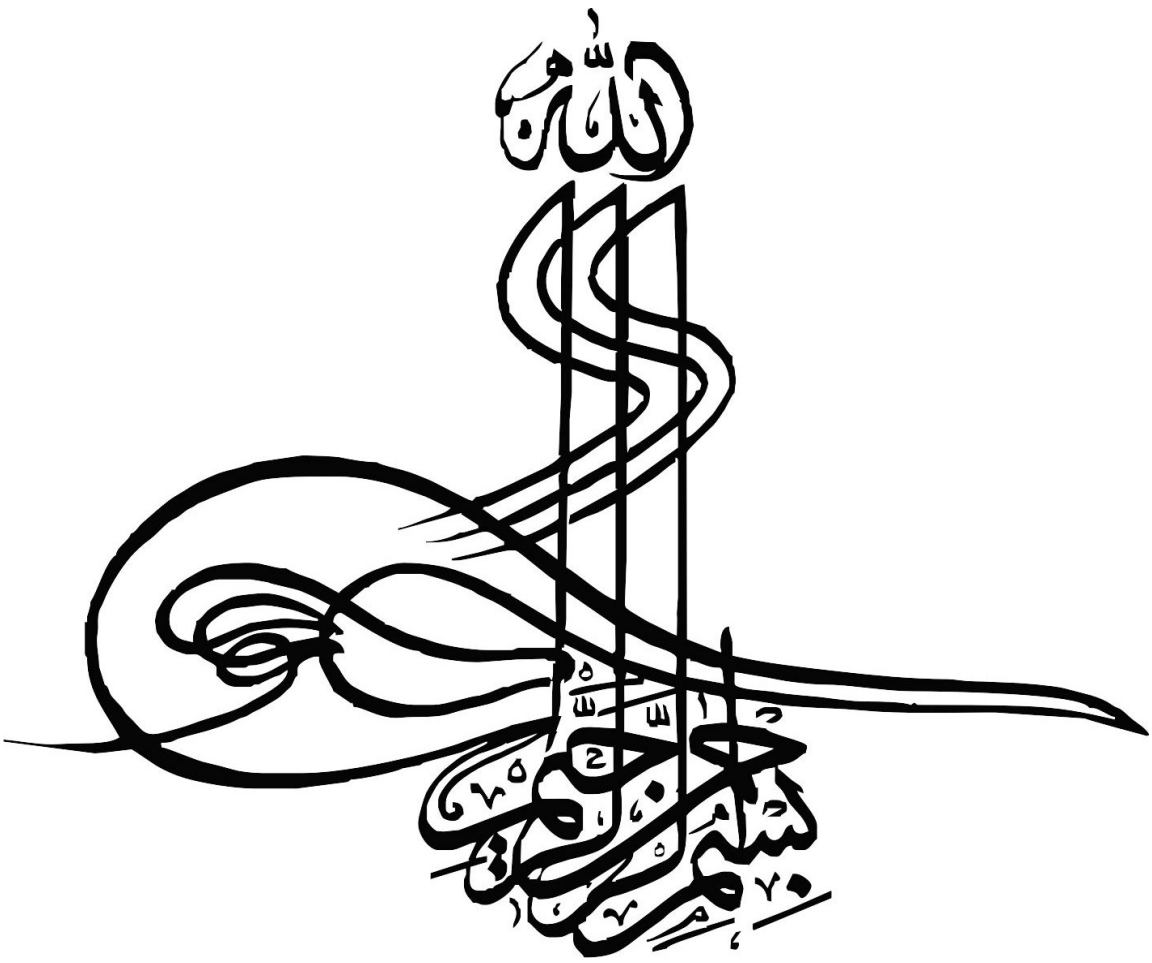
الله
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تربیت معلم

دانشکده علوم–گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد زیست شناسی– علوم گیاهی

گرایش سلولی تکوینی گیاهی

بررسی مقایسه ای خواص ضد سرطانی عصاره برگ های گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) ضمن مراحل تکوینی برگ ها

اساتید راهنما:

دکتر احمد مجد

دکتر مونا سلیمی

اساتید مشاور:

دکتر سعید آیریان

دکتر سید محمد اطیابی

دانشجو:

زهرا سپهدار

مهر ۱۳۸۹

تقدیم به پدر و مادر عزیز

و

همسر مهربانم

و همه شیفتگان علم.....

