**۶۰درصد هزینه های مالی این پایان نامه توسط مرکز داروهای گیاهی رازی دانشگاه علوم پزشکی لرستان تامین گردیده است.**

دانشگاه پیام نور

دانشکده : علوم پایه

مرکز : تهران شرق

**پایان نامه**

**برای دریافت مدرک کارشناسی ارشد**

**رشته : بیوشیمی**

**گروه** : زیست شناسی

**عنوان پایان نامه:**

# بررسی اثر آنتی اکسیدانی و سیتوتوکسیسیتی عصاره آبی و الکلی میوه نسترن کوهی بر روی لاین سلولی U937

صید جعفر فرهادی

**استاد راهنما: دکتر ابراهیم فلاحی**

**استاد مشاور:دکتر رضا حاج حسینی**

**بهمن ماه ۱۳۹۰**

**اینجانب** صیدجعفر فرهادی **دانشجوی ورودی سال** ۱۳۸۶ **مقطع کارشناسی ارشد رشته** بیو شیمی **گواهی می نمایم چنانچه در پایان نامه خود از فکر، ایده و نوشته دیگری بهره گرفته ام با نقل قول مستقیم یا غیر مستقیم منبع و ماخذ آن را نیز درجای مناسب ذکر کرده ام .بدیهی است مسئولیت تمامی مطالبی که نقل قول دیگران نباشد بر عهده خویش می دانم و جوابگوی آن خواهم بود.**
**دانشجو تأیید می نماید که مطالب مندرج دراین پایان نامه ( رساله ) نتیجه تحقیقات خودش می باشد و درصورت استفاده از نتایج دیگران مرجع آن را ذکر نموده است.**

**دانشجو خانوادگی نام و نام** : صید جعفر فرهادی
تاریخ و امضاء

**اینجانب** صید جعفر فرهادی **دانشجوی ورودی سال** ۱۳۸۶ **مقطع کارشناسی ارشدرشته** بیوشیمی **گواهی می نمایم چنانچه براساس مطالب پایان نامه خود اقدام به انتشارمقاله، کتاب، و ... نمایم ضمن مطلع نمودن استاد راهنما، با نظر ایشان نسبت به نشر مقاله،کتاب، و ... و به صورت مشترک و با ذکر نام استاد راهنما مبادرت نمایم.**

**نام و نام خانوادگی دانشجو**: صید جعفر فرهادی
**تاریخ و امضا**
**کلیه حقوق مادی مترتب از نتایج مطالعات ، آزمایشات و نو آوری ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه پیام نور می باشد.**

**بهمن ماه ۱۳۹۰**

**تقدیم به تمامی پویندگان راه علم و دانش**

**تقدیم به همسر ودخترم**

**بدینوسیله از تمامی کسانی که این حقیر را در مراحل تدوین ، گرد آوری وانجام این پایان نامه یاری نموده اند سپاسگزاری می نمایم. همچنین برخود لازم می دانم از همکاری صمیمانه و بی دریغ جناب آقای فواد عبداله پور و سرکار خانم مریم قاسمی تشکر ویژه بنمایم.از جناب آقای دکتر ابراهیم فلاحی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی لرستان که استاد راهنمای اینجانب بودند نیز تقدیر وتشکر می کنم.**

## چـــکیـــده


**بررسی اثر آنتی اکسیدانی و سیتوتوکسیسیتی عصاره آبی والکلی میوه نسترن کوهی بر روی لاین سلولی U937**

**مقدمه**: گونه های فعال اکسیژن (ROS) نظیر رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$) و یون سوپراکسید ($O_2^{\cdot -}$) می‌توانند برای سلول ها کشنده باشند. رادیکال ($OH^{\cdot}$) به پروتئین ها، DNA ، لیپیدهای غشاها که حاوی باند های چند غیراشباع باشند و ترکیبات سلولی دیگر آسیب اکسیداتیو وارد می کند. در بعضی موارد، ROS به طور مستقیم باعث ایجاد یک بیماری می شود، در موارد دیگر نظیر آرتریت ممکن است به طورغیرمستقیم باعث ایجاد آسیب سلولی شود. مواد غذایی غنی از ویتامین ها وسبزیجات به علت دارا بودن ویتامین های آنتی اکسیدان نظیر ویتامینC، ویتامین E و β کاروتن ها، ریسک بیماری ها و صدمات ناشی از ROS را پایین می آورد.

