پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۷، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲، صفحات ۲۰۰ تا ۲۰۴

مقاله اصلی
(Original Article)

بررسی اثر عصاره متانولی برگ، پوست، هسته و آب پنج رقم انگور کشت شده در ایران بر روی تکثیر لنفوسیت

زینب ساعدی، ماندانا بهبهانی*

گروه زیست فناوری، دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه اصفهان

چکیده

سابقه و هدف: *انگور به دلیل داشتن انواع مختلفی از ترکیبات فنولی همچون فلاونوئیدها دارای خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی است. هدف این پژوهش، بررسی نقش عصاره متانولی بخش های مختلف پنج رقم انگور جمع آوری شده از استان‌های قزوین و کاشان بر تکثیر لنفوسیت بود.*

روش بررسی: *بررسی به روش تجربی بر روی پنج رقم انگور، شامل ارقام یاقوتی، حلوایی، بیدانه سفید، شاهرودی و قرمز یاقوتی درشت از استان های قزوین و کاشان انجام شد. عصاره متانولی برگ پیر، برگ جوان، پوست، هسته و آب هر کدام از ارقام تهیه گردید. اثر غلظت‌های مختلف عصاره (۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰،۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) با دو بار تکرار بر روی سلول لنفوسیت به روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *عصاره پوست، هسته و برگ انگور باعث تکثیر و رشد سلول‌های لنفوسیت شد، اما آب انگور اثر معنی‌داری بر تکثیر سلول های لنفوسیت نداشت.*

نتیجه‌گیری: *به نظر می رسد قسمت‌های مختلف گیاه انگور (برگ، میوه) به دلیل دارا بودن خاصیت تحریک کنندگی سلول‌های لنفوسیت می‌توانند نقش قابل توجهی در تقویت سیستم ایمنی بدن ایفا نموده و به عنوان یک ماده غذایی موثر در رژیم درمانی برای درمان بیماری های نقص ایمنی گنجانده شود، از این رو بررسی تجربی آن را توصیه می نماییم.*

واژگان کلیدی: *انگور، تکثیر لنفوسیت، عصاره متانولی، سنجش MTT.*

مقدمه

Vitis vinifera گونه انگور بومی منطقه مدیترانه، اروپای مرکزی و جنوب غربی آسیاست که به صورت خودرو و پراکنده دیده می‌شود. این گیاه بوته‌ای و دارای شاخه‌های نرم و قابل انعطاف و بالا رونده می‌باشد که به واسطه سازش و تطبیق با شرایط اقلیمی و محیطی متفاوت به تدریج اهلی گردیده و در سراسر جهان کاشته شده است (۱). در ایران، انگور با سطح زیر کشت حدود ۲۸۰۰۰۰ هکتار و تولید سالانه ۱۵۰۰۰۰۰ تن یکی از مهم‌ترین محصولات باغبانی به شمار می‌رود. به طوری که در بسیاری از مناطق کشور مانند استان‌های قزوین، کردستان، خراسان و آذربایجان شرقی و غربی بیشترین سطح زیر کشت را به خود اختصاص داده است (۲). انگور در طب سنتی در درمان بیماری‌هایی مانند آرتریت روماتوئید و روماتیسم کاربرد داشته است. همچنین به دلیل داشتن آنتی اکسیدان‌هایی همچون الاژیک اسید ضمن کاهش علائم بیماری التهاب مفاصل، عملکرد مواد سرطان‌زای بدن را نیز

آدرس نویسنده مسئول: اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناور یهای نوین، گروه بیوتکنولوژی، ماندانا بهبهانی (**e-mail:** ma.behbahani@ast.ui.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/٤/۱٦
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۲۰

