مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۱۹٤/هفته چهارم مردادماه ۱۳۹۱

مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۲۰

مصرف عصاره‌ی پوست انار تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال را افزایش و پیشرفت آترواسکلروز را کاهش می‌دهد

مولود احمدی[۱]، دکتر نفیسه نیلی[۲]، دکتر شقایق حق‌جوی جوانمرد[۳]، هاجر ناجی[۴]، دکتر ابراهیم سید طباطبایی[۲]

چکیده

مقدمه: بهبود اختلال عملکرد اندوتلیوم منجر به کاهش تشکیل پلاک آترواسکلروز می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند باعث کاهش پلاک آترواسکلروز شوند. هدف تحقیق حاضر، بررسی اثرات مفید عصاره‌ی آنتوسیانینی پوست انار بر افزایش تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال و کاهش آترواسکلروز در خرگوش‌هایی بود که رژیم پر کلسترول دریافت کردند.

روش‌ها: تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال (Endothelial progenitor cell یا EPC) با استفاده از فلوسایتومتری و میزان تشکیل رگه‌های چربی در آئورت خرگوش‌های با رژیم طبیعی، پر کلسترول و پر کلسترول به علاوه‌ی عصاره‌ی آنتی‌اکسیداسیون پوست انار (Pomegranate یا POM) به میزان ۱ درصد در آب آشامیدنی، با تکنیک رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: مکمل عصاره‌ی آنتی‌اکسیداسیون پوست انار به طور معنی‌داری تعداد EPC را افزایش داد (گروه POM ۱/۶ ± ۹/۹۵، گروه High cholesterol (HC) ۲/۲ ± ۳/۶ و گروه شاهد ۰/۶ ± ۲/۰۱ با $P < ۰/۰۵$) و میزان تشکیل ضایعه‌ی آترواسکلروز را در گروه دریافت‌کننده‌ی عصاره‌ی پوست انار به طور معنی‌داری کاهش داد.

نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان داد که اثرات مفید عصاره‌ی آنتی اکسیداسیون پوست انار در جلوگیری از آترواسکلروز ممکن است به دلیل تغییر تعداد EPC و ترمیم زودرس آسیب اندوتلیال باشد.

واژگان کلیدی: آترواسکلروز، انار، آنتی‌اکسیداسیون، آنتوسیانین، سلول‌های پیش‌سازاندوتلیال

مقدمه

آترواسکلروز مهم‌ترین علت ایجاد بیماری قلبی و عروقی می‌باشد که یک مشکل عمده‌ی سلامتی در کل جهان است (۱). ایجاد و پیشرفت آتروسکلروز با انباشتگی چربی در ماکروفاژها و سلولهای عضلات صاف و بازآرایی جدار رگ همراه است. (۳-۲).

استرس اکسیداتیو که عامل مهمی در آترواسکلروز می‌باشد با پرواکسیداسیون لیپید در ارتباط است و منجر به صدمه به سلول اندوتلیال می‌گردد. استرس اکسیداتیو باعث افزایش بیان ژن‌های واکنشی و حساس در سلول های اندوتلیال می‌شود (۴). مطالعات اپیدمیولوژیک زیادی وجود دارد که اثرات مفید رژیم‌های سرشار از ترکیبات آنتی‌اکسیدان را بر آترواسکلروز نشان می دهد (۵). نشان داده شده است

[۱] کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۲] استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۳] استادیار، گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۴] دانشجوی کارشناس ارشد، گروه فیزیولوژی جانوری، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر شقایق حق‌جوی جوانمرد
Email: sh_haghjoo@med.mui.ac.ir

که وجود فلانوییـد در رژیـم غـذایی مـی‌توانـد اکسیداسـیون لیپـوپروتئین کـم تـراکم (LDL-C یـا Low density Lipoprotein cholesterol) را متوقـف کند و از شـروع و پیشـرفت آترواسـکلروز جلـوگیری نمایـد (۶). بـه عـلاوه نشـان داده شـده اسـت کـه آنتی‌اکسیداسیون‌ها، سطح سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال را افزایش می‌دهند و باعث تضعیف و کاهش انـدازه‌ی پلاک آترواسکلروز می‌شوند (۷). بـا ایـن کـه عوامـل دارویی ترکیبی مختلفی مـی‌تواننـد مقاومـت LDL بـه اکسیداسـیون را افـزایش دهنـد، پـس از اسـتفاده از محصـولات غـذایی طبیعـی ماننـد میـوه‌جـات و سبزی‌جات به عنوان منابع رژیمی قوی آنتی‌اکسیدان که می‌توانند در جلوگیری اکسیداسـیون LDL بـه کـار روند، توجه زیادی به آن‌ها جلب شده است.