**هدف**: در این مطالعه **اثر آنتی اکسیدانی و سیتوتوکسیسیتی عصاره آبی والکلی میوه نسترن کوهی بر روی لاین سلولی U937**(در مسیر فنتون ) بررسی شد.

بررسی از طریق آنالیز سطوح لیپید پراکسیداسیون و میزان گلوتاتیون (GSH) انجام شد.

**روش**: لاین سلولی U937 (سلول های لوکمیای انسانی) از انستیتو پاستور تهیه شد. برای ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد: در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، فشار دی اکسید کربن ۵٪ و محیط کشت DMEM کامل. (محیط DMEM کامل حاوی FCS ۱۰٪ وپنی سیلین ۱۰۰ U/ml و استرپتومایسین ۱۰۰ µg/ml می باشد). سلولها توسط آهن (50µM) یا مس ( 50 µM) و $H_2O_2$ (0.01mM) دچار استرس اکسیداتیو شدندو به آن ها از هر کدام از مواد آنتی اکسیدان مورد نظر (عصاره آبی و الکلی ) به طور جداگانه غلظت های ۲۵،۵۰،۱۰۰ میکرومولار اضافه شد. که البته به نمونه های مربوط به کنترل آنتی اکسیدان اضافه نشد. لیپید پراکسیداسیون توسط روش تیوباربیتوریک اسید سنجیده شد و سطوح گلوتاتیون توسط روش (Tietze) اندازگیری شد. میزان پروتئین نیز براساس روش برادفورد تعیین شد.

**نتایج**: نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره آبی و الکلی میوه نسترن کوهی میزان لیپید پراکسیداسیون را نسبت به نمونه حاوی مواد اکسیدان (که فاقد آنتی اکسیدان است) در لاین سلولی U937 کاهش داد و در مقابل سطح گلوتاتیون را نسبت به نمونه حاوی مواد اکسیدان (که فاقد آنتی اکسیدان است) در لاین سلولی U937 افزایش داد.

**نتیجه گیری**: نتایج نشان می دهد که عصاره آبی و الکلی میوه نسترن کوهی لیپیدپراکسیداسیون را به شدت کاهش داد و میزان گلوتاتیون را تا حدودی افزایش داد.