Archive of SID
www.SID.ir

خنثی می‌کند (۱). در ایران از برگ درخت مو به صورت تازه در پخت انواعی از غذاها و به صورت خشک شده به عنوان یک داروی گیاهی استفاده می‌شود. برگ انگور دارای ساکاروز، لوولز (levulose)، اینوزیت (Inosite)، کوئرستین (Quercetin)، کاروتن، تارتاریک اسید، مالیک اسید، اسکوربیک اسید، پتاسیم، آهن و سیلیکون می‌باشد و در مورد عفونت‌های روده ضد عفونی کننده گران بهایی محسوب می‌گردد (۳). عصاره هسته انگور غنی از پرو آنتی سیانین، یک آنتی اکسیدان بسیار قوی است که می‌تواند جلوی تخریب‌های سلولی در اثر رادیکال‌های آزاد را بگیرد. این عصاره علاوه بر داشتن خواص آنتی اکسیدانی، دارای خواص آنتی هیستامین، ضد آلرژی و ضد التهاب است و موجب تقویت سیستم ایمنی بدن نیز می‌شود (۴،۵). نتایج محققان نشان داده که انگور یک منبع غنی از ترکیبات فنلی مانند اسید گالیک، کاتچین، رسوراترول و طیف گسترده‌ای از پروسیانیدین هاست (۶). ترکیبات فنولی موجود در انگور از لحاظ سلامت و فعالیت‌های بیولوژیکی دارای اهمیت می‌باشند (۷). وینکلر (winkler) و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش نمودند که مصرف دراز مدت آب میوه‌های غنی از ترکیبات پلی فنول مانند آب انگور قرمز، تکثیر لنفوسیتی القا شده به وسیله فیتوهماگلوتینین را افزایش می‌دهد (۸). در این پژوهش، اثر عصاره متانولی ۵ بخش مختلف گیاه انگور بر روی سلول لنفوسیت مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها

تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. جهت تهیه عصاره، میوه و برگ‌های جوان و پیر پنج رقم انگور شامل یاقوتی، حلوایی و قرمز یاقوتی درشت از مرکز تحقیقات گیاهی کاشان و ارقام شاهرودی و بیدانه سفید از مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی قزوین، در اردیبهشت و مرداد ماه سال ۱۳۹۱ جمع آوری شد. پوست و هسته انگور با دست جداسازی گردید و پس از شستشوی کامل به همراه برگ‌ها و به صورت جداگانه در سایه خشک شده و سپس آسیاب گردیدند. ۳۰ گرم از پودرهای به دست آمده به طور جداگانه در ۱۰۰ میلی لیتر متانول ۹۶٪ ، به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر با دور ۱۸۰rpm و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرارگرفتند. عصاره‌های حاصل پس از عبور از کاغذ صافی با استفاده از دستگاه روتاری در شرایط خلاء و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و سپس به وسیله دستگاه فریز درایر خشک شدند. پودرهای به دست آمده در ظرف‌های پلاستیکی درب دار قرار داده شده و در دمای ۴ نگهداری گردید.

۱۰ میلی‌گرم از عصاره‌های تام به صورت جداگانه در ۱۰۰ میکرو لیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل شد، سپس رقیق سازی با استفاده از محیط کشت RPMI در شرایط کاملا استریل و زیر هود لامینار فلو انجام شده و غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از هر عصاره تهیه گردید.

کشت و نگه‌داری سلول لنفوسیت

نمونه خون از اهداکنندگان سالم درون لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد هپارین جمع آوری گردید. سپس خون با استفاده از محیط لنفودکس و در سانتریفوژ با دور۱۸۰۰rpm و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. لنفوسیت به دست آمده در محیط کشت RPMI شامل ۱۰٪ سرم گاوی، ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین، ۱۰۰mg/ml استرپتومایسین، ۲ mM گلوتامین و ۱ mM پیروات، به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۵٪ Co2 کشت داده شد.