انار میوه‌ای دارای آثار شناخته شده‌ی درمانی متعدد در طب سنتی است و به طـور مـؤثر در درمـان فشـار خون بالا (۸)، التهاب (۹) و استرس اکسیداتیو (۱۰) به کار می‌رود. انار منبع مهمی از ترکیبات فعال مـی‌باشـد که برای سلامتی انسـان بـا ارزش اسـت. پوسـت انـار حاوی اسیدهای پلی فنولیک فلانوییدها و آنتوسیانین‌ها می‌باشد (۱۱).

در میان آنتوسیانین‌های مختلف موجـود در میـوه و سـبزی، دلفینیـدین بـه عنـوان قـوی‌تـرین بازدارنـده‌ی اکسیداسـیون شـناخته مـی‌شـود و دارای ویژگـی‌هـای آنتی‌آنژیوژنیک مهم است که می‌تواند برای پیش‌گیری و درمان سرطان مفید باشد (۱۲). دلفینیدین ماده ی اصـلی در پوست برخی گونه های انار اسـت. بنـابراین پوسـت انار می‌تواند منبع مهمی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی باشد کـه در پـیش‌گیـری از بسـیاری از بیمـاری‌هـا ماننـد آترواسکلروز مفید هستند.

در خون افراد بالغ، سلول‌های مشـتق شـده از مغـز استخوان که قابلیت تمایز به سلول‌های اندوتیال بالغ را دارا می‌باشـند، وجـود دارد کـه بـه آن‌هـا سـلول‌هـای پیش‌ساز انـدوتلیال (Endothelial progenitor cell یـا EPC) گفتـه مـی‌شـود. روی سـطح ایـن سـلول‌هـای پیش‌ساز انـدوتلیال سـه مـارکر بـه نـام‌هـای CD133، CD34 و VEGFR-2 شناسایی شده است. CD133 که به طور معمول AC133 نامیده می‌شود و یک پلی‌پپتید غشایی ۱۲۰ کیلودالتون است، در پیش‌سازهای خـونی و سلول‌های پیش‌ساز از مغز استخوان افراد بـالغ، بیـان می‌شود (۱۳). EPCهای موجود در مغز اسـتخوان کـه CD133، CD34 و VEGFR-2 را بیان می‌کنند، به مرور هنگامی که در جریان خون محیطی بالغ می‌شـوند قـادر به بیان CD133 نمی‌باشـند و در عـوض قـادر بـه بیـان فاکتورهای اختصاصی انـدوتلیال عـروق ماننـد فـاکتور فون‌ویلبراند و گیرنده‌ی VEGF مـی‌باشـند. بنـابراین در گردش خون محیطی افراد بـزرگ‌سـال، EPCهـایی کـه بالغ شده‌اند فاقـدCD133 و CD34 و دارای VEGFR2 می‌باشند. EPCها می‌توانند در محل‌هایی کـه انـدوتلیوم آسیب‌دیده باعث ترمیم محل آسـیب شـوند. بـه عـلاوه EPCها در فرایند ایسکمی با القای آنژیـوژنز در دوبـاره ساخته شدن رگ‌های خونی تأثیر دارند.

تحقیق حاضر برای بررسی اثر عصاره‌ی پوست انار حاوی دلفینیدین بر روی تشکیل پـلاک آترواسـکلروز ایجاد شده توسـط رژیـم غـذایی بـا کلسـترول بـالا و افزایش EPC در خرگوش‌ها بود.

روش‌ها

آماده‌سازی عصاره‌ی غنی آنتوسیانین انار:

سه گرم پوست انار خشک شـده (خریـداری شـده از

www.mui.ac.ir

مرکز تحقیقات کشاورزی اصفهان، ایران) پودر شد و با ۱۵ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد حاوی ۱ درصد اسید استیک در دمای اتاق برای ۲۴ ساعت عصاره گیری شد (۱۴). عصاره‌ی حاصل صاف شد و حلال آن توسط تقطیر در خلأ جدا گردید. عصاره‌ی استخراج شده در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد (۱۵).

تعیین غلظت کلی فنلی:

غلظت ترکیبات فنلی در عصاره‌ها طبق روش Jayaprakasha (۱۴) تعیین و نتایج به صورت معادل‌های اسید تانیک بیان شد. عصاره‌های پوست انار در آب حل گردید. نمونه‌ها ۰/۲ میلی‌لیتر با ۱ میلی‌لیتر شناساگر Folin-Ciocalteu که ۱۰ بار رقیق شده بود و ۰/۸ میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات ۷/۵ درصد مخلوط گردید. این مخلوط برای ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و خاصیت جذب آن در ۷۶۵ نانومتر توسط یک اسپکتروفتومتر UV-Visible اندازه‌گیری گردید. این آزمایش سه مرتبه انجام گرفت و نتایج به صورت میانگین بیان شد (۱۴).

