

## بررسی تأثیر عصاره متانولی ۴ بخش مختلف گیاه غافت (*Agrimonia eupatoria*) بر روی رشد و تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان و ۱۲ نوع باکتری بیماری‌زا

مطهره مسجدی<sup>۱</sup>، مهرناز کیهان‌فر<sup>۲\*</sup>، ماندانا بهبهانی<sup>۳</sup>

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست فناوری، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
  - ۲- دانشیار گروه زیست فناوری، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
  - ۳- دانشیار گروه زیست فناوری، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
- \* آدرس مکاتبه: اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، گروه زیست فناوری، کدپستی: ۸۱۷۴۶-۷۳۴۴۱  
تلفن: ۳۷۹۳۴۴۰۲ (۰۳۱)، شماره: ۳۷۹۳۲۳۴۲ (۰۳۱)  
پست الکترونیک: m.keyhanfar@ast.ui.ac.ir

تاریخ تصویب: ۹۵/۵/۲۳

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۲۲

### چکیده

مقدمه: امروزه کاربرد گیاهان دارویی در بهبود عملکرد سیستم ایمنی و همچنین علیه باکتری‌های بیماری‌زا مورد توجه می‌باشد. هدف: در این مطالعه اثر عصاره متانولی بخش‌های هوایی گیاه غافت بر تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) و ۱۲ باکتری بیماری‌زا بررسی شده است.

روش بررسی: در این مطالعه‌ی تجربی عصاره متانولی سرشاخه، ساقه، بذر و برگ گیاه غافت تهیه گردید و اثر این عصاره بر روی سلول‌های خون محیطی در محیط کشت RPMI در غلظت‌های مختلف ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰ به روش رنگ‌سنجی MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین اثر غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ و ۵ و ۷ و ۱۰ همان عصاره بر باکتری‌های بیماری‌زای استافیلوکوک اورئوس، استافیلوکوک ساپروفیتیکوس، استرپتوکوک موتانس، استرپتوکوک سوبریئوس، استرپتوکوک پیوژنز، باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس لیکنی فرمیس، سالمونلا انتریکا، سریشیا مارسنس، اشرشیا کلای، پروتئوس و لگاریس و پروتئوس میرابیلیس به روش دیسک‌گذاری و در محیط کشت نوترینت آگار مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: عصاره‌ی تمام بخش‌های هوایی گیاه غافت دارای اثر تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی می‌باشند و سرشاخه، ساقه و بذر با بیشترین اثر تحریک‌کنندگی موجب افزایش تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی تا میزان ۸ برابر شد. عصاره متانولی گیاه غافت دارای اثر ضدباکتری بر برخی باکتری‌های گرم مثبت بیماری‌زا بوده و بیشترین اثر ضدباکتری بر باکتری باسیلوس سوبتیلیس در غلظت ۴ mg/ml و باکتری استافیلوکوک اورئوس در غلظت ۷ mg/ml بود.

نتیجه‌گیری: گیاه غافت دارای اثر تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی و خاصیت ضدباکتری علیه برخی باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت است که می‌تواند به عنوان گیاه تعدیل‌کننده سیستم ایمنی برای بیماران نقص ایمنی و در کنترل عفونت‌های باکتریایی کاربرد داشته باشد.

کل واژگان: گیاه غافت، تحریک‌کننده سیستم ایمنی، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی، ضدباکتری



## مقدمه

امروزه گیاهان دارویی در طب سنتی کاربرد وسیعی دارند. داروهای سنتزی متنوع که به عنوان عامل‌های تعدیل‌کننده سیستم ایمنی استفاده می‌شوند دارای عوارض جانبی متنوع از قبیل نفروتوکسیسیته، هپاتوتوکسیسیته، سرکوب مغز استخوان و اختلالات گوارشی هستند [۱]. علاوه بر این آنتی‌بیوتیک‌هایی که به طور مرسوم در درمان بیماری‌های عفونی به کار می‌روند دارای مشکلاتی همچون عوارض جانبی ناخواسته و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند. امروزه کاربرد گیاهان دارویی در طب سنتی به منظور کاهش این مشکلات مورد توجه می‌باشد.

