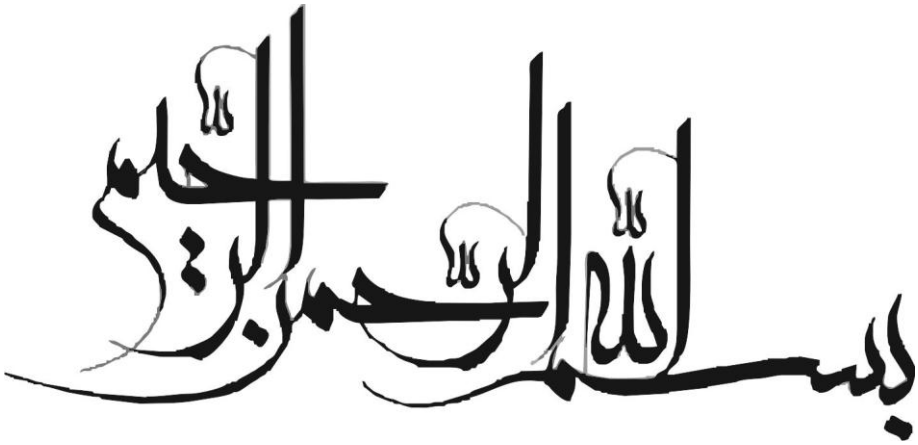
بسم الله الرحمن الرحيم

وزارت علوم ، تحقیقات و زیست فناوری

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

پایان نامه کارشناسی ارشد

رشته ی زیست شناسی سلولی و مولکولی

القاء کالوس از گیاه داروئی مورخوش (*Zhumeria majdae* Rech f. & Wendelbo) و بررسی اثرات ضد التهابی عصاره گیاه و کالوس برکشت مخلوط سلول های گلیای مغز موش صحرایی

نگارش:

پرستو رمضانی

اساتید راهنما:

دکتر فروغ سنجریان

دکتر فرزانه صابونی

مهر ۱۳۹۲

وزارت علوم ، تحقیقات و زیست فناوری

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

پایان نامه کارشناسی ارشد

رشته ی زیست شناسی سلولی و مولکولی

القاء کالوس از گیاه دارونی مورخوش (*Zhumeria majdae* Rech f. & Wendelbo) و بررسی اثرات ضد التهابی عصاره گیاه و کالوس برکشت مخلوط سلول های گلیای مغز موش صحرایی

نگارش:

پرستو رمضانی

این پایان نامه توسط کمیته داوری در تاریخ ۹۲/۷/۱۳ مورد تایید قرار گرفته و با درجه عالی ارزیابی گردید.

استاد راهنمای اول: سرکار خانم دکتر فروغ سنجریان

استاد راهنمای دوم: سرکار خانم دکتر فرزانه صابونی

داور داخلی: جناب آقای دکتر امیر موسوی

داور داخلی: جناب آقای دکتر عبدالخالق دیزجی

سرپرست آموزش: جناب آقای دکتر فرید حیدری

با سپاس از پروردگار جهان و درود بر پیامبر گرامی اش (صلی الله علیه و آله)

و با تشکر از راهنمایی های دلسوزانه ی استادان سرکار خانم دکتر سنجریان، سرکار خانم دکتر صابونی

و با قدردانی از حمایتهای بی دریغ پدر و مادر عزیزم

حق استفاده از مفاد پایان نامه برای پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری محفوظ است"

