

## آنالیز کمی میزان لکتین کل موجود در پیکره داروایش مستقر روی پایه‌های انجیلی و ممرز در مرحله گلدهی

ساناز یوسف‌وند<sup>۱</sup>، فرنوش فتاحی<sup>۲\*</sup>، سید محسن حسینی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد مدیریت مرتع (گروه مرتعداری، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران)

<sup>۲</sup> استادیار رشته گیاهان دارویی (گروه مرتعداری، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران)

<sup>۳</sup> استاد اکولوژی (گروه علوم و مهندسی جنگل، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران)

\*نویسنده مسئول: [f.fattahi@modares.ac.ir](mailto:f.fattahi@modares.ac.ir)

### چکیده

داروایش *Viscum album L.* یک گیاه نیمه انگل و همیشه سبز است که روی شاخه میزبان‌های مختلف رشد می‌کند، این گیاه دارای طیف وسیعی از مواد فعال زیستی از جمله لکتین می‌باشد که خاصیت القاکننده مرگ سلول‌های سرطانی دارد، از عصاره داروایش در اروپا به عنوان درمان‌های مکمل سرطان استفاده می‌شود. این گونه در ایران بر روی درختان مختلف از جمله گونه‌های اندمیک و بومی جنگ‌های هیرکانی می‌روید. هدف از این پژوهش، مقایسه میزان لکتین کل موجود در شاخ و برگ داروایش مستقر بر درخت انجیلی و ممرز در مرحله گل‌دهی بود. در این تحقیق، نمونه‌های گیاهی از ۳ بوته داروایش مستقر بر هر پایه، سه پایه (۳ تکرار) از هر گونه میزبان، در شرایط مشابه اکولوژیکی واقع در جنگل کلرد امل جنگل‌های هیرکانی مورد نمونه برداری قرار گرفتند، نمونه‌ها پس از عصاره‌گیری، برای آنالیز به دستگاه ELISA تزریق شدند. نتایج حاکی از آن بود که در این عصاره میزان لکتین کل در پایه ممرز ۰/۴۱ و در پایه انجیلی ۰/۲۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بود، بیشترین میزان این ترکیب مربوط به داروایش مستقر بر پایه ممرز بود.

**واژه‌های کلیدی:** داروایش، ضدسرطان، لکتین، نیمه‌انگل

### مقدمه

قرن‌ها است که مردم از گیاهان برای اهداف پزشکی استفاده می‌کنند. بر اساس برخی "سنگ‌نوشته‌ها" و شواهد دیگر، به نظر می‌رسد مصری‌ها و چینی‌ها در زمره نخستین اقوام بشری بوده باشند که بیش از ۲۷ قرن قبل از میلاد مسیح، از گیاهان به عنوان دارو استفاده کرده (امیدبگی، ۱۳۸۴). در سال‌های اخیر به دلیل اثرات نامطلوب و عوارض جانبی داروهای شیمیایی توجه زیادی به استفاده از گیاهان دارویی و فرآورده‌های آن‌ها شده است (قره‌خانی و همکاران، ۱۳۹۰). داروایش *Viscum album L.* از خانواده Santalaceae، بوته‌ای نیمه انگل، همیشه سبز و پویا با قطر حدود ۶۰ تا ۹۰ سانتی‌متر بوده، که آب و عناصر ضروری خود شامل نیتروژن و بخشی از غذای خود را از درخت میزبان و توسط یک اندام ریشه مانند به نام هاستوریوم<sup>۱</sup> جذب می‌کند (Morgenstern, 2002; Christenson et al., 2003; Bar-Sela, 2011; Gastauer et al., 2017; Ahmad et al., 2018). بیضی سبز چرمی، گل‌های کوچک با رنگ زرد که اغلب در اواخر زمستان باز می‌شوند و میوه‌های توتی سفید چسبناک تشکیل شده است (Zuber, 2004; Ahmad et al., 2018). عصاره داروایش حاوی مواد مختلف بیولوژیکی است و بسته به زمان برداشت، گونه های درخت میزبان و فرآیند تولید ممکن است محتوای آن متفاوت باشد، به عنوان مثال ترکیباتی از جمله لکتین‌ها، ویسکوتوکسین ها، اسیدهای آمینه، فلاونوئیدها، فنیل پروپانوییدها، تری‌ترپن‌ها، فیتواسترول، آلکالوئیدها، پلی‌الکل‌ها، پلی‌ساکاریدها در عصاره آن گزارش شده است (Melzer et al., 2009). بعضی از اثرات دارویی آن ممکن است مربوط به حضور ترکیب لکتین باشد، لکتین‌ها