کلید واژه ها: **میوه نسترن کوهی، لیپیدپراکسیداسیون ؛گلوتاتیون ؛ لاین سلولیU937**

## فهرست مطالب

عنوان | صفحه


**فـصل اول : کـلیات** ..... ۱

مقـــدمـــه ..... ۲

۱-۱-بیان مسأله ..... ۳

۱-۲-اهمیت و ضرورت انجام تحقیق ..... ۳

۱-۳-بررسی منابع ..... ۵

۱-۴-هدف اصلی ..... ۷

۱-۵-اهداف فرعی ..... ۷

۱-۶-هدف کاربردی ..... ۷

۱-۷-سؤالات تحقیق ..... ۷

۱-۸-فرضیه‌های تحقیق ..... ۸

**فـصل دوم :اصول و مبانی تحقیق** ..... ۹

۲-۱-رادیکال های آزاد ..... ۱۰

۲-۱-۱- منشا رادیکالهای آزاد ..... ۱۱

۲-۱-۱-۱- منابع درونی ..... ۱۲

۲-۱-۱-۲- منابع بیرونی ..... ۱۴

۲-۱-۲- انواع رادیکالهای آزاد ..... ۱۵

۲-۱-۲-۱- رادیکالهای آزاد اکسیژن دار ..... ۱۵

۲-۱-۲-۲- رادیکال آزاد آنیون سوپراکساید ..... ۱۵

۲-۱-۲-۳- رادیکال هیدروکسیل ..... ۱۶

۲-۱-۲- ۴- رادیکال آزاد پراکسی..... ۱۷
۲-۱-۲- ۵- رادیکال آزاد نیتریک اکساید..... ۱۷
۲-۱-۲-۶- رادیکال آزاد $RO^{\cdot}$..... ۱۸
۲-۱-۲- ۷- ازن ($O3$)..... ۱۸
۲-۱-۲-۸- اکسیژن منفرد ($O2$)..... ۱۸
۲-۱-۲-۹- رادیکالهای آزاد فلزی..... ۱۹
۲-۱-۳- نقش رادیکالهای آزاد در بیماریها..... ۱۹
۲-۱-۳-۱- اثر رادیکالهای آزاد بر روی پروتئین، DNA واسید نوکلئیک..... ۱۹
۲-۱-۳-۲- اثر رادیکالهای آزاد روی چربی ها..... ۲۰
۲-۲- ترکیبات آنتی اکسیدان..... ۲۱
۲-۲-۱- تعریف ترکیبات آنتی اکسیدان..... ۱۹
۲-۲-۲- آنتی اکسیدانهای مهار کننده..... ۲۸
۲-۲-۲-۱- VIT E (توکوفرول)..... ۲۸
۲-۲-۲-۲- VIT C (آسکوربیک اسید)..... ۲۹
۲-۲-۲-۳- بتاکاروتن..... ۳۰
۲-۲-۲-۴- (UBI-Q)UBIQUINONES(CO-ENZYME Q) AND UBIQUINOLS ..... ۳۰
۲-۲-۲-۵- اسید اوریک..... ۳۰
۲-۲-۲-۶- بیلی روبین..... ۳۱
۲-۲-۳- آنتی اکسیدانهای پیشگیری کننده..... ۳۱
۲-۲-۳-۱- غیر فعال کردن یونهای فلزی انتقال دهنده الکترون..... ۳۲
۲-۲-۳-۲- کاتالیز تخریب هیدروپراکساید..... ۳۳
۲-۲-۳-۳- جاذب های UV..... ۳۴

۲-۳- اکسیداتیواسترس (OXIDATIVE STRESS) ..... ۳۴
۲-۳-۱- علل اکسیداتیواسترس ..... ۳۴
۲-۳-۲- نقش گلوتاتیون و کاتالاز در اکسیداتیواسترس ..... ۳۵
۲-۴- پراکسیداسیون چربی ها (LIPID PEROXIDATION) ..... ۳۶
۲-۴-۱- لیپیدپراکسیداسیون حاصل از فعالیت رادیکال آزاد ..... ۳۶
۲-۴-۲- فاکتورهای کنترل کننده لیپیدپراکسیداسیون در بافت ها ..... ۳۸
۱-۴-۳- محصولات پراکسیداسیون چربی ها ..... ۳۹
۲-۴-۴- روش های مختلف سنجش میزان لیپید پراکسیداسیون: ..... ۴۰
۲-۴-۵- مکانیسم تشکیل مالون دی آلدئید ..... ۴۳
۲-۴-۶- متابولیسم مالون دی آلدئید ..... ۴۶
۲-۴-۷- تعیین مالون دی آلدئید به عنوان مارکرلیپیدپراکسیداسیون ..... ۴۷
۲-۴-۸- مشتقات MDA ..... ۴۸
۲-۵- گلوتاتیون ..... ۴۸
۲-۵-۱- بیوسنتز و متابولیسم گلوتاتیون ..... ۴۹
۲-۵-۲- اعمال گلوتاتیون ..... ۵۲
۲-۶- کشت سلول حیوانی ..... ۵۶
۲-۶-۱- مفاهیم ..... ۵۶
۲-۶-۲- مورفولوژی سلول ..... ۵۷
۲-۶-۳ کاربرد (APPLICATION) ..... ۵۷
۲-۶-۴- محیط کشت ..... ۵۸
۲-۷- نسترن کوهی ..... 59
۲-۷-۱- نام های گیاه ..... ۵۹