چکیده

التهاب بیش از حد سلول های مخلوط گلیا در اثر فعال شدن نابجای سیستم ایمنی، باعث ایجاد بیماری‌های تخریب عصبی می‌شود. استفاده از داروهای ضد التهابی تولید فاکتورهای پیش التهابی نظیر Nitric Oxide(NO) و سایتوکاین ها را کاهش داده، از تخریب سلول‌های عصبی جلوگیری می کند. در دهه های اخیر به علت مشخص شدن بسیاری از عوارض داروهای شیمیایی، دانشمندان به داروهای گیاهی توجه بیشتری نشان می دهند. مورخوش (*Zhumeria majdae* Rech & Wendelbo) گیاهی داروئی است که در مناطق جنوبی ایران بدلیل خواص آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی کاربرد وسیعی دارد. در این مطالعه، اثر ضدالتهابی عصاره و اسانس گیاه و عصاره کالوس بر روی سلول‌های اولیه مخلوط گلیای ملتهب شده با LPS(Lipopolysaccharide) ، مورد بررسی قرار گرفت. از بخش های ریشه، ساقه و برگ مورخوش، کالوس القا و بعد از سه دوره واکشت کالوس ها، عصاره آبی آنها و نیز عصاره آبی و اسانس برگ خشک گیاه استخراج شد. کروماتوگرافی جرمی(GC mass) انجام شده برای اسانس نشان داد که دو ترکیب کامفور و لینالول، ترکیبات اصلی موجود در اسانس گیاه هستند، لینالول و کامفور دارای اثرات ضد التهابی می‌باشند. سلول های مخلوط گلیال موش صحرایی در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ از FBS کشت داده شدند. سلول‌ها با عصاره گیاه (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ µg/ml)، عصاره کالوس(۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ µg/ml) و اسانس(۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷، ۱ و ۱/۵ µl/ml) تیمار شده و پس از یک ساعت با LPS به مدت ۴۸ ساعت ملتهب گردیدند. با استفاده از آزمون Griess نشان داده شد که عصاره گیاه (۵۰۰ µg/ml)، عصاره کالوس (۲۰۰ µg/ml) و اسانس (۱ µl/ml) به‌طور قابل‌توجهی تولید NO در سلول های مخلوط گلیای تحریک شده توسط LPS را به صورت وابسته به غلظت کاهش می دهند. همچنین با روش‌های RT-PCR و Real-Time RT-PCR اثبات شد که عصاره گیاه و اسانس در غلظت‌های مشخص شده، بیان *iNOS* و *TNF-α* را در سطح mRNA کاهش می دهد. با استفاده از آزمون MTT، نشان داده شد که هیچ یک از غلظت‌های مورد استفاده، سمیتی برای سلول‌ها ندارد.

با توجه به، یافته های بدست آمده از این پژوهش می‌توان گفت که گیاه مورخوش با کاهش عوامل التهابی می‌تواند نقش موثری در پیشگیری و درمان بیماری‌های التهاب عصبی داشته باشد.