گیاه غافث با نام علمی *Agrimonia eupatoria* یکی از جنس‌های خانواده‌ی *Rosaceae* می‌باشد که در افغانستان، آمریکا، اروپا و ایران وجود دارد. این گیاه در ایران در مناطق تالش، آذربایجان، کردستان، مازندران، رشت، خراسان، لرستان، قزوین، اردبیل، شیراز، دشت مغان، تهران و ارومیه یافت می‌شود [۲]. غافث گیاهی است پایا، به ارتفاع ۶۰-۳۰ سانتی‌متر و دارای ساقه‌ی راست و پوشیده از کرک که در جنگل‌ها، نواحی سایه‌دار، چمنزارها و غیره می‌روید و تقریباً در تمام نیمکره شمالی پراکندگی دارد. تمامی قسمت‌های گیاه شامل ریشه، ساقه، بذر، برگ، سرشاخه و گل آن در طب سنتی کاربرد دارد [۳، ۴]. این گیاه دارای ترکیبات ارزشمندی مانند آگرمونین، کاتچین، پروسیانیدین، کوئرستین، لوتنولین، کامفرول و یوگنول است [۵، ۶]. در طب سنتی، قسمت‌های هوایی این گیاه خاصیت مدر و قابض دارد و برای درمان اسهال، کولیت، مشکلات آپاندیس، التهاب مثانه، مار گزیدگی و زگیل کاربرد دارد [۷]. علاوه بر این، این گیاه برای مشکلات کبدی، کلیوی، سنگ‌های صفراوی، ادم، روماتیسم، بواسیر، جلوگیری از خونریزی، زخم‌های واریسی، التهاب گلو، سل ریوی و سل پوستی استفاده می‌شود [۸]. مطالعات محققان نشان داده که این گیاه دارای خواص آنتی‌اکسیدان، ضدالتهاب، ضدویروس، ضدباکتری، ضدچاقی، ضددیابت، ضدسرطان و ضدآلزایمر می‌باشد. همچنین در طب سنتی این گیاه برای ترمیم زخم‌ها و در درمان بیماری‌های مرتبط با کبد، صفرا و

سیستم ایمنی مانند روماتیسم کاربرد دارد [۹، ۸]. در این مطالعه، برای اولین بار اثر عصاره‌ی متانولی ۴ بخش مختلف گیاه غافث بر سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC) و همچنین ۷ باکتری بیماری‌زای گرم مثبت شامل استافیلوکوکوس اوئوس، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، استرپتوکوک موتانس، استرپتوکوک سوبرینوس، استرپتوکوک پیوژنز، باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس لیکنی فرمیس و همچنین ۵ باکتری گرم منفی شامل اشیریشیا کلای، پروتئوس ولگاریس، پروتئوس میرابیلیس، سریشیا مارسنس و سالمونلا اینتریکا مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### تهیه‌ی نمونه‌ی گیاهی و عصاره‌گیری

در این تحقیق اندام‌های هوایی گیاه، توسط کارشناس مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان از مسیر جاده‌ی نظنز به ایبانه در استان اصفهان شناسایی و جداسازی شد و نمونه‌ی هرباریوم از آن تهیه و در دانشکده‌ی علوم دانشگاه اصفهان با کد هرباریوم ۱۹۵۵۵۲ ثبت شد. قسمت‌های سرشاخه، ساقه، بذر و برگ با دست جداسازی و در دمای اتاق در سایه به صورت جداگانه خشک و سپس آسیاب شد. برای استخراج عصاره‌ی گیاهان روش‌های متعددی وجود دارد که روش‌های پرکولاسیون و خیساندن معمول‌تر هستند [۱۰]. در این تحقیق متانول ۹۶ درصد به دلیل قابلیت جدا کردن متابولیت‌های ثانویه‌ی با ارزش از جمله فلاونوئیدها که به میزان زیادی در گیاه مورد مطالعه وجود دارد به عنوان حلال جهت عصاره‌گیری و به روش خیساندن مورد استفاده قرار گرفت [۱۱، ۵]. به این منظور ۲۰ گرم از هر یک از پودرهای آسیاب شده در ۲۰۰ میلی‌لیتر متانول ۹۶ درصد بر روی شیکر با دور ۳۰ و دمای ۲۵ درجه به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفت. عصاره‌ی به دست آمده با استفاده از کاغذ صافی صاف شد. تفاله‌های حاصل دوبار دیگر عصاره‌گیری شد و عصاره‌ی حاصل از آن توسط دستگاه روتاری تغلیظ و نهایتاً در ظروف شیشه‌ای و در فضای باز خشک شد. وزن خشک عصاره‌ها اندازه‌گیری شد و در