۲-۷-۲- مشخصات گیاه ..... ۶۰
۲-۷-۳- مهم ترین خواص درمانی و موارد مصرف ..... ۶۲
۲-۸-۴- روشهای عصاره گیری ..... ۶۶
**فصل سوم : مواد، دستگاه ها و روش ها** ..... ۶۷
۳-۱- دستگاه ها و وسایل مورد استفاده ..... ۶۸
۳-۲- مواد ..... ۶۹
۳-۳- طرز تهیه بافرهاو محلول ها ..... ۷۰
۳-۳-۱- موادی که به عنوان آنتی اکسیدان مورد استفاده: ..... ۷۰
۳-۳-۲- موادی که به عنوان اکسیدان مورد استفاده: ..... ۷۰
۳-۳-۳- بافرها و محلول های مورد استفاده در انجام آزمایشات: ..... ۷۰
۳-۴- تهیه، کشت و آماده سازی سلول ها برای تست ..... ۷۱
۳-۴-۱- تهیه و آماده سازی سل لاین U937 ..... ۷۱
۳-۴-۲- پاساژ سلولی ..... ۷۱
۳-۴-۳- شمارش سلولی ..... ۷۲
۳-۴-۴- آماده سازی سلولها برای تست ..... ۷۲
۳-۴-۵- افزودن مواد موثره به کشت سلولهای U937 ..... ۷۲
۳-۴-۶- تخلیه چاهک ها وشستشوی سلول ها ..... ۷۴
۳-۴-۷- آماده سازی نمونه برای سنجش میزان گلوتاتیون ..... ۷۵
۳-۵- آزمایش سنجش میزان گلوتاتیون ..... ۷۵
۳-۵-۱- اصول آزمایش ..... ۷۵
۳-۵-۲- روش سنجش ..... ۷۶
۳-۶- آزمایش سنجش میزان مالون دی الدهید( MDA) ..... ۷۷

۳-۶-۱ - اصول آزمایش..... ۷۷
۳-۶-۲- روش سنجش..... ۷۸
۳-۷- آزمایش سنجش میزان پروتئین..... ۷۹
۳-۷-۱- اصول آزمایش..... ۷۹
۳-۷-۲- روش سنجش..... ۷۹
۳-۸- آزمایش سنجش سیتوتوکسیتی..... ۸۰
۳-۹- محاسبات آماری..... ۸۱
**فصل چهارم : نتایج**..... ۸۳
۴-۱ - نتایج حاصل ازمقایسه اثرعصاره آبی و الکلی میوه نسترن کوهی بر میزان MDA در لاین سلولی U937..... ۸۴
۴-۲- نتایج حاصل ازمقایسه اثر عصاره آبی و الکلی میوه نسترن کوهی بر میزان MDA در لاین سلولی U937..... ۸۵
۴-۳- نتایج حاصل از اثر غلظت هایمختلف عصاره آبی میوه نسترن کوهی بر میزان گلوتاتیون در لاین سلولی U937... ۸۶
۴-۴- نتایج حاصل از اثر غلظت هایمختلف عصاره آبی میوه نسترن کوهی بر میزان MDA در لاین سلولیU937..... ۸۷
۴-۵- نتایج حاصل از اثر غلظت هایمختلف عصاره الکلی میوه نسترن کوهی بر میزان گلوتاتیون در لاین سلولی U937..... ۸۸
۴-۶- نتایج حاصل از اثر غلظت هایمختلف عصاره الکلی میوه نسترن کوهی بر میزان MDA در لاین سلولی U937..... ۸۹
۴-۷- نتایج حاصل از اثر غلظت های مختلف عصاره آبی میوه نسترن کوهی بر میزان سیتو توکسیتی در لاین سلولی..... ۹۰
۴-۸- نتایج حاصل از اثر غلظت های مختلف عصاره آبی میوه نسترن کوهی بر میزان سیتو توکسیتی درلاین سلولی..... ۹۱

***فـصل پنجم : بحث و نتیجه گیری*** ..... ۹۲

بـــحـــث ..... ۹۳

*نتیجه گیری* ..... ۹۶

*پیشنهادات* ..... ۹۶

*مـنـابـع* ..... ۹۷

چکیده انگلیسی ..... ۱۰۰

# فصل اول : کلیات

**مقـــدمـــه**

از دیر باز رادیکال های آزاد اکسیژن وسایر گونه های فعال اکسیژن به عنوان عوامل دخیل در ایجاد صدمات بافتی شناخته شده بودند وامروز نیز وابستگی آنها به بسیاری از پروسه های فیزیولوژیکی پذیرفته شده است. در سالهای اخیر به خوبی آشکار شده است که انواع رادیکالهای آزاد و اکسیدکننده های وابسته در فرایند پیری و پاتوژنز بیش از صد بیماری نقش دارند. سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در حالت طبیعی در تعادل با سرعت تولید رادیکالهای فعال می باشد و این امر در حفظ هموستاز بدن مهم است و در انجام فعالیت های فیزیولوژیک مثل التیام زخم ها، دفاع در مقابل میکروارگانیسم ها و غیره نقش دارد. در طی تکامل، ارگانیسم ها، خود را با یک سیستم آنتی اکسیدانی تجهیز کرده اند، اگر تولید رادیکال های اکسیژن به هر دلیلی بیشتر شود یا ظرفیت آنتی اکسیدان ها کاهش یابد نتیجه آن بصورت استرس اکسیداتیو که در واقع بهم خوردن بالانس بین این دو عامل است، بروز می کند. (Kelly fj 1993)

