

## اثر تنظیم کاهشی کروسین بر پروفایل آنتی اکسیدانی آنزیماتیک در سلول های C2C12

فریناز حسینی بالام<sup>۱</sup>، غزاله شیمی<sup>۲</sup>، حمید زند<sup>۳</sup>، آرمان قربانی<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تغذیه، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- دانشجوی دکتری علوم تغذیه، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- استاد گروه تغذیه سلولی و ملکولی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- نویسنده مسئول: استادیار گروه تغذیه سلولی و ملکولی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. پست الکترونیکی: Arman.ghorbani@sbmu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۷/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۴/۲۰

### چکیده

**سابقه و هدف:** در حالت طبیعی مقداری رادیکال آزاد در اثر فعالیت و متابولیسم سلول ها تولید می شود که به وسیله عوامل آنتی اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی خنثی می شود. از این رو دریافت آنتی اکسیدان ها از منابع غذایی همیشه در تحقیقات تغذیه مورد توجه بوده است. به همین جهت مطالعه حاضر به بررسی اثرات آنتی اکسیدانی کروسین بر پروفایل ژن های دخیل در سیستم آنتی اکسیدانی آنزیماتیک در سلول های عضله پرداخته است.

**مواد و روش ها:** در این پژوهش سلول های عضلانی C2C12 پس از کشت و چند مرحله پاساژ، به سلول های میوتیوب تمایز داده شدند و تحت تیمار با غلظت های مختلف کروسین (۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و نهایتاً میزان بیان ژن آنزیم های آنتی اکسیدانی (SOD1، SOD2، Gpx1، catalase) به روش Real-time PCR مورد سنجش قرار گرفت.

**یافته ها:** کروسین به طور معنی داری سبب کاهش بیان ژن های SOD2، Gpx1، catalase شد ( $p < 0.05$ ) و تأثیری بر میزان بیان ژن SOD1 نداشت.

**نتیجه گیری:** یافته های این مطالعه نشان داد که دریافت یک آنتی اکسیدان اگزوژن مانند کروسین احتمالاً با تقویت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی غیر آنزیماتیک، میزان نیاز به بیان ژن های آنتی اکسیدانی آنزیماتیک را کاهش می دهد. هر چند به مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز است.

**واژگان کلیدی:** آنتی اکسیدان، رادیکال آزاد، کروسین، سلول های C2C12

### • مقدمه

DNA و پروتئین های ضد آپوپتوز نقش تنظیمی خود را در شرایط طبیعی ایفا می نمایند (۲). رادیکال های آزاد به دو صورت در سلول ها و بافت های مختلف بدن دیده می شوند. دسته اول رادیکال های فعال اکسیژن ROS به آنیون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و هیدروکسیل اشاره کرد. دسته دوم رادیکال های فعال نیتروژن RNS (Reactive nitrogen species) هستند که نیتریک اکساید از مهم ترین آنها به شمار می رود (۳). در سیستم های بیولوژیک تولید رادیکال های آزاد و گونه های فعال اکسیژن اجتناب

رادیکال های آزاد به دلیل اینکه حاوی یک یا چند الکترون جفت نشده می باشند، مولکول های بسیار واکنش پذیری هستند و بطور مداوم در بدن در حال گردش بوده و می توانند آسیب های فراوانی را به ساختار سلول و درشت مولکول ها وارد سازند (۱). رادیکال های آزاد در غلظت های فیزیولوژیک برای عملکرد طبیعی سلول ضروری بوده و افزایش کم تا متوسط آن نقش تنظیم کننده مسیرهای پیام رسانی سلولی دارد (۲). برای مثال این مواد با فعال کردن مسیرهای پیام رسانی داخل سلولی و تغییر در نسخه برداری از ژن های مربوط به آنزیم های سیستم آنتی اکسیدانی و پروتئین های ترمیم کننده

(Picrocrocin) (مسئول طعم تلخ) و سافرانال (Safranal) می باشد (۱۶، ۱۵). کروستین یک کاروتنوئید (Carotenoid) محلول در آب است که دارای اثرات آنتی اکسیدانی و آنتی تومور است (۱۷). در واقع محققین بر این باورند که ترکیبات کاروتنوئیدی زعفران از طریق واکنش با عناصر واکنش پذیر، گونه های فعال اکسیژن و اختلال در عوامل موثر در سنتز نیتريت خاصیت آنتی اکسیدانی زعفران را سبب می شوند. مطالعات نشان داده اند که کروستین اثرات مفید مختلفی از جمله اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد سرطان و محافظت از سیستم عصبی را دارد (۱۸).

