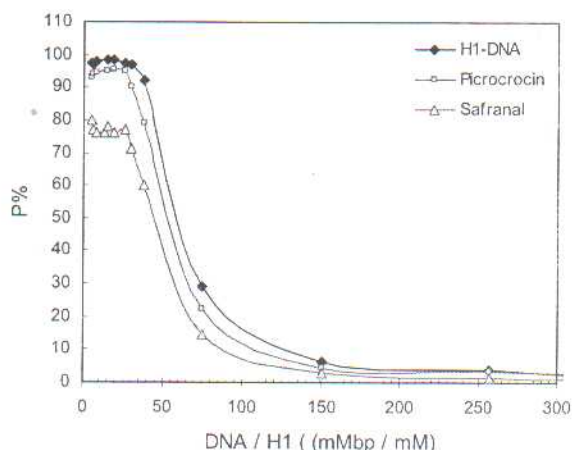


شکل ۵- الف: تغییرات درصد نثر غلظت‌های افزایشی کروسین در حضور و غیاب DNA. و ب: نمودار اسکاچارد برای محاسبه مولفه‌های پیوندی.

بیانگر متعادل بودن این فرآیند است. در حضور عواملی که موجب کاهش میان‌کنش شوند، منحنی رسوب به طرف چپ جابه‌جا می‌شود (Buche et al., 1993; Bathaie et al., 2003). در بررسی میان‌کنش هیستون H1 با DNA در حضور اجزاء استخراج شده از زعفران، ابتدا هیستون با غلظت مؤثر زعفران نگهداری شد و بعد به ترتیبی که در بخش روشها شرح داده شد، به محلول DNA اضافه و میزان رسوب اندازه‌گیری گردید. نتایج، کاهش ۵ تا ۲۲ درصدی در تشکیل کمپلکس H1 - DNA را نشان داد. همان‌گونه که در جدول ۱ ملاحظه می‌شود، با افزایش مقدار Ka (ثابت تشکیل واکنش هر کدام از اجزاء زعفران با H1) میزان تشکیل کمپلکس H1-DNA کاهش یافته است. این کاهش به دو صورت بیان شده است؛ هم با درصد تشکیل رسوب در نقطه حداکثر و هم با میزان اتصال تعداد مول جفت بازهای DNA به ازاء هر مول پروتئین در ناحیه ۰.۵۰٪ رسوب ($P_{50\%}$).

همان‌طور که در مقدمه ذکر شد، در هنگام تراکم زدایی کروماتین اولین قدم جدا شدن هیستون رابط و یا به عبارتی، کم شدن میان‌کنش این دو ماکرومولکول و آزاد شدن DNA به عنوان مکانی برای حمله عوامل رونویسی است (Zlatanova and Van Hold, 1992; Zlatanova et al., 2000). بنابراین می‌توان گفت که کاهش درصد تشکیل کمپلکس H1-DNA در حضور اجزاء مختلف زعفران که در این تحقیق مشاهده شد، اگر در شرایط سلولی نیز رخ دهد، بعضی از نواحی ژن را برای بیان پروتئین‌های خاص آشکار می‌کند و این عمل ممکن است یکی از سازوکارهای اثرات ضدسرطانی زعفران باشد. از طرفی اتصال این ترکیبها به DNA نیز می‌تواند عاملی برای ممانعت از سنتز آن (همانندسازی) یا ترکیب پروتئین‌ها (رونویسی) باشد که این‌ها نیز به نوبه خود سازوکارهای مهمی هستند. شناخت دقیق سازوکار عمل این مواد احتیاج به مطالعات وسیع‌تری دارد که در آزمایشگاه ما در حال انجام است.