<sup>1</sup>-Haustoria

پروتئین‌های متصل به قند هستند که علت اثر آپوپتوز نقش اساسی در درمان سرطان را دارند (Kim et al., 2017; Nazaruk and Orlikowski, 2016; Maletzki et al., 2013; Hajto et al., 2005). این گیاه اغلب به طور گسترده‌ای در فرهنگ‌های مختلف، تقریباً در تمام قاره‌ها برای درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان، دیابت، فشارخون و صرع مورد استفاده قرار می‌گیرد (Gupta 2013). بسیاری از اثرهای درمانی آن مانند آپوپتوز<sup>۱</sup>، محرک سیستم ایمنی (Lavastre et al., 2004) و اثر سمیت سلولی (Cebovic et al., 2008) به اثبات رسیده است. پارامترهای مختلفی مثل سرشت اکولوژیک گونه میزبان، دوره زندگی گیاهی دارویش و همچنین نوع اندام گیاه در تعیین کمیت و کیفیت ترکیبات زیست فعال دارویش تأثیرگذار می‌باشند، لذا انتظار می‌رود که اثرات درمانی مواد مؤثره موجود در دارویش بسته به این عوامل متفاوت باشد (Vicaş et al., 2011; Barbasz et al., 2012; Wojciak-Kosior et al., 2017; Stefanucci et al., 2020). به عنوان مثال OnayUcar et al., 2006 در تحقیقی دریافتند که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه با توجه به درخت میزبان و همچنین زمان برداشت متفاوت است، در این تحقیق عصاره‌های متانولی *V. album* رشد یافته بر روی درختان میزبان مختلف از نظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت طبق نتایج درخت لیمو در فصل تابستان بیشترین تأثیر را داشت. جنگل‌های هیرکانی ایران با مساحت حدود ۱/۹ میلیون هکتار در شمال ایران بر روی شیب‌های شمالی کوه‌های البرز و سواحل جنوبی دریای خزر واقع شده است، جنگل کلرد در شهرستان آمل در محدوده جنگل‌های هیرکانی واقع شده است. این جنگل‌ها یکی از قدیمی‌ترین و ارزشمندترین جنگل‌های ایران محسوب می‌گردد. دو گونه از میزبان‌های دارویش، گونه انجیلی (*Parrotia persica* C.A. Meyer) از خانواده Hamamelidaceae و گونه ممرز (*Carpinus betulus* L.) از خانواده Betulaceae، از گونه‌های اندمیک و بومی این جنگل‌ها هستند (Hosseini et al., 2007; Parsakhoo and Jalilvand, 2009; Sefidi et al., 2011; Carabus et al., 2015). در این پژوهش تأثیر گونه میزبان بر کمیت ماد مؤثره دارویی لکتین موجود در دارویش مستقر بر میزبان‌های انجیلی و ممرز در مرحله گل‌دهی در جنگل کلرد جنگل‌های هیرکانی ایران مورد مطالعه قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

#### منطقه مورد مطالعه

مواد گیاهی مورد نیاز در این پژوهش از جنگل کلرد در شهرستان آمل در ارتفاع ۷۰۰-۱۱۰۰ متر از سطح دریا با شیب ۲۰ تا ۴۰ درصد، جهت شرقی و با میانگین بارش سالیانه ۹۵۰ میلی‌متر جمع‌آوری گردید (جدول ۱). این جنگل در موقعیت مرکزی جنگل‌های هیرکانی قرار دارد و دارای گونه‌های مختلف علفی، درختچه‌ای و درختی می‌باشد.