با توجه به عملکردهای طبیعی بدن مانند تنفس یا فعالیت بدنی و سایر عادات زندگی (مانند استعمال دخانیات) که باعث تولید رادیکال های آزاد می شود و به سلول های سالم حمله می کنند. کروستین احتمالاً این توانایی را خواهد داشت که بتواند سیستم دفاع آنتی اکسیدانی را تقویت کند. بنابراین تحقیق حاضر قصد دارد که اثر آنتی اکسیدانی کروستین را با بررسی پروفایل ژنی آنزیم های آنتی اکسیدانی در سلول های عضلانی در شرایط فیزیولوژیک نرمال بررسی کند.

### • مواد و روش ها

این مطالعه به روش تجربی در آزمایشگاه و شرایط In Vitro در محیط کشت سلولی انجام گرفت. فلاسک  $25\text{ cm}^3$  حاوی رده ی سلولی C2C12 از بانک سلولی انستیتو پاستور خریداری شد. سلول ها در محیط کشت DMEM (Life Technologies, USA) حاوی ۱۰٪ FBS، ۱٪ پنی سیلین/استرپتومایسین، ۱٪ جنتامایسین و ۱٪ گلوتامین کشت داده شد. سلول ها در انکوباتور با فشار دی اکسید کربن ۵٪، رطوبت ۹۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگه داری می شدند. هر دو الی سه روز یکبار محیط کشت تعویض می شد. بعد از سه دوره پاساژ سلولی، در حالی که ۸۰ – ۷۰٪ کف فلاسک ها با سلول پوشیده شده بود محیط کشت DMEM حاوی ۲٪ سرم اسب جایگزین با FBS افزوده شد و هر دو روز یکبار محیط کشت تعویض می گردید. بعد از ۵ روز که سلول ها به میوتیوب تمایز یافتند، سلول ها با غلظت های مختلف کروستین تیمار شدند.

**افزودن کروستین به سلول های C2C12:** سلول ها در پلیت ۶ خانه به میزان  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> با محیط کشت DMEM تازه حاوی ۲٪ سرم اسب به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس کروستین (Sigma-Aldrich) به میزان ۲ میلی گرم در ۲ میلی لیتر محیط کشت حل شد تا غلظت  $1\text{ }\mu\text{M}$  به دست بیاید. سپس سلول های یک چاهک به عنوان گروه

ناپذیر است و بدن با طراحی مکانیسم های دفاع آنتی اکسیدانی، اثرات زیان بار آنها را تا حدودی خنثی می نماید. اگر چه در صورت افزایش تولید رادیکال های آزاد و یا از طرف دیگر کاهش عوامل آنتی اکسیدان، صدمات ناشی از آن افزایش یافته که به این حالت استرس اکسیداتیو می گویند. به عبارتی تعادل بین تولید رادیکال های آزاد و مواد پر اکسیدان از یک طرف و سیستم آنتی اکسیدانی از طرف دیگر منجر به بروز استرس اکسیداتیو می شود (۴).