بررسی رشد و تکثیر سلول‌های لنفوسیت با استفاده از روش MTT

به منظور بررسی اثر عصاره‌ها بر روی سلول لنفوسیت تحریک شده با فیتو هماگلوتینین (PHA) از تست MTT استفاده شد. این آزمون یک روش رنگ سنجی است که بر اساس احیا شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم با فرمول شیمیایی 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromaide (MTT) به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال‌های آبی رنگ فورمازان انجام می‌شود (۹). این کریستال‌های غیرمحلول در حلال مناسبی مانند DMSO حل شده وسپس به روش الایزا مورد سنجش قرار می‌گیرد. در ابتدا در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه، ۱۸۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی که معادل ۶×۱۰^{۵} سلول بود، ریخته شد. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌ها به هر چاهک اضافه شد، به طوری که حجم نهایی به ۲۰۰ میکرولیتر رسید. پس از ۷۲ ساعت انکوبه کردن سلول‌ها، زنده بودنشان مطابق با روش دیوید و مورگان اندازه گیری شد. پس از آن محلول ۰/۰۴ مولار HCL در ۲پروپانول به اضافه ۱۰٪ تریتون X100 به منظور حل شدن کریستال‌های فورمازان اضافه شد. سپس جذب MTT در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر اندازه گیری شد. برای هر

Archive of SID

www.SID.ir

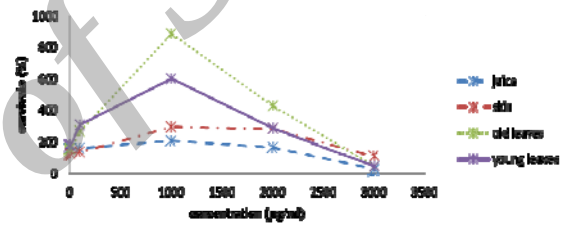
غلظت عصاره دو تکرار تعیین شد. در این پژوهش دی متیل سولفوکساید (DMSO)، به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و در نهایت تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی از فرمول زیر محاسبه گردید.

درصد بقاء = (جذب چاهک های مربوطه / جذب کنترل منفی) ×۱۰۰

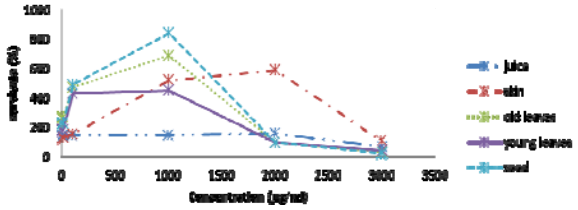
یافته‌ها

بررسی اثر تحریک کنندگی عصاره‌های متانولی بر روی تکثیر سلول‌های لنفوسیت

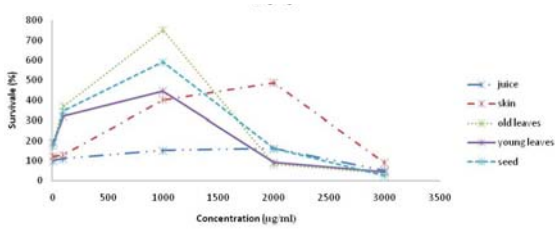
اثر تحریک کنندگی عصاره‌های متانولی بر روی تکثیر سلول‌های لنفوسیت بررسی شد. هر عصاره در ۵ غلظت ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر اثر داده شد. نتایج حاصل در نمودارهای ۱ تا ۵ نشان داده شده است.