الایزا، میزان جذب آن اندازه‌گیری می‌شود [۱۲].  
 برای انجام این روش پس از اثر دادن عصاره بر روی لئوسیت و پس از گرماگذاری،  $100 \mu\text{l}$  محلول سوپرناات رویی حذف شد. سپس  $20 \mu\text{l}$  محلول MTT (با غلظت  $5 \mu\text{g/ml}$ ) به عنوان سوستر به ول‌ها افزوده و برای فرصت دادن به عمل آنزیم، به مدت ۴ ساعت گرماگذاری انجام شد. سپس به منظور حل کردن کریستال‌های فورمازان، محلول  $0.4 \times 100$  مولار اسید کلریدریک در  $2$ - پروپانول به اضافه‌ی تریتون  $100 \times$  اضافه شد. در نهایت جذب محلول با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در طول موج  $570 \text{ nm}$  خوانده شد. در این آزمایش از DMSO به عنوان شاهد استفاده شد. آزمایش برای هر غلظت با سه بار تکرار انجام و درصد بقاء سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$100 \times \text{جذب کنترل منفی} / \text{جذب چاهک} = \text{درصد بقا}$

**سویه‌های باکتری مورد آزمایش و نحوه‌ی تهیه‌ی محیط کشت**  
 سویه‌های باکتری که در این مطالعه استفاده شد شامل ۷ باکتری بیماری‌زای گرم مثبت استافیلوکوکوس اوئوس، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، استرپتوکوک موتانس، استرپتوکوک سوبرینوس، استرپتوکوک پیورنز، باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس لیکنی فرمیس و همچنین ۵ باکتری گرم منفی اشریشیاکالی، پروتئوس و لگاریس، پروتئوس میرابیلیس، سراثیا مارسنس و سالمونلا ایتریکا بود که همه‌ی باکتری‌ها در محیط کشت نوترینت آگار و در دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند.

**بررسی اثر ضدباکتری عصاره‌ی متانولی به روش دیسک‌گذاری**  
 برای هر باکتری کدورت نیم مک فورلند با استفاده از PBS تهیه شد و به روش چمنی بر روی پلیت‌های حاوی نوترینت آگار کشت داده شد. سپس دیسک‌های استریل  $6 \text{ mm}$  به عصاره‌های گیاهی آغشته شد و به آرامی بر روی پلیت‌های حاوی باکتری گذاشته شد. از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک حاوی  $10 \mu\text{g}$  آمپی‌سیلین از شرکت پادتن طب به عنوان شاهد برای همه‌ی باکتری‌ها استفاده شد. سپس تمامی پلیت‌ها در انکوباتور  $37^\circ\text{C}$  درجه به مدت یک شبانه روز گرماگذاری شدند. در نهایت هاله‌ی عدم رشد باکتری با استفاده از خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد (شکل شماره ۱).

نهایت تمامی عصاره‌های خشک شده تا قبل از مصرف در ظروف پلاستیکی درب‌دار در یخچال نگهداری شدند.