ایجاد مدل حیوانی:

برای بررسی اثر عصاره ی سرشار از آنتی اکسیدان پوست انار بر روی ایجاد آسیب آترواسکلروز، ۳۰ خرگوش مذکر سفید نیوزلندی به وزن ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ گرم از مؤسسه ی پاستور در تهران خریداری شد. این حیوانات در قفس های استاندارد در اتاق تهویه شده تحت یک چرخه‌ی ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی با دسترسی به آب و غذا نگهداری شدند. آن‌ها در طول دو هفته به این شرایط عادت کردند و دسترسی بدون محدودیت به غذا (غذای استاندارد خرگوش) داشتند.

سپس آن ها به طور تصادفی به سه گروه آزمایشی رژیم پر کلسترول (گروه High cholesterol یا HC) با غذای دارای ۱ درصد کلسترول، رژیم عصاره‌ی پوست انار (گروه POM) با همان غذای گروه HC به علاوه‌ی آنتوسیانین‌های پوست انار در آب آشامیدنی ۰/۱ درصد و گروه شاهد با رژیم معمولی تقسیم شدند. برای ۸ هفته خرگوش‌ها در این رژیم‌ها نگهداری شدند. نمونه‌ی خون خرگوش‌ها پس از دوره‌ی تطابق (قبل از مطالعه) و در هفته‌ی ۸ مطالعه پس از ۱۲ ساعت بی‌غذایی گرفته شد. نمونه‌های خون جمع‌آوری شده سانتریفیوژ گردید (با گرانویتی ۱۰۰۰۰) و نمونه‌های سرم تا زمان استفاده برای اندازه‌گیری در ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از اتمام هفته‌ی هشتم، خرگوش‌ها بعد از بیهوشی کامل با تزریق کلروفرم در رگ گوشی آسان‌کشی شدند. آئورت‌های شکمی به دقت خارج شدند و به دقت از بافت نرم چسبنده پاک‌سازی و به لوله‌های حاوی فرمالین ۱۰ درصد منتقل شدند.

اندازه‌گیری لیپید و لیپوپروتئین‌ها:

سطوح کلی کلسترول (Total cholesterol یا TC)، تری‌گلیسرید (TG)، LDL-C و لیپوپروتئین با چگالی بالا (High density Lipoprotein cholesterol یا HDL-C) در سرم توسط روش آنزیمی سنجیده شدند (۱).

بررسی پاتولوژی:

آئورت‌های شکمی برای بررسی وجود و میزان رگه های چربی مورد بررسی پاتولوژی قرار گرفتند. پس از بیهوشی و تشریح شکم، آئورت‌ها به طور کامل از قوس آئورتی تا سرخرگ‌های قسمت خارجی تهیگاه جدا و برای ۲۴ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد بافر شده نگهداری شدند. سپس در پارافین بلوک

www.mui.ac.ir

شدند و بـه مقـاطع ۶ میکرومتـری بـرش داده شـدند. میزان تشکیل پلاک پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسـیلین- ائوزین تعیین گردید (۱۶).

رگـه‌هـای چربـی از طریـق میکروسـکوپ نـوری توسط دو پاتولوژیست به صورت دوسوکور بررسی و طبق مقیاس ۴-۰ نمره‌بندی شـدند. درجـه‌ی صـفر بـه عدم وجود آترواسـکلروز در آئـورت، درجـه‌ی ۱ بـه ضخامت آترواسکلروزی کمتر از نصف ضخامت مدیا با چند ماکروفاژ و سلول های فوم ایزوله داخل اینتیمـا، درجه‌ی ۲ به ضخامت اترواسکلروزی کمتـر از نصـف ضخامت مدیا با تجمع لیپید درون سلول‌های ماکروفاژ و سلول‌های ماهیچه‌ی صاف، درجه‌ی ۳ بـه ضـخامت آترواسکلروزی به اندازه ی ضخامت مدیا با انبـوهی از ماکروفاژها و سلول های ماهیچه ی صاف با تجمع لیپید درون سلولی و درجه‌ی ۴ به ضخامت آترواسـکلروزی بیشتر از ضخامت مدیا با هسـته‌ی لیپیـد درون پـرده‌ی خارج سلولی بزرگ تعلق گرفت (۱۶).