کلمات کلیدی: سلول های مخلوط گلیا، التهاب، مورخوش، اثر ضد التهابی

فهرست مطالب

۱- مقدمه ۲

۱-۱ اهمیت گیاهان دارویی ۲

۱-۲ مواد موثره گیاهان دارویی ۳

۱-۳ روش‌های افزایش متابولیت‌های ثانویه ۵

۱-٤ اهمیت کالوس‌زایی از گیاهان دارویی ۷

۱-۵ سوسپانسیون سلولی ۷

۱-٦ هورمون‌ها و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی ۸

۱-٦-۱ اکسین‌ها ۹

۱-٦-۲ جیبرلین‌ها ۹

۱-٦-۳ سیتوکینین‌ها ۱۰

۱-۷ گیاه دارویی مورخوش ۱۰

۱-۷-۱ تاریخچه و اکولوژی ۱۰

۱-۷-۲ گیاهشناسی ۱۱

۱-۸ ترکیبات موجود در اسانس مورخوش و خصوصیات آنها ۱۲

۱-۹ ترکیبات موجود در گیاه مورخوش ۱۳

۱-۱۰ سیستم عصبی مرکزی CNS ۱۵

۱-۱۱ انواع سلول‌های گلیا ۱۵

۱-۱۱-۱ میکروگلیا ۱۵

۱-۱۱-۲ آستروسیت‌ها ۱٦

۱-۱۱-۳ الیگودندروسیت‌ها ۱٦

۱-۱۱-٤ سلول‌های اپاندیم ۱۷

۱-۱۲ منشاء سلولی و جایگاه سلول‌های گلیا ۱۷

۱-۱۳ تکوین CNS ۲۰
۱-۱۴ تنظیم جریان خون CNS ۲۰
۱-۱۵ سد خونی – مغزی ۲۱
۱-۱٦ عملکردهای فیزیولوژیکی میکروگلیا ۲۱
۱-۱۷پاسخ ایمنی سلول‌های میکروگلیا ۲۲
۱-۱۸ خصوصیات مورفولوژیکی میکروگلیا ۲٤
۱-۱۸-۱میکروگلیای منشعب ۲٤
۱-۱۸-۲ میکروگلیای فعال شده ۲٤
۱-۱۹التهاب ۲٦
۱-۲۰ نقش NO در فرآیندهای فیژیدلوژیک ۲٦
۱-۲۱ مکانیسم عمل NO ۲۷
۱-۲۲ تنظیم ژن iNOS در سلول‌های گلیا ۲۸
۱-۲۳ تولید NO در سلول‌های گلیا ۲۹
۱-۲٤ مشارکت NO در تخریب عصبی مرتبط با التهاب ۳۰
۱-۲۵ محرک‌های فعالیت سلول‌های گلیا ۳۱
۱-۲۵-۱ لیپوپلی ساکارید(LPS) ۳۱
۱-۲۵-۲ اینترفرون گاماIFNγ ۳٤
۱-۲۵-۳ پروتئین آمیلوئید بتا Aβ ۳۵
۱-۲۵-٤ مولکول‌های مربوط به HIV ۳۵
۱-۲٦ ارتباط میکروگلیا- میکروب ۳۵
۱-۲۷ بیماری‌های نورودژنراتیو ۳٦
۱-۲۸ فرضیات ۳٦
۱-۲۹ اهداف ۳۷
۲ مواد و روش‌ها ۳۸
۲-۱ وسایل و تجهیزات مورد نیاز ۳۹
۲-۲ مواد مورد استفاده ٤۱
۲-۳ محیط کشت‌های مورد استفاده بخش گیاهی ٤۳

۲-۳-۱ محیط کشت MS بدون هورمون ٤٤
۲-۳-۲ محیط کشت ۱/۲MS بدون هورمون..... ٤٤
۲-۳-۳ محیط کشت MS حاوی هورمون های Kinetin و 2,4-D برای القا و رشد کالوس..... ٤٤
۲-۳-٤ محیط کشت MS حاوی هورمون های BAP و NAA برای رشد کالوس ٤٤
۲-۳-٥ محیط کشت MS مایع حاوی هورمون های (BAP وNAA) و (Kinetin و 2,4-D) برای تهیه سوسپانسیون سلولی٤٥
۲-٤-۱ تهیه‌ی محلول ذخیره Kin ٤٥
۲-٤-۲تهیه‌ی محلول ذخیره BAP ٤٥
۲-٤-۳ تهیه‌ی محلول ذخیره NAA..... ٤٥
۲-٥ شکستن خواب بذرها..... ٤٥
٦-۲ استریل کردن بذر و کشت آن در محیط MS و ۱/۲MS ٤٦
۲-٦-۱ القا و رشد کالوس..... ٤٦
۲-٦-۲ اندازه گیری وزن تر کالوس‌ها..... ٤٧
۲-٦-۳ اندازه گیری وزن خشک کالوس‌ها ٤٧
۲-٦-٤ رشد نسبی کالوس..... ٤٧
۲-٦-٥ سرعت رشد نسبی کالوس..... ٤٧
۲-٦-٦ محتوای آب کالوس ٤٧
۲-۷-۱ تهیه‌ی سوسپانسیون سلولی..... ٤٨
۲-۷-۲ شمارش و تعیین بقاء سلولی سوسپانسیون سلولی ٤٨
۲-۷-۳ اندازه‌گیری وزن تر و خشک سوسپاسیون سلولی ٤٨
۲-۸-۱. عصاره‌گیری آبی از گیاه..... ٤٨
۲-۸-۲ اسانس‌گیری از گیاه..... ٥٠
۲-۸-۳ عصاره‌گیری از کالوس ٥٠
۲-۹ آنالیز بیوشیمیایی ترکیبات موجود در اسانس گیاه توسط روش کروماتوگرافی جرمی (GCmass) ٥١
۲-۱۰ محلول‌ها و بافرهای مورد استفاده بخش جانوری ٥١
۲-۱۰-۱ محیط کشت جانوری..... ٥١
۲-۱۰-۲ آماده سازی دارو ٥٢
۲-۱۰-۳ بافر نمکی فسفات ٥٢