$50$  میلی‌گرم عصاره‌ی خشک توسط ترازو وزن و در  $500 \mu\text{l}$  DMSO با استفاده از ورتکس حل شد. سپس با محاسبه غلظت‌های نهایی  $50$ ،  $100$ ،  $500$ ،  $1000$ ،  $1500$ ،  $2000$  و  $2500$  از هر عصاره در زیر هود لامینار فلو و در شرایط کاملاً استریل، با استفاده از بافر PBS رقیق شد و به مقدار لازم به پلیت‌های ۹۶ چاهکی حاوی لئوسیت‌های انسانی، اضافه شد.

### تهیه و کشت سلول‌های لئوسیت انسانی

مقدار  $10$  میلی‌لیتر خون از فرد سالم گرفته و در فالتون هپارینه  $15$  میلی‌لیتر جمع‌آوری شد.  $2/5$  میلی‌لیتر لئوسیت در مارک SIGMA در یک فالتون ریخته و  $5$  میلی‌لیتر از خون به آرامی بر روی آن ریخته شد و به مدت  $20$  دقیقه در سانتریفوژ  $308 \times \text{g}$  قرار داده شد. پس از سانتریفوژ مایع سفید میانی حاوی لئوسیت جداسازی و در پلیت ۶ چاهکی ریخته شد و در محیط کشت RPMI از شرکت GIBCO کشت داده شد. محیط حاوی  $15$  درصد سرم جنین گاوی و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین ( $100 \text{ U/ml}$ ) و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین ( $100 \text{ mg/ml}$ ) و گلوتامین ( $2 \text{ mM}$ ) بود. سپس غلظت‌های تهیه شده از هر عصاره به محیط کشت اضافه شد و پلیت‌های حاوی لئوسیت‌ها و عصاره در انکوباتور  $37^\circ\text{C}$  درجه حاوی  $5$  درصد دی‌اکسیدکربن به مدت  $48$  ساعت گرماگذاری شد.

### بررسی اثر عصاره‌ی متانولی بر لئوسیت به روش سنجش MTT

برای بررسی اثر عصاره بر روی رشد و تکثیر لئوسیت از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد. اساس این تست بر پایه‌ی قدرت احیاکنندگی آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی استوار است. سلول‌های زنده، حاوی میتوکندری بیشتر و در نتیجه دارای قدرت احیاکنندگی بیشتر هستند. این آنزیم، کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم با فرمول شیمیایی MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) را به کریستال‌های ارغوانی رنگ فورمازان احیا می‌کند که با روش رنگ‌سنجی





شکل شماره ۱- هالی عدم رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*)

۱ mg/ml = ۱ و ۲ mg/ml = ۲ و ۳ mg/ml = ۳ و ۴ mg/ml = ۴ و ۵ mg/ml = ۵ و ۶ mg/ml = ۶ و ۷ mg/ml = ۷ و ۸ mg/ml = ۸ و ۹ mg/ml = ۹ و شاهد = آمپی سیلین ۱۰ µg/disc

## نتایج

### نتایج عصاره‌گیری

بازده متوسط تولید عصاره بر حسب وزن عصاره خشک در ۱۰۰ گرم گیاه خشک تعیین و حدود ۱۳ درصد محاسبه شد.

### نتایج اثر تحریک‌کنندگی عصاره‌ی متانولی غافت بر تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی

نتایج حاصل نشان داد که عصاره تمامی قسمت‌های هوایی گیاه غافت، شامل سرشاخه، ساقه، بذر و برگ آن به روش وابسته به دوز قادر به تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی و افزایش میزان درصد بقای سلول‌ها هستند. در این میان سرشاخه، ساقه و بذر به صورت وابسته به دوز تا غلظت ۲۵۰۰ µg/ml دارای بیشترین اثر تحریک‌کنندگی تا میزان ۸ برابر بوده و برگ تا غلظت ۱۵۰۰ µg/ml به صورت وابسته به دوز موجب افزایش ۴ الی ۵ برابری تکثیر لنفوسیت‌ها شد. نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی

سرشاخه، ساقه، بذر و برگ گیاه غافت بر باکتری‌های بیماری‌زا در جدول شماره ۱ نتایج حاصل از اثر عصاره‌ی متانولی قسمت‌های مختلف گیاه غافت بر باکتری‌های بیماری‌زا نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌کنید عصاره‌ی متانولی غافت اثر ضدباکتری بر هیچ یک از باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی شامل اشرشیاکلا، سالمونلا انتریکا، سراشیا مارسنس، پروتئوس ولگاریس و پروتئوس میرابیلیس و دو باکتری گرم مثبت شامل استافیلوکوک ساپروفیتیکوس و باسیلوس لیکنی فرمیس نداشت. عصاره‌ی متانولی تمامی نمونه‌ها در غلظت ۱۰ mg/ml دارای اثر ضدباکتری بر استرپتوکوک موتانس و عصاره سرشاخه و برگ در غلظت ۱۰ mg/ml دارای اثر ضدباکتری بر استرپتوکوک سوپرینوس و استرپتوکوک پیورنز بود. سرشاخه در غلظت ۷ mg/ml و برگ در غلظت ۱۰ mg/ml اثر ضدباکتری علیه استافیلوکوک اورئوس داشت. سرشاخه با حداقل غلظت مهار کنندگی معادل ۴ mg/ml دارای اثر ضدباکتری بر باکتری باسیلوس سوبتیلیس بود.



جدول شماره ۱- اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی متانولی سرشاخه، برگ، بذر و ساقه‌ی گیاه غاغت بر باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت و گرم منفی  
میزان قطر هاله عدم رشد باکتری بر حسب میلی‌متر (mm)

غلظت ساقه (mg/ml)		غلظت بذر (mg/ml)		غلظت برگ (mg/ml)		غلظت سرشاخه (mg/ml)		نمونه	باکتری															
۱۰	۷	۵	۴	۲	۱	۱۰	۷	۵	۴	۲	۱	۱۰	۷	۵	۴	۲	۱	۱۰	۷	۵	۴	۲	۱	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۸	-	-	-	-	-	۹	۸	-	-	-	-	S.aureus(G+)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S.saprophyticus(G+)	
۹	-	-	-	-	-	۹	-	-	-	-	-	۹	-	-	-	-	۹	-	-	-	-	-	S.mutans(G+)	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۸	-	-	-	-	۸	-	-	-	-	-	S.sobrinus(G+)	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۸	-	-	-	-	۹	-	-	-	-	-	S.pyogenes(G+)	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۱۱	۱۱	۱۱	۷	-	-	B.subtilis(G+)	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B.licheniformis(G+)	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E.coli(G-)	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S.enterica(G-)	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S.marcescens(G-)	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P.vulgaris(G-)	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P.mirabilis(G-)	

قطر دیسک: ۶ mm - شاهد: آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، بیشترین اثر ضدباکتریایی بر باکتری استافیلوکوک اورنوس و باکتری باسیلوس سوبتیلیس مشاهده می‌شود. سرشاخه و برگ گیاه بیشترین اثر ضدباکتری را نشان می‌دهند.