در صورت به وجود آمدن استرس اکسیداتیو خفیف یا ملایم، غالباً بافت ها با افزایش دفاع آنتی اکسیدانی اثر آن را خنثی می نمایند. آنتی اکسیدان هر ماده ای است که درغلظت بسیار کم بطور قابل ملاحظه ای اکسیداسیون مواد قابل اکسید شدن را مهار کرده یا به تاخیر می اندازد (۲). سیستم های آنتی اکسیدانی به دو گروه آنزیمی و غیر آنزیمی تقسیم می شوند. مهم ترین عوامل آنتی اکسیدانی درون سلول ها شامل آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز می باشند (۵). سیستم آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی معمولاً از میوه ها و سبزیجات به دست می آید. مهم ترین آنها شامل ویتامین ای ( $\alpha$  توکوفرول)، کاروتنوئیدها (۵)، اسید آسکوربیک (۶)، اسید اوریک و بیلی روبین (۷) می باشند. جهت حفظ وضعیت ردوکس و حذف گونه های فعال و برقراری تعادل بین واکنش های اکسایش-کاهش در بدن، این مواد در مقادیر نسبتاً کم و به صورت رقابتی با سوپستراهای قابل اکسید شدن به طور قابل توجهی سبب تاخیر، مهار اکسیداسیون سوپستراها می شوند. عملکرد فیزیولوژیک سلول ها به طور مثبت یا منفی تحت تأثیر این تعادل مهم قرار دارد و وضعیت ردوکس درون سلولی سلول های زنده را تعیین می کند. تشکیل بیش از حد ROS و مواجهه ی مزمن با آن می تواند منجر به تغییر در تعادل اکسیداسیون داخل سلولی به سمت یک حالت اکسیدان بیشتر شود. در نتیجه، آسیب اکسیداتیو مولکول های زیستی، التهاب و بسیاری از بیماری های مزمن افزایش می یابد (۲). استرس اکسیداتیو با بیماری های تخریب کننده عصبی (۸)، مانند بیماری آلزایمر (۹)، پارکینسون (۱۰)، بیماری های قلبی عروقی (۱۱)، دیابت (۱۲)، سرطان (۱۳) و سایر بیماری های وابسته به سن مرتبط است.

زعفران یکی از ادویه های سنتی ایران است که به عنوان طعم دهنده و رنگ دهنده غذا مورد استفاده قرار می گیرد (۱۴). زعفران سه متابولیت اصلی دارای اثرات درمانی دارد که شامل کروستین (Crocic) (مسئول رنگ قرمز)، پیکروکروستین

کنترل، یک چاهک کروسین با غلظت  $10 \mu\text{M}$ ، چاهک بعدی کروسین با غلظت  $25 \mu\text{M}$ ، بعدی غلظت  $50 \mu\text{M}$  و در آخر غلظت  $100 \mu\text{M}$  به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. برای آنالیز بهتر این روند سه بار تکرار شد.

### • یافته‌ها

نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه به منظور تعیین اثر کروسین بر بیان ژن آنزیم SOD1 بر سلول عضله C2C12 نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بیان ژن SOD1 بین گروه‌های  $10$ ،  $25$ ،  $50$  و  $100 \mu\text{M}$  با گروه کنترل وجود ندارد (شکل ۱.ا).

نتایج با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که در بیان ژن SOD2 بین غلظت‌های مختلف تیمار با کروسین تفاوت معنی‌داری وجود دارد ( $p < 0.001$ ). آزمون تعقیبی توکی نشان داد که بیان ژن SOD2 در غلظت‌های  $10$ ،  $25$  و  $50 \mu\text{M}$  به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته بود ( $p < 0.05$ ). همچنین بیان ژن در غلظت  $100 \mu\text{M}$  به طور معنی‌داری کمتر از دوز  $100 \mu\text{M}$  است ( $P = 0.0245$ ) (شکل ۱.ب).