به طور کلی تحقیقات گسترده ای در زمینه ی آسیب رسانی گونه های فعال اکسیژن(ROS) و نتایج حاصل از استرس اکسیداتیو ناشی از حضور بالای این رادیکالها در بدن صورت گرفته است. چنانچه بررسی هایی در زمینه درگیری استرس اکسیداتیو در مراحل سرطان زایی و مخصوصا روی جنبه های بیوشیمیایی، شیمیایی و ساختاری رادیکالهای آزاد، منابع درونی و بیرونی تولیدشان و نیز تشکیل آنها با واسطه فلزات و آسیب آنها به اجزای مختلف سلول و محیط احیایی یک سلول، مکانیسم سرطان زایی و نقش انتقال پیام آبشاری توسط (ROS) صورت گرفته است.( Valko, M 2006) در میان تحقیقات انجام شده، کشت سلول(cell culture) اغلب برای مطالعه اثرات سلولی گونه های فعال اکسیژن و آنتی اکسیدان ها مورد استفاده است و اطلاعات خیلی مفیدی هم به دست می دهد. (Halliwell,B.2008)

در این تحقیق ما از لاین سلولی U937 استفاده کردیم. U937 یک لاین سلولی لوکمیای اریتروییدی است و راحت کشت داده می شود و در تعداد زیادی از مطالعات بیوشیمیایی استفاده شده است. (Boadi, W.Y., Lyere, P.A., Adanyah, S.E. 2005)

هدف تحقیق ما بررسی اثر آنتی اکسیدانی و سیتو توکسیسیتی عصاره آبی والکلی میوه نسترن کوهی در محیط کشت سلولی است.

## ۱-۱-بیان مسأله

رادیکال های آزاد اکسیژن مانند هیدروکسیل($OH^{\cdot}$) و سوپراکسید ($O_2^{\cdot -}$) برای سلول ها کشنده می باشد رادیکال های($OH^{\cdot}$) موجب آسیب به پروتئین ها و DNA و غشاهای حاوی اسیدهای چرب غیراشباع می- شوند و در مواردی با آسیب سلولی موجب وخیم تر شدن بیماری هایی مانند آرتریت روماتوئید می گردند(۸،۱۱،۱۴) رژیم های غذایی حاوی مقادیر زیاد میوه و سبزیجات خطر ابتلا به این موارد را که دلیل آن را مربوط به اثر آنتی اکسیدانی ویتامین هایی نظیر ویتامین E و ویتامین C و βکاروتن می دانند و در این راستا مطالعات زیادی در مورد اثر آنتی اکسیدانی مواد گوناگون بر روی سلول های بدن انجام شده است . در این میان نسترن کوهی به عنوان یکی از گیاهان دارویی که به وفور در کشور ما به صورت وحشی یافت میشود طبق بررسی های انجام شده بر روی میوه این گیاه ، داری مقادیر زیادی ویتامین C وترکیبات پلی فنلی است که این موادازمهمترین فاکتورهای آنتی اکسیدان می باشند. مجموع ترکیبات فنلی نسترن کوهی ۹۴/۱۴-۸۳/۱۳میلی گرم اکی والان اسید گالیک بر گرم وزن خشک ومقدار ویتامین C آن حدود ۶۴۳ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم ماده خشک می باشد(۱،۲) . با توجه به مقادیر بالای مواد فوق انتظار میرود میوه نسترن کوهی اثر آنتی اکسیدانی فوق العاده ای باشد به این صورت که اثر این مواد ومکانیسم اثر این مواد بر روی سلول های لوکمیای اریتروئیدی انسانی به نام U937 مورد بررسی قرار خواهد گرفت. این لاین سلولی به دلیل کشت راحت و نیز مدل مناسب برای تحقیقات بیوشیمیایی از جمله بررسی بیان ژن و مسیر انتقال پیام داخل سلولی انتخاب شده است.(۱۲) . بررسی سطوح دو مورد (گلوتایتون و لیپیدپراکسیداسیون) در میزان اثر بخشی آنتی اکسیدان های استفاده شده در محیط کشت موضوع تحقیق موردنظر ماست (۲۶،۲۷)