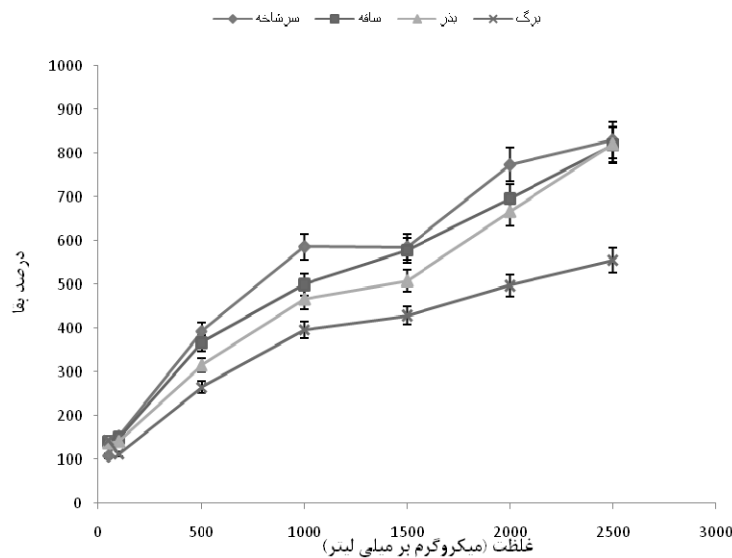
## بحث

۹/۱۰-۳/۶ mg/g تانن است [۵]. آگریمونین موجود در گیاه غاغت گونه‌ی *Agrimonia pilosa* موجب القای تولید اینترلوکین ۱ (سیتوکین تحریک‌کننده سیستم ایمنی) در PBMC ها می‌شود [۱۴]. همچنین فلاونوئیدهای کوئرستین، کاتچین و لوتئولین موجب افزایش ترشح اینترلوکین ۲ (سیتوکین تحریک‌کننده سیستم ایمنی) در PBMC و ماکروفاژها می‌شوند [۱۵]. علاوه بر آن این تحقیقات مشخص کرد که کامفرول موجود در عصاره‌ی متانولی گیاه *Indigofera aspalathoids* موجب افزایش تولید لنفوسیت T و همچنین افزایش تولید سیتوکین‌های تحریک‌کننده سیستم ایمنی مانند اینترلوکین ۲ می‌شود [۳].

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعات می‌توان نتیجه گرفت که خاصیت تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی در گیاه غاغت به علت وجود متابولیت‌های ثانویه با ارزش همانند آگریمونین، کوئرستین، کاتچین، لوتئولین و کامفرول می‌باشد. همچنین به دلیل اینکه در این تحقیق سرشاخه، ساقه و بذر گیاه دارای بیشترین اثر تحریک‌کنندگی بود. احتمالاً بیشترین میزان متابولیت‌های ثانویه گفته شده در این بخش‌ها وجود دارد.

نتایج به دست آمده از مطالعه عصاره‌ی متانولی گیاه غاغت بر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی مشخص کرد که عصاره‌ی تام تمام بخش‌های هوایی این گیاه موجب تکثیر و افزایش درصد بقای سلول‌ها می‌شود (نمودار شماره ۱). تاکنون تنها یک مطالعه بر روی اثر بخشی گونه‌ی *Agrimonia pilosa* بر سیتوکین‌های سلول‌های PBMC انجام شده است ولی تا به حال مطالعه‌ای بر روی گونه‌ی *Agrimonia eupatoria* انجام نشده است. نتایج حاصل از محققان قبل نشان داده است که گیاه *Agrimonia eupatoria* حاوی آگریمونین، کوئرستین، کاتچین، لوتئولین، کامفرول، روتین، پروسیانیدین و آپیجین می‌باشد [۱۳]. مطالعات انجام شده بر روی این ترکیبات مشخص کرده است که بعضی از این ترکیبات همانند آگریمونین، کوئرستین، کاتچین، لوتئولین و کامفرول دارای خاصیت تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی هستند. همچنین نتایج حاصل از محققان قبل با استفاده از کروماتوگرافی فاز مایع با فشار بالا (HPLC) و طیف سنجی جرمی نشان داده است که قسمت‌های هوایی گیاه غاغت حاوی ۹/۰-۶/۰ mg/g فنولیک اسید، ۹/۱۰-۲/۸ mg/g فلاونوئید و





نمودار شماره ۱- اثر عصاره متانولی غلظت‌های مختلف سرشاخه، ساقه، بذر و برگ گیاه غافث بر تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  محاسبه شد) تمامی نمونه‌ها از غلظت  $500 \mu\text{g/ml}$  دارای اختلاف معنی‌دار با شاهد بودند.

آن مشخص شد که کوئرستین دارای فعالیت ضدباکتری علیه استرپتوکوک موتانس می‌باشد [۱۹].