اندازه‌گیری EPCs:

برای ارزیابی اثر عصاره‌ی غنی از آنتی‌اکسـیدان پوسـت انـار، سـطوح EPCs توسـط فلوسـیتومتری در هفتـه‌ی هشتم انـدازه‌گیـری شـد (۱۷). خـون خرگـوش‌هـا در لوله های حاوی EDTA جمع‌آوری گردیـد و بـرای ۱۰ دقیقه با FCR-blocking (Miltenyibiotec,Germany) انکوبه شد تا مکان‌های پیوندی غیر اختصاصـی اشـباع شـوند. سـپس ۵ میکرولیتـر از نمونـه‌ی فـوق بـا ۴ میکرولیتر آنتی‌بادی KDR (Ebioscience, USA) و ۵ میکرولیتر آنتـی‌بـادی CD34 (Ebioscience, USA) و ۵ میکرولیتر آنتـی‌بـادی CD45 (Ebioscience, USA) انکوبـه گردیـد. آنتـی‌بـادی‌هـای کنژوگـه بـا FITC (Fluorescein isothiocyanate) و Phycoerythrin (PE) با ایزوتایپ یکسان مطابق با آنتی‌بادی‌های فـوق به عنوان کنترل منفی استفاده شدند. گلبول هـای قرمـز (Red blood cell یا RBC) قبل از فلوسـایتومتری لیـز شدند و پس از آن رنگ‌آمیزی و شسته شدند.

جداسـازی اولیـه بـر مبنـای پراکنـدگی جلـویی و کنـاری (Forward & side scatter) سـلول‌هـا انجـام گردید. پس از جدا کردن جمعیت لنفوسیتی بـا تعیـین تعـداد سـلول‌هـای CD34+/VEGFR2+ تعـداد سـلول‌هـای پـیش‌سـاز انـدوتلیال تعیـین شـد. آنـالیز فلوسیتومتری از طریق یک فلوسیتومتر FACScalibur و نیز نرم‌افزار CellQuest FACs انجام گردید (۱۸).

آنالیز آماری:

نـرم‌افـزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) بـرای انجام آنالیز آماری به کار رفت. همه‌ی اندازه‌گیری‌ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد نشـان داده شـد. پس از بررسی نرمال بودن توزیع و یکنواختی واریـانس داده‌ها از آزمون Repeated measures ANOVA بـرای سنجش تغییرات درون گـروه و از One way ANOVA به همراه آزمون Bonferronis برای ارزیابی معنی داری هر نوع تغییری بین گروه‌ها استفاده گردید. معنـی‌داری آماری در سطح $P < ۰/۰۵$ پذیرفته شد.

یافته‌ها

محتوای فنلـی عصـاره‌ی پوسـت انـار ۵/۲۵ ± ۹۰/۱۴ میلی‌گرم بر گرم EtOH بود کـه نشـان مـی‌دهـد ایـن عصاره غنی از پلی‌فنل‌هـا مـی‌باشـد. پتانسـیل پـالایش رادیکال عصاره‌ی پوست انار در غلظت هـای مختلـف نشـان‌دهنـده‌ی خاصـیت آنتـی‌اکسـیدانی بـالقوه بـود. عصاره‌ی پوست انـار ۵۰ درصـد رادیکـال آزاد تولیـد شده توسط DPPH را در غلظـت ۶۴/۹۳۱ میکروگـرم

www.mui.ac.ir

در میلی‌لیتر پالایش نمود.

رژیم غذایی با کلسترول بالا به طور معنی‌داری سطوح سرمی TG و TC و نیز نسبت LDL-C/HDL-C را در مقایسه با گروه شاهد افزایش داد (جدول ۱). مصرف آنتی‌اکسیدان‌های پوست انار تأثیر معنی‌داری بر میزان لیپیدهای سرم نداشت. در پایان مطالعه وزن حیوانات به ترتیب در گروه‌های POM، HC و شاهد ۸۵ ± ۲۰۸۶، ۱۰۲ ± ۲۱۴۲ و ۵۴ ± ۱۹۷۵ گرم بود. در ماه اول تحقیق تفاوت چشمگیری در وزن بین گروه ها نبود، ولی در ماه دوم وزن گروه HC و POM به طور قابل توجهی در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت.

در پایان تحقیق هیچ پلاک آترواسکلروزی در آئورت خرگوش هایی که رژیم طبیعی داشتند، دیده نشد؛ ولی پلاک های آترواسکلروزی با درجه های متفاوتی در آئورت خرگوش‌های گروه HC و POM قابل مشاهده بود (شکل ۱).