۲-۱۰-٤ تریپسین ٥٣
۲-۱۰-٥ لیپویلی ساکارید ٥٣
۲-۱۰-٦ نیتریت سدیم ٥٣
۲-۱۰-۷گریس ٥٤
۲-۱۰-۸ محلول MTT ٥٤
۲-۱۱ مراحل کشت سلولی ٥٤
۲-۱۱-۱ کشت اولیه سلول های مخلوط عصبی موش صحرایی ٥٥
۲-۱۱-۲تریپسینه کردن سلول‌ها ٥٧
۲-۱۱-۳ ا شمارش سلولی و تعیین بقای سلولی ٥٧
۲-۱۱-٤ تیمار سلول‌ها ٥٨
۲-۱۱-٥ سنجش گریس،اندازه گیری نیتریک اکساید ٥٨
۲-۱۱-٦ تست MTT ٦٠
۲-۱۲ RT- PCR ٦٠
۲-۱۲-۱استخراج RNA کل سلول ٦٠
۲-۱۲-۲ سنتز cDNA ٦١
۲-۱۲-۳ توالی آغازگرها ٦٢
۲-۱۲-٤ واکنش PCR ٦٢
۲-۱۳-۱ سنجش بیان ژن iNOS توسط Real- Time PCR ٦٣
۲-۱٤-۱ کشت سلول‌های سرطانی آستروسایتوما ٦٤
۲-۱٤-۲ تریپسیته، شمارش سلولی و تیمارکردن سلول‌های سرطانی آستروسایتوما ٦٤
۲-۱٥آنالیزهای آماری ٦٤
۳نتایج ٦٥
۳-۱شکستن خواب بذر و کشت گیاه ٦٦
۳-۲القاء کالوس از بخش‌های مختلف گیاه مورخوش ۶۷
۳-۲-۱ آنالیز میزان رشد کالوس‌های برگ ۷۰
۳-۲-۲ آنالیز میزان رشد کالوس‌های ساقه ۷۲
۳-۲-۳ آنالیز میزان رشد کالوس‌های ریشه ۷٤

۳-۳تهیه‌ی سوسپانسیون سلولی ۸۲
۳-۳-۱محاسبه‌ی میزان رشد و بقاء سلولی..... ۸۳
۳-۳-۲ اندازه گیری وزن تر و خشک سوسپانسیون سلولی..... ۸٤
۳-٤ عصاره و اسانس گیری و آنالیز بیوشیمیایی اسانس توسط GCmass ۸۵
۳-٤-۱ نتایج مربوط به GCmass..... ۸٦
۳-۵ مراحل رشد سلول‌ها در کشت مخلوط گلیا..... ۸۹
۳-۵-۱- بررسی اثر محلول عصاره خشک گیاه مورخوش بر مورفولوژی کشت سلول‌های مخلوط گلیا ۹۰
۳-۵-۲ تاثیر محلول عصاره خشک گیاه مورخوش بر تولید NO در سلول‌های گلیای ملتهب شده با لیپوپلی ساکارید ۹٤
۳-۵-۳ اندازه‌گیری سمیت محلول عصاره خشک گیاه مورخوش بر روی سلول‌های گلیا در غلظت های مختلف. ۹۵
۳-٦-۱ بررسی اثر اسانس گیاه مورخوش بر مورفولوژی کشت سلول‌های مخلوط گلیا ۹۶
۳-٦-۲ تاثیر اسانس گیاه مورخوش بر تولید NO در سلول‌های گلیای ملتهب شده با لیپوپلی ساکارید..... ۹۷
۳-٦-۳- اندازه‌گیری سمیت اسانس گیاه مورخوش بر روی سلول‌های گلیا در غلظت های مختلف ۹۸
۳-۷-۱- تاثیر عصاره کالوس گیاه مورخوش بر تولید NO در سلول‌های گلیای ملتهب شده با لیپوپلی ساکارید... ۹۹
۳-۷-۲- اندازه‌گیری سمیت عصاره کالوس گیاه مورخوش بر روی سلول‌های گلیا در غلظت های مختلف ۱۰۰
۳-۸-۱- آنالیز بیان ژن ها از طریق RT-PCR..... ۱۰۱
۳-۸-۲- محصولات PCR، ژن‌های iNOS و TNF-α مربوط به عصاره ۱۰۲
۳-۸-۳- محصولات PCR، ژن‌های iNOS و TNF-α مربوط به اسانس.....۱۰۵
۳-۹- بررسی تغییرات بیان ژن iNOS با روش Real – Time RT-PCR..... ۱۰۹
۳-۱۰-تاثیر عصاره و اسانس گیاه مورخوش بر بقاء سلول‌های سرطانی آستروسایتما.....۱۱۱
٤ بحث و نتیجه‌گیری..... ۱۱۵
منابع ۱۲٦
چکیده انگلیسی..... ۱۳۱