## ۱-۲- اهمیت و ضرورت انجام تحقیق

رادیکال های آزاد به عنوان مولکول هایی تعریف می شوند که شامل یک یا تعداد بیشتری الکترون های جفت نشده اند و رادیکال های مشتق از اکسیژن مهمترین کلاس چنین گونه هایی را در سیستم های بیولوژیکی تشکیل می دهند. رادیکال های آزاد اکسیژن نظیر رادیکال هیدراکسیل ($OH^{\cdot}$) و یون سوپراکسید ($O2^{\cdot}$) تحت عنوان (ROS) برای سلول ها کشنده هستند.[ Valko, M., Izaovic, M 2004 ] ROS می تواند هم از منابع درونی سلول و هم منابع بیرونی تولید شوند شامل:

تابش اشعه UV و اشعهx و γ
از واکنش های کاتالیز شده توسط فلزات
توسط نوتروفیل ها و ماکروفاژها در حین التهاب
توسط محصولات واکنش های انتقال الکترون در میتوکندری
و مکانیسم های دیگر.[ Cadenas, E.1989 ]

ROS در سلول به عنوان پیام آور ثانویه در آبشار انتقال پیام درون سلولی عمل می کند و تومورزایی در سلول های سرطانی را القا می کند.[ Valko, M., Rhodes, C.J 2006 ]

ROS در غلظتهای بالا می تواند باعث آسیب به ساختار سلول باشد از جمله آسیب به لیپیدها و غشاها و پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک که همگی تحت عنوان استرس اکسیداتیو مطرح می شوند.[ [Poli,G., Leonarduzzi, G 2004

استرس اکسیداتیو : باعث برهم خوردن تعادل احیایی سلول شده که آن هم باعث تحریک تومورزایی می شود.[ Valko, M., Rhodes, C.J 2006 ]

اثرات مضر ROS توسط عمل آنتی اکسیدان های غیرآنزیمی و آنزیم های آنتی اکسیدانی به تعادل می رسد.[ Halliwell,B. 1996 ]

با وجود سیستم های دفاعی آنتی اکسیدانی سلول برای خنثی کردن آسیب اکسیداتیو از ROS، همچنان آسیب های اکسیداتیو در طول سیکل زندگی روی هم انباشته می شود و آسیب های وارده به DNA، پروتئین و لیپید ها را به همراه دارد که خود، یک نقش کلیدی را در گسترش بیماری های وابسته به پیری نظیر سرطان، آرتریواسکلروزیز و آرتریت ، بیماری های تخریب نورون ها و سایر مشکلات بازی می کند.[ Halliwell, B., Gutteridge,J.M.C.1999 ]

در دو دهه گذشته علاقه شدیدی به بررسی نقش رادیکال های آزاد اکسیژن و به طور عمومی تر ROS در آزمایشات و تهیه داروهای پزشکی و بررسی اثر آنتی اکسیدان های مختلف در رفع آسیب های اکسیداتیو معطوف شده است.[ Valko, M., Rhodes, C.J 2006 ]

در این میان cell culture یکی از عمومی ترین سیستم های مورد استفاده در مطالعه اثرات سلولی گیاهان دارویی و اجزای سازنده آنها از نظر شیمیایی است.[ Tang,S.Y.,Halliwell,B.2010 ]

cell culture اغلب برای مطالعه اثرات سلولی گونه های فعال و آنتی اکسیدان ها مورد استفاده است و اطلاعات خیلی مفیدی نیز به دست می دهد.[ Halliwell,B.2008 ]

برای کشت سلول از لاین سلولی U937 استفاده می شود که یک لاین سلولی لوکمیای اریتروئیدی است و راحت کشت داده می شود و در تعداد زیادی از مطالعات بیوشیمیایی مربوط به انتقال پیام و بیان ژن استفاده می شود.[Boadi, W.Y2005]