جدول ۱. موقعیت جغرافیایی منطقه نمونه برداری.

گونه میزبان	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
ممرز	۵۲°۲۱′۷″	۳۶°۱۶′۱۳″
انجیلی	۵۲°۲۱′۱۳″	۳۶°۱۶′۱۱″

### برداشت گیاه دارویش

مرگ برنامه ریزی شده سلول‌های توموری: Apoptosis<sup>1</sup> -

گیاهان دارویش در مرحله گل‌دهی از درختان میزبان انجیلی و ممرز برداشت شدند. ابتدا سه پایه (۳ تکرار) از هر گونه میزبان که تقریباً در شرایط اکولوژیکی همسانی از لحاظ خاک، شیب، جهت و ارتفاع از سطح دریا بودند انتخاب شدند. پایه‌های میزبان به گونه‌ای انتخاب شدند که از نظر قطر، ارتفاع و مورفولوژیک یکسان بوده و از سایر استرس‌ها از قبیل آفات، امراض و حتی وجود دار دوست و پوسیدگی در تنه به دور باشند. سپس بر روی هر پایه سه بوته دارویش علامت‌گذاری شد. نمونه‌های دارویش از شاخه‌هایی که در وضعیت تاجی (وضعیت نورگیری و ارتفاع از سطح زمین) یکسانی بودند انتخاب شدند. شاخه‌ها از نظر قطر، طول و جهت قرارگیری نسبت به نور خورشید یکسان بودند. سپس در هر فصل برداشت، از هر بوته پنج شاخه که هر یک شامل سه رشد آخر دارویش بودند برداشت شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده پس از نمونه‌برداری به‌صورت جداگانه در فویل آلومینیومی پیچیده و بر روی یخ قرار داده شدند و بلافاصله به آزمایشگاه دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس انتقال یافتند. نمونه‌ها به مدت چند ثانیه در تانک ازت مایع قرار داده شده و نهایتاً تا زمان عصره‌گیری در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. (شکل ۱)



شکل ۱. برداشت گیاه دارویش.

### تهیه عصاره

#### خشک و پودر کردن نمونه

شاخ برگ دارویش به مدت ۷۲ ساعت در فریزدرایر گذاشته شده و کاملاً خشک شدند. سپس تمامی نمونه‌های هر مرحله با هم ترکیب شدند و با استفاده از هاون پودر شدند از هر نمونه پودر شده، ۳ تکرار به وزن ۰/۲ گرم جدا شد تا مورد سنجش شیمیایی قرار گیرند.

#### استخراج لکتین

برای استخراج لکتین ۲۰۰ میلی‌گرم گیاه پودر شده با ۵ میلی‌لیتر بافر نمک فسفات (PBS) حل شد و یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد باقی ماند. سپس به وسیله هموژنایزر مکانیکی حدود ۱ دقیقه همگن شد. نمونه‌ها در ۴۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی جدا شد. این عمل یک‌بار با اضافه کردن حلال جدید، ۵ میلی‌لیتر PBS و بار دیگر با اضافه کردن ۵ میلی‌لیتر PBS به همراه ۱۸۱ میلی‌گرم گالاتوز تکرار شد. عصاره‌ها با هم ترکیب شدند و حجم نهایی به مقدار ۱۵ میلی‌لیتر رسید.