فهرست جداول

۱-۱: متابولیت‌های ثانویه گیاهی ---------- ۶

۱-۲: ترکیبات اسانس مورخوش ---------- ۱٤

۱-۳:مارکر های سلول های میکروگلیا---------- ۱۸

۲-۱: مواد مورد استفاده---------- ٤۱

۲-۲: محیط کشت MS ---------- ۴۳

۲-۳: غلظت‌های هورمونی مورد استفاده ---------- ٤٤

۲-٤: مشخصات دستگاه GCmass ---------- ۵۱

۲-۵: روش کرواتوگرافی جرمی ---------- ۵۱

۲-٦: مواد مورد نیاز بافر نمکی فسفات---------- ۵۲

۲-۷: لیپو پلی ساکارید---------- ۵۳

۲-۸: مواد مورد نیاز نیتریت سدیم---------- ۵۳

۲-۹: گریس---------- ۵٤

۲-۱۰: مواد سنتز cDNA ---------- ٦۱

۲-۱۱: آغازگرهای RT-PCR ---------- ٦۲

۲-۱۲: مواد مورد نیاز RT-PCR ---------- ٦۲

۲-۱۳: برنامه RT-PCR ---------- ٦۳

۳-۱: مدت زمان القاء کالوس---------- ٦۹

۳-۲: درصد بیوماس کالوس برگ---------- ۷۱

۳-۳: درصد بیوماس کالوس ساقه ---------- ۷٤

۳-٤: درصد بیوماس کالوس ریشه---------- ۷٦

۳-۵: جدول مقایسه میانگین هورمون‌ها ---------- ۷٦

۳-٦: جدول مقایسه میانگین ریزنمونه‌ها---------- ۷٦

۳-۷: جدول مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون در ژنوتیپ ---------- ۷۷
۳-۸: جدول مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون در قطعه---------- ۷۷
۳-۹: جدول مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ در قطعه ---------- ۷۸
۳-۱۰: جدول مقایسه میانگین اثر متقابل ۳ فاکتور ---------- ۷۸
۳-۱۱: جدول مقایسه میانگین صفات مورد بررسی برای هورمون‌ها ---------- ۷۹
۳-۱۲: جدول مقایسه میانگین صفات مورد بررسی برای ریزنمونه‌ها ---------- ۷۹
۳-۱۳:جدول مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون در ژنوتیپ برای صفات مورد بررسی ---------- ۸۰
۳-۱٤: جد ول مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون در قطعه برای صفات مورد بررس ---------- ۸۰
۳-۱۵: جدول مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ در قطعه برای صفات مورد بررسی ---------- ۸۱
۳-۱۶: جدول مقایسه میانگین اثر متقابل ۳ فاکتور برای صفات مورد بررسی ---------- ۸۷
۳-۱۷: درصد ترکیبات موجود در گیاه داروئی مورخوش ---------- ۸۸

فهرست تصاویر

۱- گیاه مورخوش ---------- ۱۲
۱-۲: Linalool ---------- ۱۳
۱-۳: Camphor ---------- ۱۳
۱-٤: 1,8-Cineol ---------- ۱۳
۱-۵: سلول های نوروگلیا در CNS و PNS ---------- ۱۷
۱-۶: طرح شماتیکی از فعال‌شدن میکروگلیا ---------- ۲۵
۱-۷: مکانیسم فعال شدن NF-κB ---------- ۲۹
۱-۸: اتصال LPS به TLR4---------- ۳۳
۱-۹: پاسخ سلول‌های گلیا به LPS از طریق TLR4 ---------- ۳۴
۲-۱: دستگاه الایزا ریدر ---------- ٤۰