تقدیر و تشکر

سپاس و ستایش بی‌کران ایزد را که بشریت را به چراغ فروزان اندیشه آراست.

سپاس و تقدیر فراوان تقدیم به استاد فرزانه‌ام جناب آقای دکتر احمد مجد که با راهنمایی‌ها و نکته سنجی‌های عالمانه ایشان کار تدوین پایان‌نامه به پایان نیک خود انجامید.

تشکر و قدردانی فراوان اینجانب تقدیم به سرکار خانم دکتر مونا سلیمی که طی انجام پایان‌نامه از ایشان بسیار آموختم و پژوهش حاضر جز به تدبیر خردمندانه و پیگیری های مستمر ایشان حاصل نمی‌گشت.

از جناب آقای دکتر سعید آیریان و جناب آقای دکتر سید محمد اطیابی که مشاوره این پایان‌نامه را بر عهده گرفتند بسیار سپاسگزارم.

از جناب آقای دکتر عبدالکریم چهرگانی داور خارجی و جناب آقای دکتر فرخ قهرمانی‌نژاد داور داخلی که مرا مورد لطف قرار دادند کمال تشکر را دارم.

از جناب آقای دکتر کیهان آزادمنش که جهت انجام آزمون‌های فلوسایتومتری از راهنمایی‌های ارزنده و نیز امکانات آزمایشگاه ایشان استفاده نمودم بسیار سپاسگزارم.

از کارکنان محترم انستیتو پاستور سرکار خانم طیبه سهرابی و جناب آقای محمدحسین هدایتی و نیز جناب آقای مهدی نجاتی عضو محترم هیئت علمی انستیتو پاستور که کمال همکاری را با اینجانب داشتند بی نهایت سپاسگزارم.

همچنین بر خود لازم می‌دانم از معلمین و اساتید بزرگواری که از چراغ علم آن‌ها شمعی برگرفته‌ام تقدیر و تشکر بجای آورم و مراتب سپاس و احترام خود را به آن‌ها ابراز دارم.

از همسرم به خاطر حمایت‌ها و همراهیشان بسیار سپاسگزارم و برای ایشان آرزوی سلامت و موفقیت دارم.

چکیده:

جنس گردو، متعلق به خانواده ژوگلانداسه (Juglandaceae) دارای چندین گونه می‌باشد که در سراسر جهان پراکنش دارند. شناخته شده‌ترین عضو این خانواده، گردوی ایرانی یا گردوی معمولی (*Juglans regia* L.) درختانی برگ‌ریز هستند که اساسا در مناطق معتدل جهان از جمله آسیا یافت می‌شوند. گردو علاوه بر مصرف غذایی و تهیه روغن، تاریخچه درمانی دیرینه دارد و در طب عوام در درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده بوده است. برگ‌های این گیاه برای درمان یبوست، سرفه‌های مزمن، تنگی نفس، اسهال، سوء هاضمه و غیره استفاده می‌شوند. مطالعه حاضر به بررسی فعالیت ضد سرطانی عصاره تام برگ‌های گردو در مراحل تکوین آن‌ها و نیز مقایسه این خاصیت در بخش‌های (فراکشن‌های) استخراج شده با حلال‌های دارای قطبیت متفاوت می‌پردازد. خواص ضد سرطانی این عصاره‌ها در مقابل رده‌های سلولی MCF-7 (Human breast adenocarcinoma)، HT-29 (Human colon adenocarcinoma) و BHY (Human oral squamous carcinoma) بررسی شد. تقریبا همه عصاره‌ها (به جز فراکشن هگزانی و متانولی) اثرات سمیت سلولی مشخصی را بر روی رده‌های سلولی ذکر شده در مقایسه با کنترل منفی نشان دادند. هیچ اختلاف معنا داری در اثرات سمیت سلولی برگ‌های جوان، میان‌سال و پیر مشاهده نشد. هدف دیگر این مطالعه، اندازه گیری میزان ترکیبات فنولی در برگ‌های گردوی ایرانی بود. میزان فنول کل (توتال)، فلاونوئیدها و تانن‌های متراکم در برگ‌های جوان، میان‌سال و پیر با روش‌های Folin-Ciocalteu، Aluminum chloride colorimetric و Butanol-HCl اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که برگ‌های جوان و فراکشن متانولی بیشترین میزان ترکیبات فنولی را در خود دارند.