<sup>3</sup> Phosphate buffered saline

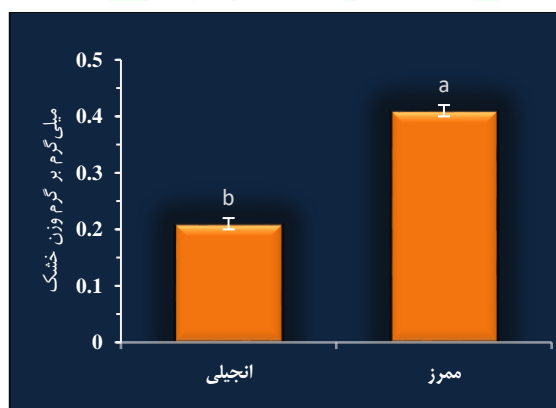
عصاره‌های لکتین تا زمان ارزیابی شیمیایی در فریزر و تحت دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس برای آنالیز به وسیله دستگاه ELISA به موسسه Hiscia کشور سوئیس ارسال شدند (Urech et al. 2006).

### تجزیه و تحلیل

در این پژوهش داده‌های به دست آمده در نرم افزار اکسل به عنوان بانک اطلاعات ذخیره شد، برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزار SAS نسخه ۹.۴ استفاده شد.

### نتایج و بحث

طبق یافته‌ها، نتایج حاکی از آن بود که میان کمیت لکتین موجود در داروаш مستقر بر پایه انجیلی و ممرز در فصل زمستان اختلاف معنی‌دار با سطح احتمال یک درصد داشته است. در این عصاره میزان لکتین در داروаш‌های مستقر بر میزبان‌های ممرز و انجیلی به ترتیب ۰/۴۱ و ۰/۲۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک پیکره رویشی داروаш بوده است که بیشترین مقدار لکتین مربوط میزبان ممرز بوده است (شکل ۲). این پژوهش نشان داد که عصاره دارواش حاوی لکتین می‌باشد که میزان آن‌ها با توجه به نوع میزبان متفاوت است هم راستا با نتایج این پژوهش، در تحقیقی گانیو و اولوواسون (۲۰۰۸) خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی دارواش مستقر بر میزبان‌های کاکائو و بادام را با هم مقایسه کردند، نتایج حاکی از آن بود که توانایی مهار رادیکال‌های آزاد دارواش مستقر بر میزبان کاکائو بیشتر از دارواش مستقر بر میزبان بادام بوده است. همچنین در مطالعه پیترزاک و همکاران (۲۰۱۷) که روی اندازه‌گیری میزان اسیدفنولیک و فلاونوئیدهای موجود در عصاره دارواش‌های رشد کرده بر ۵ گونه درختی انجام شد، بالاترین مقدار این مواد در عصاره دارواش مستقر بر دو گونه صنوبر تبریزی (*Populus nigra L.*) و تیس (*Sorbus aucuparia L.*) گزارش شد. با توجه به وجود این ترکیب ارزشمند در گیاه دارواش می‌توان از این گیاه به عنوان گونه ارزشمند دارویی در صنایع داروسازی استفاده کرد.



شکل ۲. میزان لکتین کل موجود در پیکره دارواش‌های مستقر بر پایه‌های انجیلی و ممرز در مرحله گل‌دهی. هر ستون نشان دهنده میانگین سه تکرار  $\pm$  خطای استاندارد است، حروف متفاوت در شکل نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد با آزمون LSD می‌باشد.