۲-۲: لوپ تشریح ---------- ۴۱
۲-۳: بذر گیاه مورخوش ---------- ۴۶
۲-۴: برگ‌های خشک مورخوش ---------- ۴۹
۲-۵: عصاره‌گیری آبی از برگ‌های گیاه مورخوش توسط دستگاه سوکسوله ---------- ۴۹
۲-۶: اسانس گیری از برگ‌های گیاه مورخوش توسط دستگاه کلوینجر ---------- ۵۰
۲-۷: کشت مخلوط گلیال ---------- ۵۶
۲-۸: واکنش شیمیایی مربوط به اندازه گیری $NO2^-$ توسط معرف گریس ---------- ۵۹
۳-۱: کشت بذرهای مورخوش در محیط ---------- ۶۶
۳-۲: جوانه زدن بذرهای مورخوش ---------- ۶۶
۳-۳: رشد گیاهچه مورخوش ---------- ۶۷
۳-۴: القای کالوس از برش ها ---------- ۶۸
۳-۵: کالوس القا شده ---------- ۶۹
۳-۶: افزایش وزن کالوس های برگ ---------- ۷۰
۳-۷: رشد نسبی کالوس‌های برگ ---------- ۷۰
۳-۸: تفاوت وزن خشک کالوس های برگ ---------- ۷۱
۳-۹: افزایش وزن کالوس های ساقه ---------- ۷۲
۳-۱۰: رشد نسبی کالوس‌های ساقه ---------- ۷۳
۳-۱۱: تفاوت وزن خشک کالوس های ساقه ---------- ۷۳
۳-۱۲: افزایش وزن کالوس های ریشه ---------- ۷۴
۳-۱۳: رشد نسبی کالوس‌های ریشه ---------- ۷۵
۳-۱۴: تفاوت وزن خشک کالوس های ریشه ---------- ۷۵
۳-۱۵: کالوس‌های مورد استفاده برای تهیه سوسپانسیون سلولی ---------- ۸۲

۳-۱۶: سوسپانسیون سلولی----------۸۲
۳-۱۷: سوسپانسیون تک سلولی----------۸۳
۳-۱۸: سوسپانسیون سلولی رنگ آمیزی شده با تریپان بلو----------۸۴
۳-۱۹: وزن تر سوسپانسیون سلولی----------۸۵
۳-۲۰: وزن خشک سوسپانسیون سلولی----------۸۵
۳-۲۱: کالوس‌های مورد استفاده برای عصاره----------۸۵
۳-۲۲:عصاره خشک کالوس----------۸۶
۳-۲۳: اسانس استخراج شده----------۸۷
۳-۲۴: کروماتوگرام مربوط به کروماتوگرافی جرمی ترکیبات اسانس مورخوش----------۸۷
۳-۲۵: مورفولوژی سلول‌های گلیا----------۹۰
۳-۲۶: سلول‌های مخلوط گلیا در حالت کنترل----------۹۱
۳-۲۷: سلول‌های مخلوط گلیا پس از تحریک با LPS----------۹۱
۳-۲۸: سلول‌های مخلوط گلیا پس از تحریک با LPS----------۹۲
۳-۲۹: سلول‌های مخلوط گلیا پس از تیمار با مقدار ۱۰۰µg/ml عصاره----------۹۲
۳-۳۰: سلول‌های مخلوط گلیا پس از تیمار با مقدار ۳۰۰ µg/ml عصاره----------۹۳
۳-۳۱: سلول‌های مخلوط گلیا پس از تیمار با مقدار ۵۰۰ µg/ml عصاره ----------۹۳
۳-۳۲: اثر عصاره گیاه بر تولید NO در سلول های گلیای ملتهب شده توسط LPS----------۹۵
۳-۳۳: اثر عصاره گیاه بر میزان بقاءسلول های اولیه مخلوط گلیا----------۹۶
۳-۳۴ سلول‌های مخلوط گلیا پس از تیمار با مقدار ۰/۵µl/ml اسانس---------- - ۹۷
۳-۳۵: سلول‌های مخلوط گلیا پس از تیمار با مقدار ۱µl/ml اسانس----------۹۷
۳-۳۶: اثراسانس گیاه مورخوش بر تولید NO در سلول های گلیای ملتهب شده توسط LPS----------۹۸
۳-۳۷: اثر اسانس گیاه بر میزان بقاءسلول های اولیه مخلوط گلیا----------۹۹