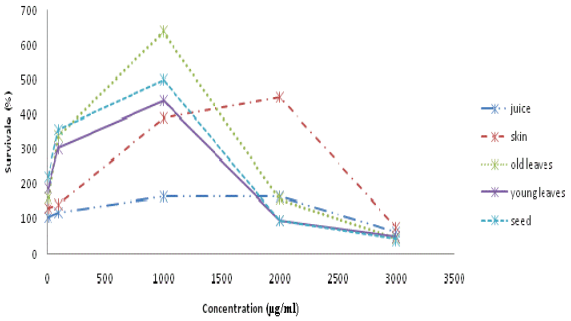
نمودار ۱- اثر عصاره‌های متانولی قسمت‌های مختلف انگور بی‌دانه سفید قزوین بر روی تکثیر لنفوسیت بر اساس غلظت‌ها و قسمت های مختلف گیاه



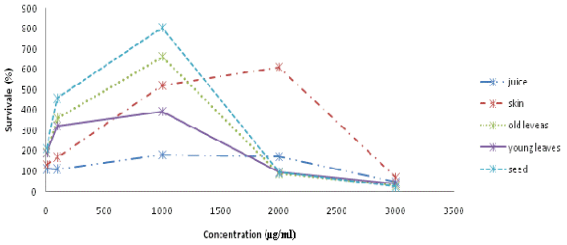
نمودار ۲- اثر عصاره‌های متانولی قسمت‌های مختلف انگور شاهرودی قزوین بر روی تکثیر لنفوسیت بر اساس غلظت‌ها و قسمت‌های مختلف گیاه



نمودار ۳- اثر عصاره‌های متانولی قسمت‌های مختلف انگور یاقوتی کاشان بر روی تکثیر لنفوسیت بر اساس غلظت‌ها و قسمت‌های مختلف گیاه



نمودار ۴- اثر عصاره‌های متانولی قسمت‌های مختلف انگور حلوایی کاشان بر روی تکثیر لنفوسیت بر اساس غلظت‌ها و قسمت‌های مختلف گیاه



نمودار ۵- اثر عصاره‌های متانولی قسمت‌های مختلف انگور قرمز یاقوتی درشت کاشان بر روی تکثیر لنفوسیت بر اساس غلظت‌ها و قسمت‌های مختلف گیاه

نتایج به دست آمده، بیشترین تکثیر را برای برگ پیر و هسته و کمترین تکثیر را برای آب در هر پنج رقم انگور نشان داد. به طوری که عصاره متانولی هسته در ارقام شاهرودی و قرمز یاقوتی درشت، به ترتیب با ۸/۴ و ۸ برابر و عصاره متانولی برگ پیر در ارقام بی‌دانه سفید، یاقوتی و حلوایی، به ترتیب با ۸/۸، ۷/۵ و ۶/۴ برابر افزایش رشد لنفوسیت، بیشترین تاثیر را نشان دادند. همچنین بیشترین اثر تکثیر کنندگی برای عصاره‌های هسته، برگ پیر و برگ جوان در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد و در غلظت‌های بالاتر سلول‌های لنفوسیت کاهش می‌یابند. در حالی که عصاره پوست بر خلاف سایر عصاره‌ها بیشترین تکثیر را در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داد. نتایج حاصل از CC۵۰ نیز که در جدول ۱ خلاصه شده است نشان می‌دهد که در تمامی ارقام به جز یاقوتی، هسته دارای کمترین و پوست دارای بیشترین میزان CC۵۰ می‌باشد. برای تمامی عصاره‌ها CC۵۰ بیشتر از ۲۵۰۰ به دست آمد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱- CC۵۰ عصاره‌های متانولی پنج رقم انگوربررسی شده بر حسب بخش‌های مختلف گیاه

	آب	برگ پیر	برگ جوان	پوست	هسته
بیدانه سفید	۲۷۵۰	۲۹۶۰	۲۹۱۰	>۳۰۰۰	-
شاهرودی	>۳۰۰۰	۲۸۰۰	۲۸۴۰	>۳۰۰۰	۲۵۰۰
یاقوتی	۲۹۰۰	۲۶۵۰	۲۸۵۰	>۳۰۰۰	۲۷۵۰
حلوایی	>۳۰۰۰	۲۸۹۰	۲۹۲۰	>۳۰۰۰	۲۷۸۰
قرمز یاقوتی درشت	۲۹۰۰	۲۶۵۰	۲۷۸۰	>۳۰۰۰	۲۵۵۰