## منابع

- امیدیگی، ر. ۱۳۸۴. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. انتشارات آستان قدس رضوی، (۱): ۳۴۷.
- قره‌خانی، م.، قربانی، م.، رسول نژاد، ن.، جبرائیلی، ش. ۱۳۹۰. روش‌های نوین استخراج ترکیبات مؤثره از گیاهان دارویی استخراج به کمک فراصوت و ریزموج و استخراج با حلال فشرده. مهندسی شیمی ایران، ۵۹(۱۰): ۳۶-۲۴.
- Ahmad, S., Mir, N. and Sultan, S. 2018. White-berry mistletoe (*Viscum album* L.): a hemiparasitic plant: occurrence and ethnobotanical use in Kashmir. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(1): 1831-1833.
- Barbasz, A., Kreczmer, B., Rudolphi-Skórska, E. and Sieprawska, A. 2012. Biologically active substances inplant extracts from mistletoe (*Viscum album*) and trees: fir (*Abies alba* Mill.), pine (*Pinus sylvestris* L.) and yew (*Taxus baccata* L.). *Herba Polonica*, 58(1): 16-26.
- Bar-Sela, G. 2011. White-Berry Mistletoe (*Viscum album* L.) as Complementary Treatment in Cancer: does it help? *European Journal of Integrative Medicine*, 3(2): 55-62.
- Carabus, M.C., Leinemann, L., Curtu, A.L. and Sofletea, N. 2015. Preliminary results on the genetic diversity of *Carpinus betulus* in carpathian populations. *Bulletin of the Transilvania University of Brasov. Forestry, Wood Industry, Agricultural Food Engineering. Series II*, 8(2): 1.
- Cebovic T., Spasic S. and Popovic M., 2008. Cytotoxic Effects of the *Viscum Album* L. Extract on Ehrlich Tumour Cells in Vivo, *Phytotherapy Research*, 22(8): 1097-1103.
- Christenson, J.A., Young, D. and Olsen, M.W. 2003. True mistletoe, the University of Arizona, Publication AZ, Online at: <http://www.ag.arizona.edu/pubs/diseases/az>, 1308.Cocoa Tree (*Theobroma Cacao*), *International Journal of Herbs and Pharmacological Research*, 3(1): 24-29.
- Gastauer, M., Neto, M. and Alves, J.A. 2017. Updated Angiosperm Family Tree for Analyzing Phylogenetic Diversity and Community Structure. *Acta Botanica Brasilica*, 31(2): 191-198.
- Hajto, T., Hostanska, K., Berki, T., Pálincás, L., Boldizsár, F. and Németh, P. 2005. Oncopharmacological perspectives of a plant lectin (*Viscum album agglutinin-I*): overview of recent results from in vitro experiments and in vivo animal models, and their possible relevance for clinical applications. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1): 59-67.
- Hosseini, S. M., Kartoolinejad, D., Mirnia, S. K., Tabibzadeh, Z., Akbarinia, M. and Shayanmehr, F. 2007. The effects of *Viscum album* L. on foliar weight and nutrients content of host trees in Caspian forests (Iran). *Polish Journal of Ecology*, 55(3): 579.
- Kim, S., Kim, K.C. and Lee, C. 2017. Mistletoe (*Viscum album*) Extract Targets Axl to Suppress Cell Proliferation and Overcome Cisplatin-and Erlotinib-Resistance in non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Phytomedicine*, 36: 183-193.
- Lavastre, V., Cavalli, H., Rathe, C. and Girard, D. 2004. Anti-Inflammatory Effect of *Viscum album* Agglutinin-I (VAA-I): Induction of Apoptosis in Activated Neutrophils and Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced Neutrophilic Inflammation in Vivo, *Clinical & Experimental Immunology*, 137(2): 272-278.
- Maletzki, C., Linnebacher, M., Savai, R. and Hobohm, U. 2013. Mistletoe Lectin has a Shiga Toxin-Like Structure and Should be Combined With other Toll-Like Receptor Ligands in Cancer Therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 62(8): 1283-1292.
- Melzer, J., Iten, F., Hostanska, K. and Saller, R. 2009. Efficacy and safety of mistletoe preparations (*Viscum album*) for patients with cancer diseases. *Complementary Medicine Research*, 16(4): 217-226.
- Morgenstern, K. 2002. Mysterious Mistletoe. *Cancer*.
- Nazaruk, J. and Orlikowski, P. 2016. Phytochemical profile and therapeutic potential of *Viscum album* L. *Natural product research*, 30(4): 373-385.
- Oluwaseun, A.A. and Ganiyu, O. 2008. Antioxidant properties of methanolic extracts of mistletoes (*Viscum album*) from cocoa and cashew trees in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 7(17).
- OnayUçar, E., Karagoz, A. and Arda, N. 2006. Antioxidant activity of *Viscum album* ssp. *album*. *Fitoterapia*, 77(7-8): 556-560.
- Parsakhoo, A. and Jalilvand, H. 2009. Effects of iron wood (*Parrotia persica* CA Meyer) leaf litter on forest soil nutrients content. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science*, 5(2): 244-249.