از آنجا که فلزات از عوامل مهم و مطرح ایجاد استرس اکسیداتیو هستند و ارتباط بین سطوح بالای آهن و مس در بدن و افزایش ریسک بیماری های عروقی- سرطان و شرایط نوروفیزیولوژیک خاص به اثبات رسیده.[ Berg,D2001 ]،[ Siah,C.W 2005 ] در تحقیق مربوطه از آهن و مس به عنوان فلزات القا کننده استرس اکسیداتیو در محیط کشت موردنظر استفاده می شود.[ Valko, M., Rhodes, C.J 2006]

لیپید پراکسیداسیون یک واکنش زنجیره ای است که با ربایش یک اتم هیدروژن (H.) از اسیدهای چرب غیر اشباع از یک فسفولیپید توسط یک رادیکال نظیر رادیکال هیدروکسیل شروع می شود و از تاثیرات ROS روی سیستم های بیولوژیکی است.[ Ingold,K.U 1993 ]

گلوتاتیون نیز یکی از آنتی اکسیدان های طبیعی مهم موجود در بدن می باشد و در تعدیل اثرات استرس اکسیداتیو نقش مهمی ایفا می کند.[ Schulz,J.B 2000 ]

همچنین خیلی از وقایع سلولی توسط تغییرات تیورودوکسین و گلوتاتیون تنظیم می شود. بررسی سطوح این دو مورد (گلوتایتون و لیپیدپراکسیداسیون) در میزان اثر بخشی آنتی اکسیدان های استفاده شده در محیط کشت موضوع تحقیق موردنظر ماست.[ Droge, W. 2001 ] [Bajt, M.L 2002] [Tanaka, K 2001]

## ۱-۳-بررسی منابع

به طور کلی تحقیقات گسترده ای در زمینه آسیبهای حاصله از رادیکالهای آزاد استرس اکسیداتیو ناشی از آندر مراحل سرطان زایی و مخصوصاً روی جنبه های بیوشیمیایی، شیمیایی و ساختاری رادیکال های آزاد، منابع درونی و بیرونی تولیدشان و نیز تشکیل آنها با واسطه فلزات و آسیب آنها به اجزای مختلف سلول و محیط احیایی یک سلول، مکانیزم سرطان زایی و نقش انتقال پیام آبشاری توسط ROS صورت گرفته است.[ Valko, M., Rhodes, C.J 2006 ]

در این میان مطالعات کشت سلول اطلاعات بسیار با ارزشی از مکانیسم های متابولیسم و انتقال پیام و تنظیم بیان ژن، تکثیر و پیری و مرگ سلول فراهم می کند.[ Halliwell, B.2003 ]

آزمایش و تحقیقاتی در زمینه بررسی خواص آنتی اکسیدانی پلی فنول ها در محیط کشت صورت گرفته که نشان می دهد رژیم غذایی غنی از پلی فنول ها باعث ریسک پایین تر بیماری های مرتبط با پیری سلولی می شود که عمدتا به خاطر فعالیت آنتی اکسیدانی قوی آنهاست.[ Halliwell,B.2008 ]
همچنین نقش ویتامین Cبه عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی به اثبات رسیده است.
اسفند یار حسنی مقدم و همکاران میزان ویتامین ث موجود در میوه نسترن کوهی را اندازه گیری نمودند دراین مطالعه میزان ویتامین ث به روش تیتراسیون با ید ۶۴۳ میلی گرم در۱۰۰ گرم نمونه اندازه گیری گردید. ( ۱ )
همکارانش و Gahao Rدر مطالعه ای بر روی عصاره گیاهان منطقه مدیترانه از جمله نسترن کوهی به این نتیجه رسیدند که یکی از گیاهانی که میوه آن بیشترین تاثیر را در جلوگیری از اکسیداسیون لیپیدی دارد نسترن کوهی است.(۱۱)
Eqea Lو همکارانش در سال ۲۰۱۰ در مطالعه ای بر روی شش گیاه جمع آوری شده از جنوب اروپا از جمله نسترن کوهی در یافتند که میوه نسترن کوهی از قدرت آنتی اکسیدانی بالایی برخوردار بوده و از ان می توان بعنوان یک منبع جایگزین آنتی اکسیدانهای سنتزی استفاده کرد.(۱۸)
گزارشهای مختلف نشان دا ده اند که میوه های گیاهان مختلف ازجمله نسترن کو هی حاو ی مقاد یر مناسبی از ترکیبهای فنولی میباشند(۱۹۹۵ ؛۱۹۹۳ chomin&oszmianski ؛ cia؛ding)
میوه نسترن کوهی حاوی مقادیر بالایی از ترکیبات فنولی بوده که اثر مفید بر سلامتی انسان دارند( Cinar & Bihm et al 2003 )
میوه نسترن کوهی حاوی میزان بالایی از کارتنوئیدها می باشد( Hodisan et al 1997
میانگین میزان کارتنوئیدها در میوه نسترن کوهی ۶۵۱ میکرو گرم بر گرم ماده خشک است( Olsson et al 2005)
کارتنوئیدها گروه بزرگی از رنگدانه های گیاهی هستند که در میوه ها و برگهای گیاهان یافت می شوند کارتنوئیدها به دلیل داشتن خاصیت انتی آکسیدانی بدن را در برابر بیماریها مصون می دارند. این ترکیبات از تشکیل رادیکالهای ازاد در بدن جلوگیری می کنند .( Kirakosyan et al 2004)