بحث

تحقیق نشان داد که عصاره‌های متانولی تمام بخش‌های ۵ رقم انگور بررسی شده در این تحقیق به جز آب، باعث افزایش تکثیر لنفوسیت می‌گردند. مطالعات مشابهی در ارتباط با تاثیر ترکیبات مختلف موجود در انگور بر روی لنفوسیت انجام شده است. براتیج و همکاران در سال ۱۹۸۴ گزارش نمودند که ترکیبات فلاوونوئیدی موجود در انگور از جمله کاتچین و کوئرسیتین ترانسفورماسیون خودبه خودی لنفوسیت را افزایش می‌دهند (۱۰). اما در بررسی دیگری در سال ۱۹۸۶، مشاهده شد که فلاوونوئیدها دارای اثر مهاری بر تکثیر لنفوسیتی القا شده به وسیله فیتومیتوژن‌ها می‌باشند (۱۱). در میان ترکیبات غیر فلاوونوئیدی موجود در انگور، رسوراترول بیش از سایر ترکیبات مورد بررسی قرار گرفته است. در بسیاری از مطالعات انجام شده، اثر مهاری رسوراترول بر تکثیر لنفوسیتی مشاهده گردید (۱۲). با این وجود سای و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که اثر رسوراترول بر روی سیستم ایمنی و تکثیر لنفوسیت به غلظت آن و همچین مدت زمان انکوبه شدن با رسوراترول بستگی دارد (۱۳). مطالعات مشابهی در این زمینه نشان داد که غلظت‌های پایین رسوراترول برخلاف غلظت‌های بالای این ماده، باعث افزایش تکثیر لنفوسیت و تولید سیتوکین‌ها می‌گردد (۱۴،۱۵). وینکلر و همکاران در سال ۲۰۰۴، با قرار دادن افراد HIV مثبت و سالم تحت یک رژیم طولانی مدت از آب میوه‌های غنی از پلی فنول مانند انگور قرمز افزایش تکثیر لنفوسیتی القا شده با فیتوهماگلوتینین را در هر دو دسته افراد مورد آزمایش گزارش نمودند (۸). اغلب پلی فنول‌ها متابولیت ثانویه می‌باشند. نشان داده شده است که برداشت دیرهنگام انگور باعث افزایش محتوی پلی فنولی آن می‌گردد و بنابراین برگ‌های پیر حاوی مقادیر بیشتری از ترکیبات پلی‌فنلی می‌باشند (۱۶). از این رو تاثیر بالای عصاره برگ های پیر بر تکثیر لنفوسیتی را می‌توان به محتوای بیشتر ترکیبات پلی فنلی در آنها مربوط دانست. انگورها غنی از پروآنتوسیانیدین هستند که تقریبا ۶۰ تا ۷۰ درصدآن در هسته وجود دارد (۱۷،۱۸). ژانگ و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش کردند که پرو آنتوسیانیدین موجود در هسته انگور از طریق افزایش تکثیر لنفوسیت و تولید اینترلوکین۲ و اینترفرون گاما موجب افزایش خاصیت آنتی توموری دوکسوروبیسین می‌گردد (۱۹). بنابراین می‌توان تاثیر بالای عصاره هسته بر تکثیر لنفوسیتی را که در این پژوهش مشاهده شد، به پروآنتوسیانیدین موجود درآن نسبت داد. همچنین رسوراترول که در مقادیر بالایی در هسته انگور وجود دارد نیز می‌تواند منشا این تاثیرات باشد. بنابر نتایج حاصل از این پژوهش میوه و همچنین برگ انگور، با دارا بودن خاصیت تکثیر کنندگی می‌تواند در درمان بیماری‌های نقص ایمنی مانند سرطان‌ها، لوکمی‌ها و HIV مورد استفاده قرار گیرد.