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیقات و جدول شماره ۱ می‌توان نتیجه گرفت که اثر ضدباکتری سرشاخه، برگ، بذر و ساقه گیاه غافث می‌تواند به علت وجود متابولیت‌های ثانویه با ارزش مانند کاتچین، لوتئولین، آپیجین و کوئرستین باشد.

### نتیجه‌گیری

گیاه غافث با داشتن خاصیت تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی و همچنین خاصیت ضدباکتری علیه برخی باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت می‌تواند کاندید مناسبی برای درمان بیماری‌های نقص سیستم ایمنی و همچنین عفونت‌های باکتریایی به کار رود که به این منظور نیازمند مطالعات و تحقیقات بیشتری می‌باشد.

نتایج حاصل از بررسی اثر ضدباکتری بخش‌های مختلف عصاره متانولی گیاه غافث بر باکتری‌های بیماری‌زای مورد مطالعه مشخص کرد که این عصاره دارای فعالیت ضدباکتری بیشتری علیه باکتری‌های گرم مثبت و مخصوصاً باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوک اورئوس می‌باشد و بر باکتری‌های گرم منفی اثر ضدباکتری ندارد.

مطالعاتی که بر روی ترکیبات موجود در این گیاه انجام شده، مشخص کرده است که ترکیباتی مانند کوئرستین، لوتئولین، آپیجین، کاتچین، کامفرول و روتین موجود در این گیاه دارای فعالیت ضدباکتری می‌باشند. برای مثال کاتچین موجب مهار فعالیت استافیلوکوک اورئوس شده و لوتئولین و آپیجین به طور اختصاصی موجب مهار فعالیت استافیلوکوک اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) می‌شوند [۱۷]، [۱۶]. در تحقیق دیگری مشخص شد که لوتئولین دارای اثر ضدباکتری بر باسیلوس سوبتیلیس نیز می‌باشد [۱۸]. علاوه بر

### منابع

1. Savant C, Joshi N, Reddy S, Mannasaheb BA and Joshi H. Immunomodulatory medicinal plants

of India: a review. *J. Pharmacol. and Toxicol.* 2014; 2: 109 - 15.



2. Rechinger K.H. (ed.) Flora Iranica. Akademische Druck-u Verlagsanstalt, Graz. 1969, pp: 148-152
3. Zargari A. Medicinal plants. Vol. 2, Edition 6. Tehran: Tehran university publication. 1996, pp: 198
4. Ghahreman A. Plant systematic: cormophytes of Iran. Vol. 2, Edition 2. Tehran: Iran university press. 1993, pp: 532-565
5. Granica S, Krupa K, Klebowska A and k. Kiss K. Development and validation of HPLC\_DAD\_CAD\_MS method for qualitative and quantitative standardization of polyphenols in *Agrimonia eupatoria* herba. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2013; 86: 112 - 22.
6. Feng XL, He YB, Liang YZ, Wang YL, Huang LF and Xie JW. Comparative Analysis of the volatile components of *Agrimonia eupatoria* from leaves and roots by gas chromatography-mass spectrometry and multivariate curve resolution. *J. Analytical Methods in Chemistry* 2013; 1-9
7. Copland A, Nahar N, Tomlinson CTM, Hamilton V, Middleton M, Kumarasamy Y and Sarker SD. Antibacterial and free radical scavenging activity of the seeds of *Agrimonia eupatoria*. *J. Fitoterapia* 2003; 74: 133 - 5.
8. Ivanova D, Tasinove O, Vancova D and Kiselova-Kaneva Y. Antioxidative potential of *Agrimonia eupatoria* L. *J. Medicine* 2011; 1: 20-24.
9. Adhiah A, Al-Bederi ONH, AL-Sammarræ KW. Citotoxic effects of *Agrimonia eupatoria* L. against cancer cell lines in vitro. *J Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences* 2013; 14: 87 - 92.
10. Morteza-Semnani K, Azadbakht M and Goodarzi A. The essential oils composition of *Phlomis herba-venti* L. leaves and flowers of Iranian origin. *J. Flavour and Fragrance* 2004; 19.1: 29 - 31.
11. Parekh J, Jadeja D and Chanda S. Efficacy of aqueous and methanol extracts of some medicinal plants for potential antibacterial activity. *J. Turkish of Biology* 2006; 29.4: 203 - 10.
12. Daenicke S, Keese Ch, Goyarts T and Doll S. Effect of deoxynivalenol (DON) and related compounds on bovine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in vitro and in vivo. *J. Mycotoxin Res.* 2011; 27: 49 - 55.
13. Correia H, Gonzalez-paramas A, Amaral MT, Santos-Buelga C and Batista MT. Polyphenolic profile characterization of *Agrimonia eupatoria* L. by HPLC with different detection devices. *J. Biomedical Chromatography* 2006; 20: 86-94.
14. Murayama T, Kishi N, Koshiura R, Takagi K, Furukawa T and Miyamoto K. Agrimoniin, an antitumor tannin of *Agrimonia pilosa* Ledeb., induces interleukin-1. *J. Anticancer Res.* 1992; 12: 1471 - 4.
15. Lyu SY and Park WB. Production of cytokine and NO by RAW 264.7 Macrophages and PBMC in vitro incubation with flavonoids. *J. Archives of Pharmacal Res.* 2005; 28: 573 - 81.
16. Kasai S, Watanab S, Kawabata J, Tahara S and Mizutani J. Antimicrobial catechin derivatives of *Agrimonia pilosa*. *J. Phytochem.* 1992; 31: 787 - 9.
17. Sato Y, Suzaki Sh, Nishikawa T, Kihara M, Shibata H and Higuti T. Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* 2000; 72: 483 - 8.
18. Lv PC, Li HQ, Xue JY, Shi L and Zhu HL. Syntheses and biological evaluation of novel luteolin derivatives as antibacterial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2009; 44: 908 - 14.
19. Prabu GR, Gnanamani A and Sadulla S. Guaijaverin- a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *J. Applied Microbiol.* 2006; 101: 487-95.