کلمات کلیدی: گردوی ایرانی، خواص ضد سرطانی، مراحل تکوین، ترکیبات فنولی.

فهرست عناوین

فصل اول: مقدمه ۱

۱-۱-پیشگفتار ۲

۱-۲- هدف..... ..... ۳

۱-۳- گیاه شناسی..... ۳

۱-۳-۱- رده بندی گیاه ۳

۱-۳-۲- معرفی گیاه..... ۴

۱-۳-۳- راسته راش..... ۵

۱-۳-۴- خانواده گردو..... ۵

۱-۳-۵- گیاهان و محصولات با ارزش اقتصادی..... ۶

۱-۳-۶- ترکیبات شیمیایی..... ۷

۱-۳-۷- تاریخچه درمانی..... ۸

۱-۳-۸- کاربردهای دارویی..... ۹

۱-۴- متابولیت‌های ثانویه گیاهی ۱۰

۱-۴-۱- آلکالوئیدها ۱۱

۱-۴-۲- فلاون‌ها و فلاونوئیدها..... ۱۲

۱-۴-۳- تانن‌ها... ..... ۱۲

۱-۴-۴- فنولیدها..... ۱۳

۱-۵- عوامل موثر بر میزان متابولیت‌های ثانویه ۱۳
۱-۶- فیتوشیمی ۱۴
۱-۷- عصاره‌گیری ۱۵
۱-۷-۱- خصوصیات حلال مورد استفاده ۱۶
۱-۸- کشت سلول و بافت ۱۷
۱-۸-۱- مزایا و معایب کشت سلولی ۱۷
۱-۹- چرخه سلولی ۱۸
فصل دوم: مواد و روش‌ها ۲۰
۲-۱- جمع آوری گیاه ۲۱
۲-۲- عصاره گیری ۲۱
۲-۲-۱- مواد، وسایل و دستگاه‌ها ۲۱
۲-۲-۲- استخراج عصاره‌های تام ۲۲
۲-۲-۳- استخراج فراکشن‌های مختلف ۲۲
۲-۳- آماده سازی نمونه‌ها ۲۳
۲-۴- آزمایش‌های سمیت سلولی ۲۳
۲-۴-۱- مواد، وسایل و دستگاه‌ها ۲۳
۲-۴-۲- رده‌های سلولی مورد استفاده ۲۵
۲-۴-۳-آماده سازی محلول‌ها ۲۵

۲-۴-۳-۱- محیط کشت ۲۵
۲-۴-۳-۲- بافر PBS ۲۶
۲-۴-۳-۳- محیط انجماد سلول ۲۶
۲-۴-۳-۴- Trypsin-EDTA ۲۷
۲-۴-۳-۵- محلول تریپان بلو ۲۷
۲-۴-۳-۶- محلول MTT ۲۷
۲-۴-۴- تکنیک‌های کشت سلولی ۲۸
۲-۴-۴-۱- ذوب کردن ۲۸
۲-۴-۴-۲- پاساژ سلولی ۲۹
۲-۴-۴-۳- تعویض محیط کشت ۳۰
۲-۴-۴-۴- منجمد کردن ۳۰
۲-۴-۴-۵- شمارش سلولی مستقیم به روش Trypan blue dye exclusion ۳۱
۲-۵- آزمایش کمی سنجش متابولیکی تکثیر سلولی و تعیین حیات سلولی MTT ۳۳
۲-۵-۱- روش انجام آزمون ۳۵
۲-۶- آزمایش‌های فلوسایتومتری ۳۶
۲-۶-۱- اساس فلوسایتومتری ۳۶
۲-۶-۲- ارزیابی چرخه سلولی با فلوسایتومتری ۳۶
۲-۶-۳- مواد، وسایل و دستگاه‌ها ۳۷