تفاوت در اندازه‌ی پلاک بین گروه‌های HC و POM با گروه شاهد معنی‌دار بود (به ترتیب P = ۰/۰۳ و P = ۰/۰۲). میزان تشکیل پلاک نیز در گروه HC نسبت به گروه POM بیشتر بود (P = ۰/۰۳). آئورت گروه HC دارای پلاک‌های کلسیفیه بود که در گروه POM مشاهده نشد.

مکمل عصاره‌ی آنتی‌اکسیدان پوست انار به طور معنی‌داری تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال را افزایش داد. تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال در هر میلی لیتر خون گروه POM ۱/۶ ± ۹/۹۵ بود، در حالی که این تعداد در گروه HC ۲/۲ ± ۳/۶ و در گروه شاهد ۰/۶ ± ۲/۰۱ بود.

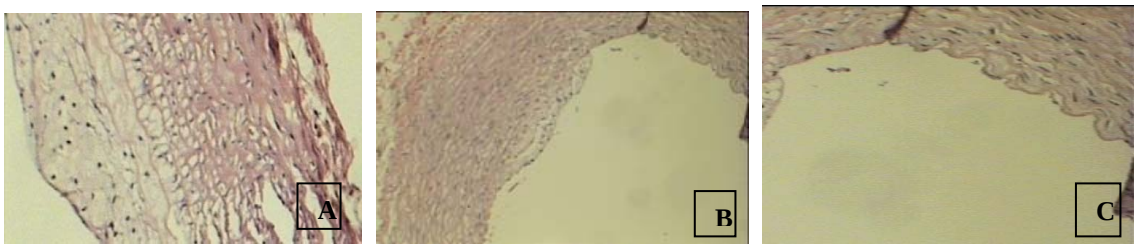
جدول ۱. سطوح لیپیدهای سرم و لیپوپروتئین‌ها در سه گروه مطالعه شده در سه دوره نمونه‌گیری مختلف

متغیر	زمان	گروه شاهد	گروه POM	گروه HC
کلسترول (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	قبل از مداخله	۶۸/۶۵ ± ۱۲/۱	۶۴/۱۳ ± ۱۵/۴	۷۰/۶۵ ± ۲۰/۱
	هفته‌ی چهارم	۶۶/۳۸ ± ۱۱/۸	۱۶۸۳/۴۰ ± ۳۶۱/۳*	۱۵۱۸/۹۳ ± ۳۶۰/۴*
	هفته‌ی هشتم	۶۹/۷ ± ۱۰/۵	۱۹۲۴/۶۸ ± ۲۲۷/۸*	۱۹۲۰/۰۰ ± ۲۲۴*
تری‌گلیسرید (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	قبل از مداخله	۸۰/۳۱ ± ۲/۷	۷۲/۱۹ ± ۱۳/۹	۸۲/۶۱ ± ۲/۳
	هفته‌ی چهارم	۸۱/۸۹ ± ۴/۳	۲۱۲/۴ ± ۵۰/۶*	۱۹۱/۱۲ ± ۶۹*
	هفته‌ی هشتم	۱۳/۲	۳۰۱/۰۲ ± ۳۱/۶*	۲۶۱/۳۵ ± ۸۲/۲*
LDL (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	قبل از مداخله	۳۳/۵ ± ۸/۹	۴۴/۰۱ ± ۱۰/۸	۳۵/۵ ± ۹/۴
	هفته‌ی چهارم	۴۲/۷۶ ± ۱۰/۷	۸۵۸/۹۹ ± ۱۷۹/۳*	۸۸۱/۶۶ ± ۱۱۸/۲*
	هفته‌ی هشتم	۳۴/۶ ± ۱۱/۴	۸۹۵/۰۹ ± ۱۲۳/۷*	۹۹۴/۲۲ ± ۱۲۲/۵*
HDL (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	قبل از مداخله	۲۳/۴ ± ۱/۹	۲۵/۵ ± ۵/۳	۲۱ ± ۲/۴
	هفته‌ی چهارم	۲۵/۳ ± ۱۱/۴	۵۹/۱ ± ۲۱/۶*	۷۳/۶ ± ۱۲/۱*
	هفته‌ی هشتم	۲۴/۷ ± ۷/۲	۹۴/۰ ± ۸/۴*	۹۰ ± ۱۱/۲*

*: تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد (P < ۰/۰۵)

POM: Pomegranate. HC: High cholesterol LDL: Low density Lipoprotein HDL: High density Lipoprotein

www.mui.ac.ir



شکل ۱. پلاک‌های آترواسکلروزی در مقاطعی از آئورت که با هماتوکسین و ائوزین رنگ‌آمیزی شده‌اند.