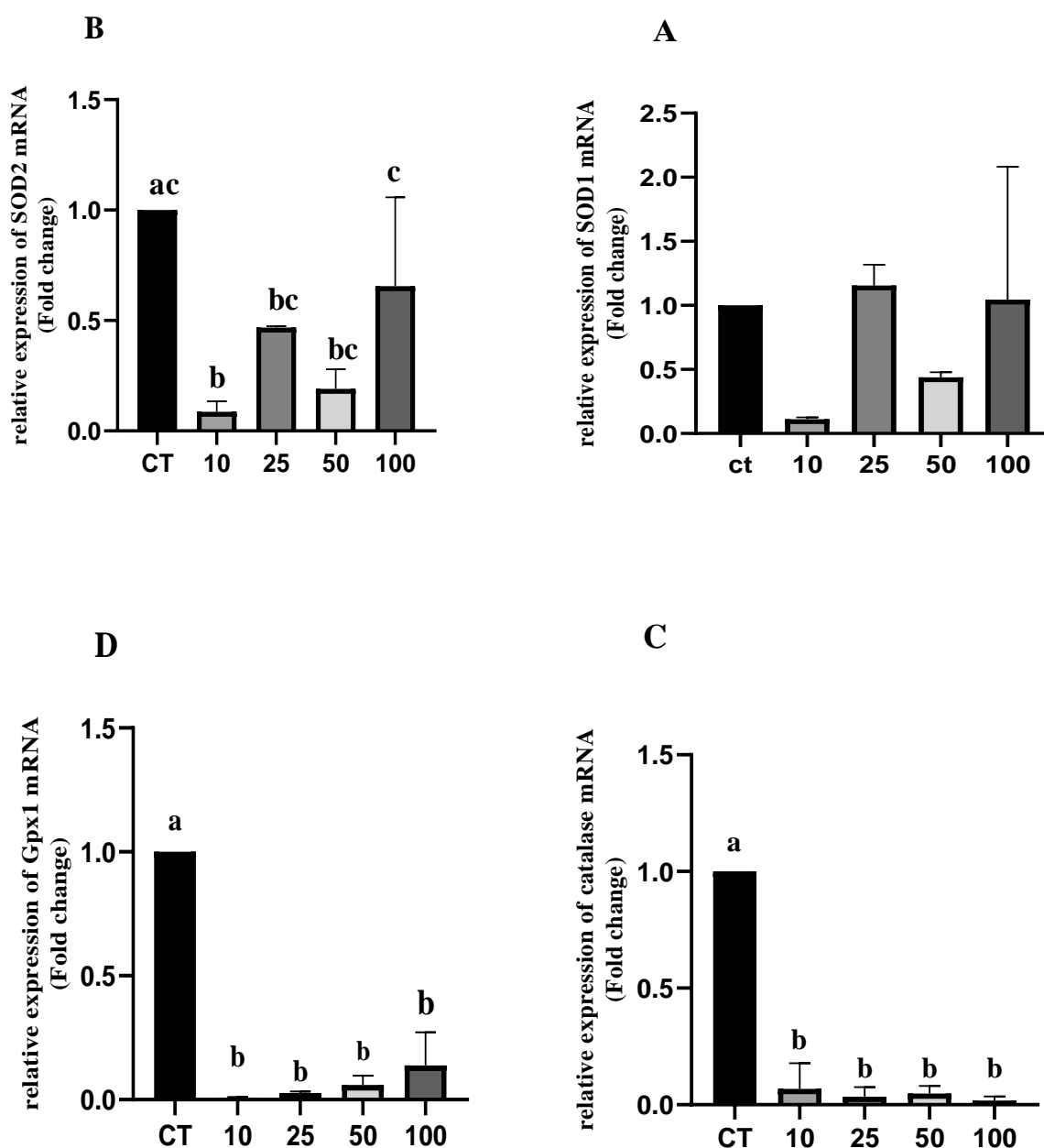
بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه مشخص شد که بیان ژن Gpx1 و catalase بین غلظت‌های مختلف کروسین تفاوت معنی‌داری وجود دارد ( $p < 0.0001$ ). با استفاده از نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داده شد که بیان ژن Gpx1 و catalase در غلظت‌های  $10$ ،  $25$ ،  $50$  و  $100 \mu\text{M}$  به طور قابل توجهی کمتر از گروه کنترل است ( $p < 0.0001$ ) (شکل ۱.ا و ۱.د).

استخراج RNA و انجام qRT-PCR: در مطالعه‌ی حاضر الگوی بیان mRNA ژن‌های مورد نظر برای غلظت‌های مذکور کروسین با استفاده از qRT-PCR انجام شد. مراحل استخراج RNA تام براساس دستورالعمل RNXplus (Sinaclon, Iran) به طور کامل اجرا شد. غلظت RNA با استفاده از دستگاه اسپکترواستار نانو دراپ (BioTek, Epoch, USA) در نسبت جذب  $260/280 \text{ nm}$  تعیین شد. برای ساخت cDNA نیز از کیت سنتز cDNA (Yekta tajhiz Azma, Tehran, Iran) طبق دستورالعمل شرکت استفاده شد. برای RT-PCR کمی به طور کلی حجم  $20 \mu\text{l}$  که حاوی  $10 \mu\text{l}$  مسترمیکس سایبرگرین (Ampliqon, Denmark)،  $2 \mu\text{l}$  cDNA،  $0.5 \mu\text{l}$  از هر پرایمر و نهایتاً  $7 \mu\text{l}$  از آب بدون dNase اضافه شد. واکنش PCR در دستگاه RT-PCR مدل step one plus ABI Real Time PCR در دمای  $95^\circ\text{C}$  به مدت ۱۵ دقیقه و  $40$  چرخه در دمای  $95^\circ\text{C}$  به مدت ۵ ثانیه و نهایتاً در دمای  $58^\circ\text{C}$  به مدت ۲۵ ثانیه انجام شد. پرایمرها با نرم‌افزار gene runner طراحی از شرکت بیوتک پیشگام خریداری شد. از ژن tbp به عنوان ژن کنترل استفاده شد (جدول ۱).