۲-۶-۴- آماده سازی مواد ۳۷
۲-۶-۵- روش کار ۳۸
۲-۷- آزمایش‌های فیتوشیمیایی ۳۹
۲-۷-۱- مواد، وسایل و دستگاه‌ها ۴۰
۲-۷-۲- استخراج ترکیبات فنولی ۴۰
۲-۷-۳- اندازه گیری توتال فنول ۴۱
۲-۷-۳-۱- آماده سازی معرف‌ها ۴۱
۲-۷-۳-۲- تهیه منحنی استاندارد ۴۲
۲-۷-۳-۳- سنجش توتال فنول ۴۲
۲-۷-۴- اندازه گیری تانن‌های متراکم ۴۲
۲-۷-۴-۱- آماده سازی معرف‌ها ۴۳
۲-۷-۴-۲- سنجش تانن‌های متراکم ۴۳
۲-۷-۵- اندازه گیری فلاونوئیدها ۴۴
۲-۷-۵-۱- آماده سازی معرف‌ها ۴۴
۲-۷-۵-۲- تهیه منحنی استاندارد ۴۴
۲-۷-۵-۳- سنجش فلاونوئیدها ۴۵
۲-۸- مطالعات بافت‌شناسی ۴۵
۲-۸-۱- مواد و دستگاه‌ها ۴۵

۲-۸-۲- آماده سازی محلول‌ها ۴۶
۲-۸-۳- روش کار ۴۶
۲-۹- آزمون‌های آماری ۴۷
فصل سوم: نتایج ۴۸
۳-۱- نتایج آزمون سمیت سلولی به صورت مقادیر IC50 مربوط به هر عصاره بر سلول‌های مورد مطالعه ۴۹
۳-۲- نتایج آزمون‌های فلوسایتومتری ۷۱
۳-۲-۱- بررسی چرخه سلولی رده سلولی MCF-7 به روش فلوسایتومتری ۷۱
۳-۳- نتایج عصاره گیری با حلال‌های مختلف ۷۵
۳-۴- نتایج آزمون‌های فیتوشیمیایی ۷۵
۳-۵- نتایج مطالعات بافت‌شناسی ۸۲
فصل چهارم: نتیجه گیری و بحث ۸۷
۴-۱- بررسی سمیت سلولی عصاره‌های مورد مطالعه به روش MTT ۸۸
۴-۱-۱- مطالعه تاثیر سن برگ‌ها بر میزان سمیت سلولی ۸۹
۴-۱-۲- مطالعه تاثیر نوع حلال بر میزان سمیت سلولی ۸۹
۴-۱-۳- مطالعه تاثیر مدت زمان تیمار بر میزان سمیت سلولی ۹۰
۴-۱-۴- مطالعه تیمار رده سلولی NIH 3T3 با فراکشن کلروفرمی ۹۱
۴-۲- بررسی چرخه سلولی رده سلولی MCF-7 به روش فلوسایتومتری ۹۱

۴-۳- بررسی فیتوشیمیایی عصاره‌های مورد مطالعه ۹۲
۴-۴- مطالعه بافت شناسی برگ‌های گردوی ایرانی ۹۳
۴-۵- پیشنهادها ۹۵
فصل پنجم: فهرست منابع ۹۶

فهرست جدول‌ها

جدول ۳ -۱- مقادیر IC50 مربوط به هر یک از عصاره‌ها بر روی رده‌های سلولی MCF- 7، BHY و HT- 29 در زمان‌های مورد مطالعه (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ۵۰

جدول ۳-۲- بررسی آماری تاثیر مدت زمان تیمار بر روی IC50 هر یک از عصاره‌ها بر رده سلولی سرطانی HT- 29 ..... ۵۲

جدول ۳- ۳- بررسی آماری تاثیر مدت زمان تیمار بر روی IC50 هر یک از عصاره‌ها بر رده سلولی سرطانی BHY ۵۴

جدول ۳-۴- بررسی آماری تاثیر مدت زمان تیمار بر روی IC50 هر یک از عصاره‌ها بر رده سلولی سرطانی MCF- 7 ..... ۵۶