- و بررسی اثر هریک بر ساختار DNA هیستون III و کمپلکس H1-DNA sulfate. Colloid and Surfaces. B: Biointerfaces, 28 (1): 17-25.
- Bathaie, S.Z., Bolhasani, A., Ranjbar, B. and Moosavi-Movahedi, A.A., 2006. DNA interaction with the saffron carotenoids. Accepted for Publication by Asian J. Chem.
- Bolhasani, A., Bathaie, S.Z., Yavari, I., Moosavi-Movahedi, A.A. and Ghaffari, M., 2005. Separation and purification of some components of Iranian saffron. Asian J. Chem., 17: 725-729.
- Braun, C.S., Jas, G.S., Choosakoonkriang, S., Koe, G.S., Smith, J.G. and Middaugh C.R., 2003. The structure of DNA within cationic lipid/ DNA complexes. Biophysical Journal, 84: 1114-1123.
- Buche, A., Colson, P. and Houssier, C., 1993. Effect of organic effectors on chromatin solubility, DNA-Histone H1 interactions, DNA and histone H1 structures. J. Biomol. Struct. Dynamics, 11: 95-119.
- Cole, R.D., 1989. Purification and analysis of H1 histones. Methods in Enzymol., 170: 524-532.
- Fernandez, J.A., 2004. Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. Recent Res. Devel. Plant Sci., 2: 127-159.
- Geierstanger, B.H. and Wemmer, D.E., 1995. Complexes of the minor groove of DNA. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 24: 463-93.
- Giaccotti, V., Qadri Foglio, F., Cowgill, R.W. and Crane-Robinson C., 1980. Fluorescence of buried tyrosine residues in proteins. Biochim. Biophys. Acta, 624: 60-65.
- Glotov, B.O., Nikolaev, L.G., Kurochkin, S.N. and Severin, E.S., 1977. Histone H1- DNA interaction. Influence of phosphorylation on the interaction of histone H1 with linear fragmented DNA. Nucleic Acids Research, 4(4): 1065-1082.
- Gupta, M. and Ali, R. 1984. Fluorescence studies on the interaction of furocoumarins with DNA in the dark. Journal of Biochemistry, 95: 1253-57.
- Iborra, J.L., Castellar, M.R., Canovas, M. and Manjon, A., 1992. TLC preparative purification of picrocrocin, HTCC and crocin from saffron. Journal of Food Science, 57(3): 714-716.
- Jordano, J., Barbero, J.L., Montero, F. and Francol, F., 1983. Fluorescence of histone H1. J. Biol. Chem., 258: 315-320.
- Martin, G., Goh, E. and Neff, A.W., 2002. Evaluation of the developmental toxicity of crocetin on xenopuse. Food Chem. Toxicol., 40(7): 959-64.
- Miller, T.L., Willett, S.L., Moss, M.E., Miller, J. and Belinka, B.A., 1982. Binding of crocetin to plasma albumin. Journal of Pharmaceutical Sciences, 71(2): 173-177.
- Nair, S.C., Kurumboor, S.K. and Hasegawa, J.H. 1995. Saffron chemoprevention in biology and medicine: A review. Cancer Biotherapy, 10: 257-264.



شکل شماره ۶- مقایسه درصد رسوب DNA در حضور نسبت های متغیر هیستون III طبیعی (لوزی تو پر)، هیستون تیمار شده با غلظت ثابت ۰/۲ میلی مولار پیکروکروسین (مربع تو خالی) و هیستون تیمار شده با ۱۵۰ میکرولیتر سافرانال (مثلث).

منابع مورد استفاده

- بوالحسنی ا.، بطحانی س. ز.، موسوی موحدی ع. ا.، غفاری م.، ۱۳۸۲. مطالعه میان کنش آلدئیدهای تک تریبی زعفران ایران با DNA. مجله علوم پزشکی مدرس، ۶(۲)، پاییز و زمستان، ۳۳-۴۲.
- Abdullaev, F.I., 2002. Cancer Chemopreventive and Tumoricidal Properties of Saffron (*Crocus sativus* L.). Exp. Biol. Med., 227(1): 20-25.
- Allfrey, V.G., 1977. Post- synthetic modifications of histone structure: a mechanism for the control of chromosome structure by modulation of histone-DNA interactions. In Chromatin and Chromosome Structure. pp. 167- 191.
- Ashrafi, M., Bathaie, S.Z., Taghikhani, M. and Moosavi-Movahedi, A.A., 2005. The effect of carotenoids obtained from saffron on H1 structure and H1-DNA interaction. Int. J. Biol. Macromol., 36: 246-252.
- Bathaie, S.Z., Moosavi-Movahedi, A.A. and Saboury, A.A., 1999. Energetics and binding properties of DNA upon interaction with dodecyl trimethyl ammonium Bromide. Nucl. Acids Res., 27: 1001-1005.
- Bathaie, S.Z., Moosavi-Movahedi, A.A., Ranjbar, B. and Saboury, A.A., 2003. A mechanistic study on H1-DNA complex dissociation by sodium *n*-dodecyl