آنالیز آماری: داده‌ها توسط نرم افزار Graph Pad Prism و رژن ۸ تحلیل شدند. نرمال بودن توزیع داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف ارزیابی شد. برای مقایسه بین گروه‌های متغیرهای با توزیع نرمال از آزمون (test hoc-post

جدول ۱. لیست توالی پرایمرهای طراحی شده برای qRT-PCR

Gene	forward primer (5'-3')	reverse primer (3'-5')	Base pair
SOD1	AGAAGGCAAGCGGTGAAC	ATACTGATGGACGTGGAACC	86
SOD2	CTGCACTGAAGTTCAATGGTG	CTCCAGCAACTCTCCTTTGG	101
Gpx1	GTTCGGACACCAGGAGAATG	CTCACCATTCACCTTCGCACT	121
catalase	CTGACAAAATGCTTCAGGGC	GGTAGGGACAGTTCACAGGT	99
tbp	ACCGTGAATCTTGGCTGTAAAC	GCAGCAAATCGCTTGGGATTA	86



شکل ۱. مقایسه ی بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (SOD1, SOD2, Gpx1, catalase) در گروه‌های مختلف تیمار با غلظت‌های مختلف کروسین

## • بحث

بیشتر مطالعات معمولاً اثر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی من جمله کروسین را در شرایط اکسیداتیو و ملتهب بررسی کرده‌اند و کمتر گزارشی در مورد اثر آنتی‌اکسیدان‌ها در شرایط فاقد استرس وجود دارد. تنها مطالعه مشابه که نتایج آن در تضاد با پژوهش ما بود و به بررسی اثر کروسین بر سلول‌های عضله اسکلتی انسانی رده ی LHCN-M2 پرداخته بودند، نشان داد که فعالیت آنزیم‌های SOD و Gpx بعد از مواجهه با

نتایج پژوهش ما نشانگر کاهش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به دنبال تیمار سلول‌های طبیعی C2C12 با کروسین بود. هرچند در این مطالعه بیان آنزیم‌های کاتالاز، Gpx1 و SOD2 به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته بود، در مورد SOD1 اثری دیده نشد.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>، نسبت به شرایط بدون استرس بهبود یافته و همچنین تیمار سلول‌ها با ۱  $\mu$ M کروسین در شرایط بدون استرس با افزایش بیان SOD1، SOD2 و Gpx1 همراه بود (۱۹). در غیاب شرایط استرس مشاهده شده است که ترپنوئیدها با حذف رادیکال‌های آزاد به صورت مستقیم یا به صورت غیر مستقیم با تقویت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی مانند تعامل با عوامل رونویسی مثل Nrf2 فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود را انجام می‌دهند (۲۰). کروسین نیز که ترکیبی کاروتنوئیدی و محلول در آب است توسط مطالعات مختلف نشان داده شده است که با اهدای الکترون به رادیکال‌های آزاد می‌تواند اثرات آن‌ها را خنثی کند (۲۱). در این سو گزارش‌هایی مبنی بر مهار رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی به صورت وابسته به دوز ارائه شده است (۱۹، ۲۲). بنابراین احتمال دارد که کروسین بیشتر نقش آنتی‌اکسیدانی خود را به خصوص در شرایط بدون استرس به صورت غیرمستقیم ایفا کند که این امر مستلزم بررسی‌های بیشتر در آینده است.