حال با توجه به اینکه میوه نسترن کوهی دارای مقادری زیادی عوامل اکسید کننده می باشد دراین مطالعه سعی می شود اثر این میوه در جلوگیری از آسیب های اکسیداتیو بر روی سلولها مورد بررسی قرار گیرد .

همچنین تحقیقات زیادی روی داروهای گیاهی در زمینه هـای مختلـف روی محـیط کشـت صـورت گرفته است.[ Tang,S.Y.,Halliwell,B.2010 ]

طبق بررسی های انجام شده تا کنون تحقیق روی خواص آنتی اکسیدانی میوه نسترن کـوهی در روی سل لاین موردنظر به این شکل انجام نگرفته است.

## ۱-۴-هدف اصلی

بررسی اثر آنتی اکسیدانی و سیتوتوکسیسیتی عصاره آبی و الکلی میـوه نسـترن کـوهی بـر روی لایـن سلولی U937

## ۱-۵-اهداف فرعی

الف-تعیین اثر آنتی اکسیدانی میوه نسترن کوهی در جلوگیری از لیپیدپراکسیداسیون در محیط کشـت سلول های U937.

ب-تعیین اثر آنتی اکسیدانی میوه نسترن کوهی بر سطح گلوتـاتیون در محـیط کشـت سـلول هـای U937.

ج-تعیین اثر سیتوتوکسیسیته میوه نسترن کوهی بر روی لاین سلولیU937 .

## ۱-۶-هدف کاربردی

هدف کاربردی این طـرح بررسـی اثـر آنتـی اکسـیدانی و سیتوتوکسیسـیتی میـوه نسـترن کـوهی در جلوگیری یا کاهش از ایجاد استرس اکسیداتیو بـر روی سـلول هـا مـی باشـد و در صـورت انجـام تحقیقات تکمیلی می توان از این آنتی اکسیدان در درمان سرطان و بیماری های مختلـف مـرتبط بـه استرس اکسیداتیو استفاده کرد.

## ۱-۷-سؤالات تحقیق

الف-اثر عصاره آبی میوه نسترن کوهی روی سطح گلوتاتیون بر سلول های U937 چگونه است؟
ب-اثر عصاره آبی میوه نسترن کوهی روی میزان لیپیدپراکسیداسیون سلول های U937 چگونه است؟

ج-اثر عصاره الکلی میوه نسترن کوهی روی سطح گلوتاتیون بر سلول های U937 چگونه است؟
د-اثر عصاره الکلی میوه نسترن کوهی روی میزان لیپیدپراکسیداسیون سلول های U937 چگونه است؟
و- آیا عصاره آبی میوه نسترن کوهی بر روی سلول هایU937 اثر توکسیک دارد ؟
ه- آیا عصاره الکلی میوه نسترن کوهی بر روی سلول هایU937 اثر توکسیک دارد ؟

## ۱-۸-فرضیه‌های تحقیق

الف-آنتی اکسیدان مورد استفاده در تحقیق از کاهش گلوتاتیون روی لاین سلولی U937 (که تحت اثر القای مس و آهن ایجاد می شود) جلوگیری می کند.
ب-آنتی اکیسدان مورد استفاده در تحقیق از لیپیدپراکسیداسیون روی لاین سلولی U937 (که تحت اثر القای مس و آهن ایجاد می شود) جلوگیری می کند.