شکل A: نمونه‌ای از آئورت طبیعی در خرگوش‌های گروه شاهد، شکل B: تأثیرات مصرف عصاره‌ی پوست انار بر تشکیل پلاک‌های آترواسکلروز در خرگوش‌هایی که با رژیم پر کلسترول تغذیه شده بودند (پلاک درجه‌ی ۱) و شکل C: تشکیل پلاک‌های آترواسکلروز در خرگوش‌هایی که با رژیم پر کلسترول به تنهایی تغذیه شده بودند (پلاک درجه‌ی ۳).

آنالیز آماری نشان داد که سلول‌های +CD34 و +KDR به طور قابل توجهی در گروه POM نسبت به گروه‌های HC و شاهد بیشتر بود. حیوانات گروه HC و شاهد سطوح یکسانی از سلول‌های در حال گردش +CD34 و +KDR را داشتند.

بحث

این مطالعه اولین تحقیقی بود که نشان داد، آنتی‌اکسیدان‌های موجود در پوست انار به طور مؤثری تعداد EPC های در حال گردش را افزایش می دهند و باعث کاهش تشکیل پلاک می شوند. نتیجه ی اصلی این تحقیق این بود که خرگوش هایی که با رژیم با کلسترول زیاد (۱ گرم در ۱۰۰ گرم)، دوزهای پایین عصاره‌ی پوست انار (۱۰۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم) مصرف کردند، به طور قابل توجهی در مقایسه با خرگوش‌هایی که فقط رژیم کلسترول بالای ۱ درصد داشتند، وسعت پلاک آترواسکلروزی آئورتی کمتری داشتند.

در مراحل اولیه ی آترواسکلروزی انباشتگی لیپید و تشکیل سلول فوم باعث صدمه به سلول اندوتلیال می‌شود و آسیب آترواسکلروزی ایجاد می کند (۲۰-۱۹). به خوبی ثابت شده است که ترکیبات فنلی با ویژگی آنتی اکسیدانی خود به طور قابل توجهی فشار اکسید کننده را از طریق بازداری تشکیل OX-LDL و پراکسیداسیون لیپید ماکروفاژها کاهش می‌دهند. مطالعات اپیدمیولوژی نشان داده است که مصرف منظم آب انار می‌تواند خطر سکته ی قلبی و سرطان را کاهش دهد (۲۰، ۱۰).

تحقیقات قبلی نشان داده است که آب انار می تواند تشکیل آترواسکلروز را هم در موش فاقد APOE و هم در انسان باز دارد (۸، ۲).

همان گونه که اشاره شد پلی‌فنل‌های پوست انار می توانند به مقاومت LDL در برابر اکسیداسیون منجر شوند که نتیجه ی آن کاهش آسیب آترواسکلروزی می‌باشد. با این وجود، مکانیزم اثر حفاظتی انار به طور کامل روشن نشده است.

تعدادی تحقیقات در حیوانات نشان داده است که مصرف عصاره‌ی فنلی سطوح سرم کلی LDL-C، TC و TG را پایین می‌آورد و غلظت HDL-C پلاسما را افزایش می دهد (۲۲-۲۱). با این حال در تحقیق حاضر غلظت های لیپید سرم در میان گروه های رژیم HC و POM تغییری نکرد.

یکی از اهداف دیگر این تحقیق، بررسی تأثیرات مفید بالقوه‌ی ترکیبات فنلی پوست انار روی EPCها بود. تولید و ساخت مجدد اندوتلیال باعث افزایش

www.mui.ac.ir

ترمیم رگ‌های آسیب دیده‌ی درون بدن می‌شود (۷). مطالعات بالینی اخیر نشان می دهد که عوامل خطر آترواسکلروز با سطوح پایین تر سلول های پیش ساز در حال گردش مرتبط هستند و این سطوح می‌توانند برای پیش‌بینی وقوع مشکلات قلبی عروقی و مرگ به کار روند (۲۴-۲۳، ۱۷).

در تحقیق حاضر تفاوت چندانی در تعداد سلول های پیش ساز اندوتلیالی در حال گردش بین گروه‌های HC و شاهد وجود نداشت.

مطالعه ای نشان داد که رژیم پر کلسترول تعداد EPC را در مرحله‌ی استراحت افزایش می‌دهد و باعث کاهش سطوح EPC در مرحله‌ی تکثیر می‌شود (۱۸).