از طرفی مطالعات متعددی بیان کرده اند که هم استرس اکسیداتیو و هم آنتی‌اکسیدان‌ها هردو در عدم توازن آنتی‌اکسیدانی نقش دارند که می‌تواند آسیب سلولی را به دنبال داشته باشد (۲۳-۲۶). در واقع بسیاری از محققین این حوزه بر این باورند که مصرف نا به جای آنتی‌اکسیدان‌ها باعث ایجاد "استرس آنتی‌اکسیدانی" می‌شود. عبارت "استرس آنتی‌اکسیدانی" اولین بار توسط Dundar and Aslan به منظور بیان اثرات مضر آنتی‌اکسیدان‌ها بیان شد (۲۷). در واقع، آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند مسیر فعال شدن میانجی‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی (SOD1, SOD2, CAT, Gpx1) را بلوکه کنند. ROS در سلول‌ها به صورت دوگانه عمل می‌کند، به این صورت که در مقادیر طبیعی به عنوان پیامبر ثانویه در آبشارهای سیگنالینگ داخل سلولی نقش دارد (۲۸، ۲۹). بنابراین، زمانی که مقداری ROS در اثر عملکرد طبیعی سلول تولید می‌شود، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی داخلی، سلول را در برابر اثرات مضر اکسیدان‌ها محافظت می‌کند و از طرفی اجازه می‌دهد که ROS کافی جهت حفظ اهداف مفید آن باقی بماند. سلول‌ها معمولاً چنین استرس اکسیداتیو خفیفی را تحمل می‌کنند (۲۹). براساس چنین دیدگاهی احتمال دارد که تیمار سلول‌های طبیعی C2C12 با کروسین باعث استرس آنتی‌اکسیدانی شده و کاهش بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به دنبال داشته یا کروسین به صورت غیر مستقیم نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا کرده است.

SOD1 اصلی ترین شکل SOD درون سلول است که ۸۰ درصد کل پروتئین SOD را شامل می‌شود. SOD1 بیشتر در فضای سیتوپلاسمی فعالیت دارد هرچند در فضای بین دو غشای میتوکندری و هسته نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد. اما SOD2 در فضای ماتریکس میتوکندری بیشتر فعالیت دارد (۳۰). در مطالعه‌ای که سلول‌های سرطان پستان رده‌ی MG-63 cells با ویتامین D به میزان ۱۰ nM تیمار شده بودند نشان داد که بیان ژن SOD1 کاهش و SOD2 افزایش پیدا کرده بود. این مطالعه پیشنهاد می‌کند که این تغییر واضح از SOD1 به SOD2 در نقطه زمانی ۲۴ ساعته حاکی از یک فرآیند جبران کننده میتوکندریایی است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی سلول از SOD1 به SOD2 تغییر می‌کند (۳۱). براساس چنین پیشنهادی و با توجه به نتایجی که ما به دست آوردیم احتمال می‌دهیم که اثر آنتی‌اکسیدانی کروسین به دلایل ناشناخته‌ای بیشتر به بیان SOD2 وابسته باشد هرچند که این احتمال نیز وجود دارد که عوامل مرتبط با تغییرات پس از ترجمه و microRNA‌های مؤثر در بیان ژن از دیگر عواملی هستند که بیان SOD1 تحت تأثیر قرار می‌گیرد. براساس مطالعات گذشته، کروسین از طریق افزایش بیان ژن و فعالیت این آنزیم‌ها نقش به سزایی را در کاهش استرس اکسیداتیو دارد (۳۲، ۳۳). در این مطالعه فعالیت آنزیم‌ها بررسی نشده است و احتمال می‌رود که فعالیت آنزیم‌ها متفاوت از نتایج مرتبط با بیان ژن تحت تأثیر کروسین قرار گرفته باشد. که تمام این موارد مستلزم آن است که مطالعات بیشتری در این زمینه در آینده صورت بگیرد.

همان طور که اشاره شد از محدودیت‌های اصلی مطالعه حاضر عدم بررسی هم زمان میزان بیان ژن و فعالیت آنزیم‌ها، عدم بررسی سطوح ROS، گلووتاتیون و مالون دی‌آلدهید است که بهتر می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی وابسته به ساختار مولکولی کروسین را روشن کند. همچنین عدم بررسی عوامل مرتبط با تغییرات پس از ترجمه و microRNA‌های مؤثر در بیان ژن نیز از دیگر محدودیت‌های این پژوهش است که توصیه می‌شود در مطالعات آتی به آن پرداخته شود.