- Zlatanova, J. and Van Hold, K., 1992. Histone H1 and transcription: still an enigma? *J. Cell. Sci.*, 103: 889-895.
- Zlatanova, J., Caiifa, P. and Van Hold, K., 2000. Linker histone binding and displacement: versatile mechanism for transcriptional regulation. *The FASEB Journal*, 14: 1697-1704.
- Zsila, F., Bikadi, Z. and Simenyi, M., 2002. Further insight into the molecular basis of carotenoid-albumin interactions: circular dichroism and electronic absorption study on different crocetin albumin complexes. *Tetrahedron: Asymmetry*, 13: 273-283.
- Zsila, F., Bikadi, Z. and Simonyi, M., 2001. Induced chirality upon crocetin binding to human serum albumin: origin and nature. *Tetrahedron: Asymmetry*, 12: 3125-3137.
- Sastry, L.V., Sriniva, M. and Surbahmanyam, V., 1955. Saffron (*Crocus sativus* L.). *J. Sci. Ind. Res.*, 14A: 178-184.
- Sujata, V., Ravishankar, G.A. and Venkataraman, L.V., 1992. Methods for the analysis of the saffron metabolites crocin, crocetins, picrocrocetin and safranal for the determination of the quality of the spice using thin-layer chromatography, high-performance liquid chromatography and gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 624: 497-502.
- Tarantilis, P.A., Morjani, H., Polissiou, M. and Manfait, M., 1994. Inhibition of growth and induction of differentiation of promyelocytic leukemia (HL-60) by carotenoids from *Crocus Sativus* L. *Anticancer Res.*, 14: 1913-1918.
- Van Hold, K. and Zlatanova, J., 1996. What determines the folding of the chromatin fiber: *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 93: 10548-10555.

Purification of Carotenoids and Monoterpen Aldehydes from Iranian Saffron and Investigation of Their Effect on the Structure of DNA, Histone H1 and H1-DNA Complex

S.Z. Bathaie¹, M. Ashrafi¹, A. Bolhasani¹, B. Etemadi-Kia¹ and A.A. Moosavi-Movahedi²

1- Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, P.O. Box: 14115-111, Tehran, Iran. e-mail: bathai_z@modares.ac.ir

2- Institute of Biochemistry & Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran.

Abstract

Saffron (*Crocus Sativus* L.) has different biological properties including anticancer activity. In the present research, we studied the possible molecular mechanisms of the saffron as an anticancer compound (interaction with DNA, H1 and H1-DNA complex), in addition to the purification of saffron components. The isolation and purification of major components of Iranian Saffron including carotenoids (crocin, crocetin and dimethylcrocetin) and monoterpen aldehydes (picrocrocetin and safranal) performed by different methods. The existence of three types of picrocrocetin and four types of crocin in Iranian saffron by using TLC and HPLC techniques was shown. The major fraction of crocins and picrocrocetins were extracted. The effects of saffron components on two macromolecules, DNA and H1, as well as the H1-DNA complex were studied. The interaction of saffron extract and all of the cited components investigated with DNA. The results showed the non-intercalative binding of the mentioned ligands with DNA and suggested the minor groove binding. The binding parameters for crocin interaction with DNA obtained ($n= 0.54$ and $K= 2 \times 10^{-5} M^{-1}$). The circular dichroism spectra indicated that the mentioned components interact with DNA at low concentrations, which is accompanied by some conformational changes, B- to C-DNA transition; however, at higher concentrations, they induce more conformational changes, i.e. unstacking of DNA bases. Spectrophotometric investigations of histone H1 titration by different components showed some changes in the peaks. These data indicated the binding of these components to histone H1. All components quenched the fluorescence emission of histone H1 as the result of its structural changes upon complex formation. By Scatchard analysis of the quenching data the binding parameters (n and K) calculated. Histone H1- DNA interaction were also studied in the absence and presence of each ligand. Our results showed that both carotenoids and monoterpene aldehydes of saffron cause the reduction on H1-DNA interaction by about 5 to 22%. These results are preliminary data to confirm our hypothesis that may be the anticancer effect of saffron is due to their interaction with DNA and reduction in the H1-DNA complexes.

Key words: Crocin, crocetin, dimethylcrocetin, picrocrocetin, safranal, histone H1, DNA, interaction