## In vitro Evaluation of Methanol Extract of *Agrimonia eupatoria* on PBMC and 12 Pathogenic Bacteria

Masjedi MS (M.Sc. Student)<sup>1</sup>, Keyhanfar M (Ph.D.)<sup>1\*</sup>, Behbahani M (Ph.D.)<sup>1</sup>

1- Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran

\* Corresponding author: Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, 81746-73441, Iran

Tel: +98-31-37934402, Fax: +98-31-37932342

Email: m.keyhanfar@ast.ui.ac.ir

### Abstract

**Background:** Today the use of medicinal plants to improve the immune system function and against pathogenic bacteria has been considered.

**Objective:** In this study, the effect of methanol extract of the aerial parts of *Agrimonia eupatoria* on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and 12 pathogenic bacteria were investigated.

**Methods:** The methanol extract of branches, stems, seeds and leaves of *Agrimonia eupatoria* were prepared and the effect of different concentrations of 50, 100, 500, 1000, 1500, 2000 and 2500 µg/ml of the extract on proliferation of PBMC was evaluated by MTT assay. Also the effect of concentrations of 1, 2, 4, 5, 7 and 10 mg/ml of the extract was tested on 12 pathogenic bacteria by disc method and on nutrient agar media.

**Results:** The methanol extract of the branch, stem and seed of *Agrimonia eupatoria* showed the most stimulatory effects on immune system and induced the proliferation of PBMCs up to 8 times. Methanol extract of *Agrimonia eupatoria* showed antibacterial effects against gram-positive bacteria and the most antibacterial effect was on *Bacillus subtilis* at a concentration of 4 mg/ml and *Staphylococcus aureus* at concentration of 7 mg/ml.

**Conclusion:** The *Agrimonia eupatoria* methanol extract showed stimulatory effects on the immune system and also antibacterial properties against certain gram-positive pathogenic bacteria. These finding indicate that *Agrimonia eupatoria* can be considered to use for immunodeficiency patients and moreover to control some bacterial infections.

**Keywords:** *Agrimonia eupatoria*, Antibacterial, Immunostimulator, PBMC