نشان داده شده است که هیپرکلسترولمی می‌تواند باعث افزایش تحرک و بسیج ماکروفاژها به پلاک آترواسکلروز و افزایش تعداد پلاکت‌ها و لنفوسیت‌ها در خون محیطی شود (۲۶-۲۵)؛ هر چند مکانیسم دقیق اثر کلسترول بر مغز استخوان و بسیج سلول ها معلوم نیست (۲۷).

مطالعه‌ی مشابهی با مقاله‌ی حاضر نشان داده است که در مدل حیوانی موش نیز رژیم پر کلسترول بر افزایش تعداد EPC مؤثر نبوده است (۲۷).

در تحقیق ما یک افزایش قابل توجه در تعداد EPC در گروه POM نسبت به دو گروه شاهد و HC وجود داشت. تحقیق ما مدارک جدیدی در مورد تأثیر مثبت یک ترکیب آنتی‌اکسیدان در افزایش تعداد EPCها ارائه نمود. به طور بالقوه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی POM می‌تواند به عنوان رویکردی پر امید در درمان بیماری های مرتبط با اختلالات رگ‌های خونی ظهور کند.

در پایان اطلاعات این تحقیق نشان داد که مصرف خوراکی عصاره‌ی پوست انار می‌تواند تأثیرات مفید بازدارنده ای در برابر آترواسکلروز در خرگوش های پر کلسترول شاید از طریق بازسازی اندوتلیوم رگ ها توسط افزایش تعداد EPCها داشته باشد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که هزینه‌ی این طرح پژوهشی به شماره‌ی ۲۸۸۰۸۳ را تقبل نمود. این طرح در قالب طرح تحقیقاتی در مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد.

References

1. Javanmard SH, Nematbakhsh M, Sanei MH. Early prevention by L-Arginine attenuates coronary atherosclerosis in a model of hypercholesterolemic animals; no positive results for treatment. Nutr Metab (Lond) 2009; 6: 13.
2. Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. Am J Clin Nutr 2000; 71(5): 1062-76.
3. Li C, Cantor WJ, Nili N, Robinson R, Fenkell L, Tran YL, et al. Arterial repair after stenting and the effects of GM6001, a matrix metalloproteinase inhibitor. J Am Coll Cardiol 2002; 39(11): 1852-8.
4. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, et al. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. Circulation 1995; 91(9): 2488-96.
5. de Nigris F, Williams-Ignarro S, Lerman LO, Crimi E, Botti C, Mansueto G, et al. Beneficial effects of pomegranate juice on oxidation-sensitive genes and endothelial nitric oxide synthase activity at sites of perturbed shear stress. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102(13): 4896-901.
6. Reaven PD, Khouw A, Beltz WF, Parthasarathy S, Witztum JL. Effect of dietary antioxidant combinations in humans. Protection of LDL by vitamin E but not by beta-carotene. Arterioscler