در مجموع به نظر می‌رسد که تیمار سلول‌های طبیعی C2C12 با کروسین نه تنها کمکی به کاهش استرس اکسیداتیو خفیف ناشی از عملکرد طبیعی سلول نمی‌کند بلکه با مهار بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌تواند استرس ایجاد شده را نیز تشدید کند. به عبارتی کروسین در شرایط استرس سلولی بهتر موجب کنترل استرس اکسیداتیو می‌شود. همچنین نتایج این مطالعه می‌تواند به تصمیم‌گیری

صنایع غذایی دانشگاه شهید بهشتی صورت گرفته است. نویسندگان این مقاله از مدیریت محترم دانشکده، اساتید محترم و تمام کسانی که در اجرای این پروژه مساعدت نموده‌اند، سپاسگزاری می‌نمایند.

متخصصین تغذیه در زمینه تجویز مکمل‌های آنتی اکسیدانی کمک بهتری نماید.

**سپاسگزاری:** این پژوهش در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد، در آزمایشگاه تحصیلات تکمیلی دانشکده علوم تغذیه و

## • References

- Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine: Oxford University Press, USA; 2015.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The international journal of biochemistry & cell biology. 2007;39(1):44-84.
- Silva JP, Coutinho OP. Free radicals in the regulation of damage and cell death--basic mechanisms and prevention. Drug Discoveries & Therapeutics. 2010;4(3).
- Kisaoglu A, Borekci B, Yapca OE, Bilen H, Suleyman H. Tissue damage and oxidant/antioxidant balance. The Eurasian journal of medicine. 2013;45(1):47.
- Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. FEBS letters. 1996;384(3):240-2.
- Wang J, Vanga SK, Raghavan V. High-intensity ultrasound processing of kiwifruit juice: Effects on the ascorbic acid, total phenolics, flavonoids and antioxidant capacity. Lwt. 2019;107:299-307.
- Turkmen D. Serum bilirubin and uric acid antioxidant levels in rosacea patients. Journal of cosmetic dermatology. 2020;19(10):2717-20.
- Liu Z, Zhou T, Ziegler AC, Dimitrion P, Zuo L. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from molecular mechanisms to clinical applications. Oxidative medicine and cellular longevity. 2017;2017.
- Wojciat J, Zoltowska KM, Laskowska-Kaszub K, Wojda U. Oxidant/antioxidant imbalance in Alzheimer's disease: therapeutic and diagnostic prospects. Oxidative medicine and cellular longevity. 2018;2018.
- Romuk EB, Szczurek W, Oleś M, Gabrysiak A, Skowron M, Nowak P, et al. The evaluation of the changes in enzymatic antioxidant reserves and lipid peroxidation in chosen parts of the brain in an animal model of Parkinson disease. Advances in Clinical and Experimental Medicine. 2017;26(6):953-9.
- Pignatelli P, Menichelli D, Pastori D, Violi F. Oxidative stress and cardiovascular disease: new insights. Kardiologia Pol. 2018;76(4):713-22.
- Jenkins AJ, Hill MA, Rowley KG. Diabetes and oxidant stress. Atherosclerosis and Oxidant Stress: Springer; 2008. p. 123-58.
- Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative stress in cancer. Cancer Cell. 2020.
- Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Ziaee T, Danaee A. Protective effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats. J Pharm Pharm Sci. 2005;8(3):387-93.
- Bathaie SZ, Mousavi SZ. New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients. Critical reviews in food science and nutrition. 2010;50(8):761-86.
- Rahaiee S, Moini S, Hashemi M, Shojaosadati SA. Evaluation of antioxidant activities of bioactive compounds and various extracts obtained from saffron (*Crocus sativus* L.): a review. Journal of food science and technology. 2015;52(4):1881-8.
- Ben Salem I, Boussabbeh M, Kantaoui H, Bacha H, Abid-Essefi S. Crocin, the main active saffron constituent, mitigates dichlorvos-induced oxidative stress and apoptosis in HCT-116 cells. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie. 2016;82:65-71.
- Alavizadeh SH, Hosseinzadeh H. Bioactivity assessment and toxicity of crocin: a comprehensive review. Food and Chemical Toxicology. 2014;64:65-80.
- Nassar R, Eid S, Chahine R, Chabi B, Bonniou A, Sabban ME, et al. Antioxidant effects of lebanese *Crocus sativus* L. and its main components, crocin and safranal, on human skeletal muscle cells. European Journal of Integrative Medicine. 2020;40:101250.
- Bohn T. Carotenoids and markers of oxidative stress in human observational studies and intervention trials: Implications for chronic diseases. Antioxidants. 2019;8(6):179.
- Asdaq SMB, Inamdar MN. Potential of *Crocus sativus* (saffron) and its constituent, crocin, as hypolipidemic and antioxidant in rats. Applied biochemistry and biotechnology. 2010;162(2):358-72.
- Deng M, Li D, Zhang Y, Zhou G, Liu W, Cao Y, et al. Protective effect of crocin on ultraviolet B-induced dermal fibroblast photoaging. Molecular medicine reports. 2018;18(2):1439-46.
- Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? Biochemical Journal. 2007;401(1):1-11.
- Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. New England journal of medicine. 1996;334(18):1150-5.
- Miller III ER, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. Annals of internal medicine. 2005;142(1):37-46.
- Kouka P, Tekos F, Papoutsaki Z, Stathopoulos P, Halabalaki M, Tsantarliotou M, et al. Olive oil with high polyphenolic content induces both beneficial and harmful