۳-۳۸: اثر عصاره کالوس گیاه بر تولید NO در سلول های گلیای ملتهب شده توسط LPS----------۱۰۰

۳-۳۹: اثر عصاره کالوس بر میزان بقاءسلول های اولیه مخلوط گلیا----------۱۰۱

۳-۴۰: طول قطعه ژن‌های GAPDH, iNOS, TNF----------۱۰۲

۳-۴۱: تصویر الکتروفورز ژن iNOS برای عصاره----------۱۰۳

۳-۴۲: تبدیل باندهای کیفی ژل iNOS به صورت کمی بوسیله نرم افزار Total lab برای عصاره------۱۰۳

۳-۴۳: تصویر الکتروفورز ژن TNF-α برای عصاره ---------- ----------۱۰۴

۳-۴۴: تبدیل باندهای کیفی ژل TNF-α به صورت کمی بوسیله نرم افزار Total labبرای عصاره------۱۰۵

۳-۴۵: تصویر الکتروفورز ژن iNOS برای اسانس----------۱۰۶

۳-۴۶: تبدیل باندهای کیفی ژل iNOS به صورت کمی بوسیله نرم افزار Total lab برای اسانس------۱۰۶

۳-۴۷: تصویر الکتروفورز ژن TNF-α برای اسانس----------۱۰۷

۳-۴۸: تبدیل باندهای کیفی ژل TNF-α به صورت کمی بوسیله نرم افزار Total labبرای اسانس------۱۰۸

۳-۴۹: سنجش کمی بیان ژن iNOS ----------۱۱۰

۳-۵۰: مورفولوژی سلول‌های سرطانی----------۱۱۱

۳-۵۱: اثر عصاره گیاه بر میزان بقاءسلول های آستروسایتوما----------۱۱۲

۳-۵۲: اثر اسانس بر میزان بقاءسلول های آستروسایتوما----------۱۱۲

۳-۵۳: تاثیر عصاره گیاه بر سلول‌های آستروسایتما----------۱۱۳

۳-۵۴: تاثیر اسانس بر مورفولوژی سلول‌های آستروسایتما----------۱۱۴

فهرست نمودارها

۲-۱: نمودار استاندارد NO ---------- ۶۵

۳-۱: منحنی استاندارد $NaNO_2$ به منظور تعیین میزان NO ---------- ۹٤

۳-۲: منحنی استاندارد برای ژن iNOS ---------- ۱۰۸

۳-۳: منحنی مربوط به CT های ژن های iNOS و GAPDH ---------- ۱۰۹

APC	Antigen presenting cells
Aβ	β-Amyloid
BAP	Benzylaminopurine
BBB	Blood Brain Barrier
CD14	Cluster of differentiated14
CNS	Central nervous system
COX-2	Cyclooxygenase2
CTL	Cytotoxic T cell
DA	Dopaminergic-nigro strial
EAAT	Excitatory amino acid transporter
EET	Epoxyeicosatrienoic acid
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
ERK	Extracellular signal- regulated Kinase
GFAP	Glial Fibrillary acidic protein
HAD	Human immunodeficiency virus acquired dementia
HSV-1	Herpes Simplex Virus 1
HIV	Human immunodeficiency virus
IFN-γ	Interferon γ
IL-1β	Interleukin 1 β
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IP3	Inositol 3 phosphate
IRAK	Interleukine-1 receptor-associated kinase
JNK	C-Jun N terminal kinase