www.mui.ac.ir

Thromb 1993; 13(4): 590-600.
7. Fiorito C, Rienzo M, Crimi E, Rossiello R, Balestrieri ML, Casamassimi A, et al. Antioxidants increase number of progenitor endothelial cells through multiple gene expression pathways. Free Radic Res 2008; 42(8): 754-62.
8. Aviram M, Dornfeld L. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. Atherosclerosis 2001; 158(1): 195-8.
9. Rasheed Z, Akhtar N, Anbazhagan AN, Ramamurthy S, Shukla M, Haqqi TM. Polyphenol-rich pomegranate fruit extract (POMx) suppresses PMACI-induced expression of pro-inflammatory cytokines by inhibiting the activation of MAP Kinases and NF-kappaB in human KU812 cells. J Inflamm (Lond) 2009; 6: 1.
10. Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, et al. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. J Nutr Biochem 2005; 16(6): 360-7.
11. Guo C, Yang J, Wei J, Li Y, Xu J, Jiang Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. Nutr Res 2003; 23(12): 1719-26.
12. Lamy S, Blanchette M, Michaud-Levesque J, Lafleur R, Durocher Y, Moghrabi A, et al. Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation. Carcinogenesis 2006; 27(5): 989-96.
13. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23(7): 1185-9.
14. Singh RP, Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (Punica granatum) peel and seed extracts using in vitro models. J Agric Food Chem 2002; 50(1): 81-6.
15. Shyamala gowri S, Vasantha K. Free radical scavenging and antioxidant activity of leaves from agathi (*Sesbania grandiflora*) (L.) pers. Am-Euras J Sci Res 2010; 5(2): 114-9.
16. Asqary S, Jafari Dinani N, Madani H, Mahzoni H, Naderi G. Effect of Glycyrrhiza glabra extract on aorta wall atherosclerotic lesion in hypercholesterolemic rabbits. Pakistan J Nutr 2007; 6(4): 313-7.
17. Javanmard SH, Gheisari Y, Soleimani M, Nematbakhsh M, Monajemi A. Effect of L-arginine on circulating endothelial progenitor cells in hypercholesterolemic rabbits. Int J Cardiol 2010; 143(2): 213-6.
18. Fadini GP, Sartore S, Albiero M, Baesso I, Murphy E, Menegolo M, et al. Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006; 26(9): 2140-6.
19. Aviram M. Interaction of oxidized low density lipoprotein with macrophages in atherosclerosis, and the antiatherogenicity of antioxidants. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996; 34(8): 599-608.
20. Xia X, Ling W, Ma J, Xia M, Hou M, Wang Q, et al. An anthocyanin-rich extract from black rice enhances atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E-deficient mice. J Nutr 2006; 136(8): 2220-5.
21. Chen CC, Hsu JD, Wang SF, Chiang HC, Yang MY, Kao ES, et al. Hibiscus sabdariffa extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. J Agric Food Chem 2003; 51(18): 5472-7.
22. Purushothama S, Raina PL, Hariharan K. Effect of long term feeding of rice bran oil upon lipids and lipoproteins in rats. Mol Cell Biochem 1995; 146(1): 63-9.
23. Nematbakhsh M, Haghjooyjavanmard S, Mahmoodi F, Monajemi AR. The prevention of endothelial dysfunction through endothelial cell apoptosis inhibition in a hypercholesterolemic rabbit model: the effect of L-arginine supplementation. Lipids Health Dis 2008; 7: 27.
24. Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kämper U, et al. Low circulating endothelial progenitor cell counts predict cardiovascular events. Circulation 2005; 111(22): 2981-7.
25. Namiki M, Kawashima S, Yamashita T, Ozaki M, Hirase T, Ishida T, et al. Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion: synergism with hypercholesterolemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002; 22(1): 115-20.
26. Han KH, Han KO, Green SR, Quehenberger O. Expression of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is increased in hypercholesterolemia. Differential effects of plasma lipoproteins on monocyte function. J Lipid Res 1999; 40(6): 1053-63.
27. Gomes AL, Carvalho T, Serpa J, Torre C, Dias S. Hypercholesterolemia promotes bone marrow cell mobilization by perturbing the SDF-1:CXCR4 axis. Blood 2010; 115(19): 3886-94.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol. 30, No. 194, 4th week, August 2012 Received: 13.3.2012 Accepted: 9.6.2012

Pomegranate Peel Extract Supplementation Increases the Number of Endothelial Progenitor Cells and Attenuates the Development of Atherosclerosis Plaque

Moloud Ahmadi MSc[1], Nafise Nili PhD[2], Shaghayegh Haghjooy Javanmard MD, PhD[3], Hajar Naji[4], Ebrahim Sayed Tabatabaei PhD[2]

Abstract

Background: Inhibition of endothelial dysfunction and denudation contributes to the attenuation of atherosclerosis. Numerous studies have suggested that nutritional antioxidants can contribute to the reduction of atherosclerotic lesions. The goals of the present study were to investigate the beneficial effects of pomegranate peel extract in rabbits fed on a high cholesterol diet and to analyze the anti-atherosclerotic activity of the extract.

Methods: Endothelial progenitor cell (EPC) numbers and atherosclerotic lesion size were determined in rabbits fed on normal diet (control group), high cholesterol diet (HC group), and high cholesterol diet with pomegranate peel antioxidant extract (0.1% in drinking water) (POM or pomegranate group).

Findings: Pomegranate peel antioxidant-extract supplementation significantly increased EPC numbers (9.95 ± 1.60 in POM group vs. 3.60 ± 2.20 in HC group and 2.01 ± 0.60 in control group; $P < 0.05$) and inhibited the progression of atherosclerotic lesion formation in aorta of rabbits ($P < 0.05$).

Conclusion: Our results suggested that the beneficial effects of pomegranate peel antioxidant extract in prevention of atherosclerosis may be due to the modulation of EPC numbers and potentiation of the endothelial regeneration.

Keywords: Atherosclerosis, Pomegranate, Antioxidant, Anthocyanin, Endothelial progenitor cells.

[1] Department of Biotechnology, School of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
[2] Assistant Professor, Department of Animal Sciences, School of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
[3] Assistant Professor, Department of Physiology, Physiology Research Center, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[4]. MSc Student, Department of Physiology, Physiology Research Center, School of Medicine And Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
Corresponding Author: Shaghayegh Haghjooy Javanmard MD, PhD, Email: sh_haghjoo@med.mui.ac.ir