- alterations on rat redox status depending on the tissue. *Toxicology Reports*. 2020;7:421-32.
27. Dundar Y, Aslan R. Antioxidative stress. *Eastern Journal of Medicine*. 2000;5(2):45-7.
28. Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci*. 2005;10(1-3):1881-96.
29. Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2013;2013.
30. Che M, Wang R, Li X, Wang H-Y, Zheng XS. Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. *Drug discovery today*. 2016;21(1):143-9.
31. Lisse TS. Vitamin D regulation of a SOD1-to-SOD2 antioxidative switch to prevent osteosarcoma transformation. *bioRxiv*. 2020:2020.03.03.975854.
32. Abou-Hany HO, Atef H, Said E, Elkashef HA, Salem HA. Crocin reverses unilateral renal ischemia reperfusion injury-induced augmentation of oxidative stress and toll like receptor-4 activity. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2018;59:182-9.
33. Amerizadeh F, Rezaei N, Rahmani F, Hassanian SM, Moradi-Marjaneh R, Fiuji H, et al. Crocin synergistically enhances the antiproliferative activity of 5-fluorouracil through Wnt/PI3K pathway in a mouse model of colitis-associated colorectal cancer. *Journal of cellular biochemistry*. 2018;119(12):10250-61.

## Effects of Crocin Down-Regulation on Enzymatic Antioxidant Profile in C2C12 Cells

Hosseini Balam F<sup>1</sup>, Shimi Gh<sup>2</sup>, Zand H<sup>3</sup>, Ghorbani A<sup>\*4</sup>

- 1- Master Student of Nutrition Sciences, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 2- PhD student in Nutrition Sciences, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 3- Professor of Biochemistry, Department of Cellular and Molecular Nutrition, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
- 4- \*Corresponding author: Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Nutrition, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: Arman.ghorbani@sbm.ac.ir

---

Received 11 Jul, 2021

Accepted 10 Oct, 2021

---

**Background and Objectives:** Free radicals are produced by cell normal metabolism in normal physiological conditions such as the process of cellular respiration, which is scavenged by enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems. Intake of antioxidants from food sources has always been considered in nutrition research. Therefore, the aim of the present study was to investigate antioxidant effects of crocin on the expression profile of genes involved in the enzymatic antioxidant systems in muscle cells.

**Materials & Methods:** After culturing and several passages, C2C12 muscle cells were differentiated into myotube cells and treated with various concentrations of crocin (10, 25, 50 and 100 µM) for 24 h. Gene expression of antioxidant enzymes (SOD1, SOD2, Gpx1 and catalase) was assessed using real-time polymerase chain reaction.

**Results:** Crocin significantly decreased expression of SOD2, Gpx1 and catalase genes ( $p < 0.05$ ) with no effects on expression of SOD1 gene.

**Conclusion:** Findings of this study showed that receiving exogenous antioxidants such as crocin could possibly decrease needs of expression of enzymatic antioxidant genes through strengthening non-enzymatic antioxidant defense systems. However, further studies are needed to verify the results.

**Keywords:** Antioxidants, Free radicals, Crocin, C2C12 cells