LBP	LPS binding protein
LPS	Lipopolysaccharide
MHC	Major histocompatibility complex
MS	Murashige & skoog
MS	Multiple sclerosis
MYD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NAA	Naphthalene acetic acid
NF-kB	Nuclear factor kappa β
NMDA	N-methyl D-aspartate
NOS	Nitric oxide synthase
nNOS	Neuronal nitric oxide synthase
NO	Nitric oxide
NSAID	Non Steroidal anti inflammatory drugs
PG-2	Prostaglandin-2
PKC	Protein kinase C
PNS	Peripheral nervous system
RFWG	Relative fresh weight growth callus
RGR	Relative growth rate callus
RWC	Water content callus
TLR	Toll like receptor
TNF-α	Tumor necrosis factor α
TGF-β	Transforming growth factor
TH2	T-helper2
20-HETE	20-hydroxyeicosatetraenoic acid

فصل اول

مقدمه

۱- مقدمه

۱-۱- اهمیت گیاهان داروئی[۱]

طی سالیان متمادی داروهای طبیعی خصوصا گیاهان دارویی اساس و حتی در برخی موارد تنها طریق درمان محسوب می‌شدند و در عین حال مواد اولیه موجود در آنها در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار می‌گرفت. در اوایل قرن حاضر پیشرفت علم شیمی و کشف سیستم های پیچیده سنتز ترکیبات شیمیایی منجر به توسعه صنعت داروسازی شد. با وجود این، گیاهان دارویی و داروهایی که از آنها تهیه می شدند، هرگز به طور کامل کنار گذاشته نشدند. مواد اولیه موثری که در گیاهان به صورت ذخیره موجود است، پیوسته به عنوان موادی غیر قابل جایگزین مورد استفاده بوده و خواهد بود.

با گذشت زمان بر تعداد گیاهان دارویی شناخته شده افزوده شد و زمینه های کاربرد آنها نیز گسترده تر گردید. کشف گیاهان جدید، دستیابی به کاربردهای نوین آنها به عنوان داروهای کمکی در درمان های شیمیایی یا آنتی بیوتیکی، پی بردن به ارزش بهداشتی گیاهان و بالاخره کشف مواد جدیدی نظیر ویتامین ها، هورمون ها، مواد ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد توموری و ضد التهابی در میان گیاهان شناخته شده و یا گیاهانی که به تازگی کشف شده اند، بار دیگر در پیشرفت طب گیاهی کمک شایانی کردند. هنوز تعداد زیادی از مردم دنیا برای نیازهای روزانه خود در زمینه سلامتی به روشهای سنتی و استفاده از گیاهان دارویی متکی هستند (Gurib, 2006).در عصر جدید صنایع داروسازی، پزشکان و گروه های تحقیقاتی مجدداً توجه خود را به منابع طبیعی و گیاهان دارویی معطوف کردند، به طوری که امروزه ما شاهد مزارع وسیع آزمایشی وتولیدی هستیم. کشت گیاهان دارویی در حال حاضر به عنوان شاخه مهمی ازکشاورزی مطرح است که برای تولید و استخراج مواد اولیه ای که در ساخت داروهای موجود به کار می روند، صورت می گیرد. به دلیل این که مواد مؤثره موجود در داروهای گیاهی به دلیل همراه بودن آنها با مواد دیگر پیوسته از یک حالت تعادل بیولوژیک برخوردار می-باشد، بنابراین در بدن انباشته نشده و اثرات جانبی به بار نمی آورند، از این رو برتری قابل ملاحظه ای نسبت به داروهای شیمیایی دارند(ساعد،۱۳۷۹).

در طب سنتی معمولا از چند گیاه دارویی به صورت مخلوط برای افزایش اثرهای درمانی آنها در زمینه‌ی کاهش علائم بیماریها استفاده می‌شود(Gurib, 2006). سیستم درمانی متکی به گیاهان دارویی نقش بسیار مهمی در فرهنگ طب سنتی بسیاری از کشورها بازی می‌کند. به گزارش سازمان بهداشت جهانی[۲] حدود ۸۰٪ مردم دنیا از سیستم‌های طب سنتی مرتبط با گیاهان دارویی استفاده می‌کنند(Gurib, 2006)

---

[۱] Medicinal plants

[۲] World Health Organization