REFERENCES

1. Taffazoli A, Hekmati J, Firoze P. Grape. 2nd ed. Shiraz: Shiraz University Press; 1991. [In Persian]
2. Nejatian MA. collection and Initial assessment of grape cultivars of Qazvin. Seed and Plant Improvement Journal 2006; 22:319-38. [In Persian]
3. Kaousar AH, Hebash HM, Fadel Mervat MA, Soliman. Volatile components of grape leaves. Journal of Islamic Academy of Sciences 1991; 4:26-28.
4. Kim Y, Choi Y, Ham H, Jeong HS, Lee J. antioxidant and cytoprotective effects of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from defatted grap seed in pc12 cells. J Med Food 2012; 15:490-94.
5. Chois K, Zhang XH, Seo JS. Suppression of oxidative stress by grape seed supplementation in rats. Nutr Res Pract 2012; 6:3-8.
6. Gürbüz O, Göçmen D, Dagdelen F, Gürsoy M, Aydin S, Şahin I, et al. Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes wine using HPLC with fluorescence detection. Food Chem 2005; 100:518-52.
7. Amarowics R, Weidner S. Biological activity of grapevine phenolic compounds. Grapevine Molecular Physiology and Biotechnology 2009; 12: 389-405.

Archive of SID

www.SID.ir

8. Winkler P, Ellinger S, Boetzer AM, Arendt BM, Berthold HK, Rockstroh JK, et al. Lymphocyte proliferation and apoptosis in HIV seropositive and healthy subjects during long-term ingestion of fruit juices or a fruit-vegetableconcentrate rich in polyphenols and antioxidant vitamins. Eur J Clin Nutr 2004; 58:317-25.

9. Burton JD. The MTT assay to evaluate chemosensivity. Methods Mol Med 2005; 110: 69-78.

10. Brattig NW, Diao GJ, Berg PA. Immunoenhancing effect of flavonoid compounds on lymphocyte proliferation and immunoglobulin synthesis. Int J Immunopharmacol 1984; 6:205-15.

11. Mookerjee BK, Lee TP, Logue GP, Lippes HA, Middleton E. The effects of flavonoids on human lymphocyte proliferative responses. Prog Clin Biol Res 1986; 213:511-20.

12. Gao X, Xu YX, Janakiraman N, Chapman RA, Gautam SC. Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production. Biochem Pharmacol 2001; 62:1299-308.

13. Hsieh T, Halicka D, Lu X, Kunicki J, Guo J, Darzynkiewicz Z, Wu J. Effects of resveratrol on the G0–G1 transition and cell cycle progression of mitogenically stimulated human lymphocytes. Biochem Biophys Res Commun 2002; 297:1311-17.

14. Feng YH, Zhou WL, Wu QL, Li XY, Zhao WM, Zou JP. Low dose of resveratrol enhanced immune response of mice. Acta Pharmacol Sin 2002; 23:893-97.

15. Sebastià N, Almonacid M, Villaescusa JI, Cervera J, Such E, Silla MA, Soriano JM, Montoro A. Radioprotective activity and cytogenetic effect of resveratrol in human lymphocytes: an in vitro evaluation. Food Chem Toxicol 2013; 51:391-95.

16. Pérez-Magariño S. Polyphenols and color variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. Food Chem 2006; 96:197-208.

17. Kaur M, Agarwal C, Agarwal A. Anticancer and cancer chemopreventive potential of grape seed extract and other grape-based products. Nutrition 2009; 109:64-68.

18. Shi J, Yu J, Pohorly JE, Kakuda Y. Polyphenolic in grape seeds biochemistry and functionality. J Med Food 2003; 6:291-99.

19. Zhang XY, Li WG, Wu YJ, Zheng TZ, Li W, Qu SY, et al. Proanthocyanidin from grape seeds potentiates anti-tumor activity of doxorubicin via immunomodulatory mechanism. Int Immunopharmacol 2005; 5:1247-57.

Archive of SID

www.SID.ir