جدول ۳-۵- بررسی آماری IC50 عصاره‌های تام در سه مرحله سنی در هر یک از زمان‌های مورد مطالعه بر رده سلول HT- 29 ..... ۵۸

جدول ۳- ۶- بررسی آماری IC50 عصاره‌های تام در سه مرحله سنی در هر یک از زمان‌های مورد مطالعه بر ر رده سلولی BHY ۶۰

جدول ۳- ۷- بررسی آماری IC50 عصاره‌های تام در سه مرحله سنی در هر یک از زمان‌های مورد مطالعه بر رده سلولی MCF- 7 ..... ۶۲

جدول ۳- ۸- بررسی آماری IC50 عصاره تام و فراکشن‌ها در هر یک از زمان‌های مورد مطالعه بر رده سلولی HT- 29 ..... ۶۴

جدول ۳- ۹- بررسی آماری IC50 عصاره تام و فراکشن‌ها در هر یک از زمان‌های مورد مطالعه بر رده سلولی BHY ۶۶

جدول ۳-۱۰- بررسی آماری IC50 عصاره تام و فراکشن‌ها در هر یک از زمان‌های مورد مطالعه بر

رده سلولی MCF- 7 ..... ۶۸

جدول ۳-۱۱- بررسی آماری اثر غلظت‌های مختلف عصاره کلروفرمی در مدت زمان تیمار ۷۲ ساعت بر رده سلولی NIH 3T3. ..... ۷۰

جدول ۳- ۱۲- بررسی آماری تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره کلروفرمی بر چرخه سلولی بر رده سلولی MCF- 7 در مدت تیمار ۲۴ ساعت به روش فلوسایتومتری..... ۷۴

جدول ۳ - ۱۳- بازدهی عصاره‌های تام و فراکشن‌ها..... ۷۵

جدول ۳ - ۱۴- مقدار ترکیبات فنولی عصاره‌های تام و فراکشن‌ها ۷۶

جدول ۳- ۱۵- بررسی آماری میزان ترکیبات فنولی در عصاره‌های تام برگ‌ها در سه مرحله سنی برگ‌ها ۷۸

جدول ۳- ۱۶- بررسی آماری میزان ترکیبات فنولی در عصاره تام و فراکشن‌ها..... ۸۰

فهرست شکل‌ها

شکل ۳-۱- تصاویر مربوط به بررسی چرخه سلولی رده سلولی MCF- 7، قبل و پس از تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره کلروفرمی..... ۷۱

شکل ۳-۲- تصاویر مربوط به برش عرضی پهنک برگ‌های گردوی ایرانی..... ۸۳

شکل ۳-۳- تصاویر مربوط به برش عرضی رگبرگ اصلی برگ‌های پیر گردوی ایرانی..... ۸۴

شکل ۳-۴- تصاویر مربوط به برش عرضی رگبرگ اصلی برگ‌های میان‌سال گردوی ایرانی..... ۸۵

شکل ۳-۵- تصاویر مربوط به برش عرضی رگبرگ اصلی برگ‌های جوان گردوی ایرانی ۸۶

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱- مقایسه آماری IC50 عصاره‌های مورد مطالعه در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی رده سلول سرطانی HT- 29 ..... ۵۱

نمودار ۳-۲- مقایسه آماری IC50 عصاره‌های مورد مطالعه در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی رده سلول سرطانی BHY ۵۳

نمودار ۳- ۳- مقایسه آماری IC50 عصاره‌های مورد مطالعه در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی رده سلول سرطانی MCF- 7 ..... ۵۵

نمودار ۳- ۴- مقایسه آماری IC50 عصاره‌های تام در سه مرحله سنی (جوان، میان‌سال و پیر) در هر یک از زمان‌های مورد مطالعه بر روی رده سلول سرطانی HT- 29 ..... ۵۷

نمودار ۳-۵- مقایسه آماری IC50 عصاره‌های تام در سه مرحله سنی (جوان، میان‌سال و پیر) در هر یک از زمان‌های مورد مطالعه بر روی رده سلول سرطانی BHY ۵۹