- Pietrzak, W., Nowak, R., Gawlik-Dziki, U., Lemieszek, M. K. and Rzeski, W. 2017. LC-ESI-MS/MS identification of biologically active phenolic compounds in mistletoe berry extracts from different host trees. *Molecules*, 22(4): 624.
- Sefidi, K., Mohadjer, M.R.M., Etemad, V. and Copenheaver, C.A. 2011. Stand characteristics and distribution of a relict population of Persian ironwood (*Parrotia persica* CA Meyer) in northern Iran. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 206(5): 418-422.
- Stefanucci, A., Zengin, G., Llorent-Martinez, E. J., Dimmito, M. P., Della Valle, A., Pieretti, S., ... and Mollica, A. 2020. *Viscum album* L. homogenizer-assisted and ultrasound-assisted extracts as potential sources of bioactive compounds. *Journal of Food Biochemistry*, 44(9): e13377.
- Urech, K., Schaller, G. and Jäggy, C. 2006. Viscotoxins, mistletoe lectins and their isoforms in mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador. *Arzneimittelforschung*, 56(06): 428-434.
- Vicaș, S. I., Rugină, D. and Socaciu, C. 2011. Comparative study about antioxidant activities of *Viscum album* from different host trees, harvested in different seasons, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(11): 2237-2244.
- Wojciak-Kosior, M., Sowa, I., Pucek, K., Szymczak, G., Kocjan, R. and Luchowski, P. 2017. Evaluation of Seasonal Changes of Triterpenic Acid Contents in *Viscum Album* from Aifferent Host Trees, *Pharmaceutical biology*, 55(1): 1-4.
- Zuber, D. 2004. Biological flora of central Europe: *Viscum album* L. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 199(3): 181-203.

### Quantitative analysis of total lectin content of foliage European mistletoe (*Viscum album* L.) settled on ironwood and hornbeam bases in the flowering stage

Sanaz Yousefvand<sup>1</sup>, Farnoosh Fattahi<sup>\*2</sup>, Seyed Mohsen Hosseini<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Master student in rangeland management (Department of Range Management, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran)

<sup>2</sup>Assistant Professor of Medicinal Plants (Department of Range Management, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran)

<sup>3</sup>Professor of Ecology (Department of Forest Science and Engineering, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran)

\*Corresponding Author: [f.fattahi@modares.ac.ir](mailto:f.fattahi@modares.ac.ir)

#### Abstract

Mistletoe (*Viscum album* L.) is a hemi-parasitic and evergreen plant that grows on various host branches. This plant has a wide range of biologically active substances including lectin, which has apoptotic properties. Mistletoe extract is used in Europe as a complementary cancer treatment. In Iran, this species grows on various trees, including endemic and endemic species of Hyrcanian wars. The aim of this study was to compare the amount of total lectin in mistletoe foliage located on *Parrotia persica* and *Carpinus betulus* in flowering stage. In this study, plant samples from 3 mistletoe plants located on each base, three base (3 replications) of each host, were sampled in similar ecological conditions located in Kelerd Amol forest of Hyrcanian forests. Analyzes were injected into ELISA. The results showed that the amount of total lectin in *Carpinus betulus* base was 0.41 and in *Parrotia persica* base was 0.21 mg/g dry weight. The highest amount of this compound was related to mistletoe based on *Carpinus betulus*.

**Keywords:** Anti-cancer, Hemi-parasite, Lectin, Mistletoe