نمودار ۳- ۶- مقایسه آماری IC50 عصاره‌های تام در سه مرحله سنی برگ‌ها (جوان، میان‌سال و پیر) در هر یک از زمان‌های مورد مطالعه بر روی رده سلول سرطانی MCF- 7 ..... ۶۱

نمودار ۳- ۷- مقایسه آماری IC50 عصاره تام و فراکشن‌ها (کلروفرمی، اتیل استاتی و متانولی) در هر یک از زمان‌های مورد مطالعه بر روی رده سلول سرطانی HT- 29 ..... ۶۳

نمودار ۳-۸- مقایسه آماری IC50 عصاره تام و فراکشن‌ها (کلروفرمی، اتیل استاتی و متانولی) در هر یک از زمان‌های مورد مطالعه بر روی رده سلول سرطانی BHY ۶۵

نمودار ۳-۹- مقایسه آماری IC50 عصاره تام و فراکشن‌ها (کلروفرمی، اتیل استاتی و متانولی) در هر یک از زمان‌های مورد مطالعه بر روی رده سلول سرطانی MCF- 7 ..... ۶۷

نمودار ۳-۱۰- بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره کلروفرمی (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر) در مدت زمان تیمار ۷۲ ساعت بر رده سلول نرمال NIH 3T3 ..... ۶۹

نمودار۳-۱۱- مقایسه تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره کلروفرمی بر فازهای چرخه سلولی در رده سلولی MCF- 7 در مدت تیمار ۲۴ ساعت به روش فلوسایتومتری ۷۳

نمودار۳-۱۲- مقایسه آماری میزان ترکیبات فنولی در عصاره‌های تام برگ‌های جوان، میان‌سال و پیر ۷۷

نمودار۳-۱۳- مقایسه آماری میزان ترکیبات فنولی در عصاره تام و فراکشن‌ها ۷۹

فهرست پیوست‌ها

پیوست ۱: ویژگي هاي سلول NIH 3T3 بر اساس NCBI ۱
پیوست ۲: ویژگي هاي سلول MCF-7 بر اساس NCBI ۲
پیوست ۳: ویژگي هاي سلول HT29 بر اساس NCBI ۳
پیوست ٤: ویژگي هاي سلول BHY بر اساس DSMZ ۴

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

مقدمه

۱- ۱- پیش‌گفتار

گیاهان دارویی از منابع طبیعی بسیار مهمی هستند که از دیرباز مورد توجه بوده اند. انسان برای تسکین دردها و درمان بسیاری از بیماری‌ها به استفاده از گیاهان روی آورده است و به مرور زمان با پیشرفت علوم، آگاهی درباره گیاهان افزایش یافته است. عصاره‌گیری و توصیف ترکیبات فعال در گیاهان دارویی، منتهی به کشف داروهای جدید با ارزش درمانی بالا شد. از چنین داروهایی که سال‌ها استفاده شده و هنوز هم اهمیت دارند می توان به آسپرین اشاره کرد که در آغاز به عنوان سالیسیلیک اسید در برگ‌ها و پوست درخت بید برای تسکین درد و عفونت کشف شد. مثال دیگر داروی ضد سرطان تاکسول می‌باشد که در آغاز از پوست درخت‌های سرخدار کشف شد (Jamal et al.,2010). از سوی دیگر قرار گرفتن سرزمین پهناور ایران در موقعیت خاص کره زمین، سبب برخوردار ی آن از آب و هوای متنوع شده که به همراه خاک‌های متفاوت در هر منطقه، سبب ایجاد فلور کم نظیر در این سرزمین شده است. این بدان معنا است که شرایط جغرافیایی ایران برای رشد اکثر گونه‌های موجود در دنیا مناسب است. بررسی فیتوشیمیایی پژوهشگرها بر روی ۱۷۰۰ گونه گیاهی نشان داده است که گیاهان ایران از کمیت و کفیت بسیار خوبی برخوردارند. شناسایی ترکیبات و مواد موثر این فلور کم نظیر که دنیایی از رمز و رازها در پشت پرده دارد از ضروریات این زمان است (رجبی، ۱۳۸۶).