

بررسی اثر عصاره اسطوخودوس بر تکثیر لنفوسيتی و سایتوکاین فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا

عباس آزادمهر^۱، رضا حاجی‌آقایی^{۲*}، شمسعلی رضازاده^۳، افшин افشاری^۳، مژگان کیانی امین^۳، بهزاد برادران^۴

پریوش ابراهیمی^۵

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، باشگاه پژوهشگران جوان، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه فارماکوگنوزی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، تهران

۳- استادیار، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین

۴- استادیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز

۵- مریبی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران پزشکی، تهران

*آدرس مکاتبه: کرج، کیلومتر آزادراه تهران - قزوین، بلوار کاوش، مجتمع تحقیقاتی جهاددانشگاهی،

پژوهشکده گیاهان دارویی، صندوق پستی: ۱۴۴۶ - ۱۳۱۴۵، تلفن: ۰۲۶۱ (۴۷۶۴۰۱۰-۱۸)

نمبر: ۰۲۶۱ (۴۷۶۴۰۲۱)

پست الکترونیک: rhajiaghae@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۸۹/۱۰/۲۲

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۲۰

چکیده

مقدمه: مطالعات زیادی نشان دادند که عصاره گیاهان دارای اثرات متنوع بیولوژیکی از قبیل خواص ایمونومدولاتوری می‌باشند.

هدف: در این تحقیق، خواص ایمونومدولاتوری عصاره گیاه اسطوخودوس بر تکثیر لنفوسيتی و سایتوکاین فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا، بررسی شد.

روش بررسی: آزمایش ورود تیمیدین نشاندار بر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی تحریک شده با میتوژن فیتوهماگلوتینین

جهت اثر بر تکثیر لنفوسيتی و تولید سایتوکاین فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا با روش الایزا بررسی شدند.

نتایج: عصاره گیاه در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمتر از آن، سبب تحریک تکثیر لنفوسيت‌های خون محیطی تحریک شده

با میتوژن شد اما در غلظت‌های بیشتر اثر معنی داری بر تکثیر لنفوسيتی مشاهده نشد. عصاره گیاه اسطوخودوس در غلظت‌های ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بیشتر از آن سبب کاهش تولید سایتوکاین فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا شد.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق، اثر ایمونومدولاتوری عصاره گیاه اسطوخودوس را با تحریک تکثیر لنفوسيتی در غلظت‌های کمتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کاهش تولید سایتوکاین الهاپی فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا در غلظت‌های بیشتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داد. بررسی جهت شناسایی اثرات میانجیگر ایمونومدولاتوری عصاره این گیاه می‌تواند مفید باشد.

گل واژگان: اسطوخودوس، تکثیر لنفوسيتی، سایتوکاین فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا

مقدمه

اثرات ایمونومدولاتوری عصاره گیاه دارویی اسطوخودوس در محیط برون تنی با بررسی اثر بر تکثیر لنفوسیتی و سایتوکاین التهابی فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا اقدام نماییم.

مواد و روش ها

مواد و وسایل مورد نیاز

کلیه حلال های مورد نیاز از شرکت Merck و محیط کشت ها و مواد بیوشیمیائی از قبیل تیمیدین نشاندار از شرکت های Sigma و Gibco خریداری شد.

تهیه عصاره گیاه اسطوخودوس

گیاه *L. officinalis* از مزرعه پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی جمع آوری و در سایه خشک شد. پس از خشک شدن، گیاه آسیاب شد و مقدار ۱۰۰ گرم از آن به روش پرکولاسیون با حلal اتانول ۹۰ درجه عصاره گیری شد. بازده عصاره گیری ۱۰ درصد بود. نمونه هرباریوم این گیاه با شماره ۳۲۲ در هرباریوم پژوهشکده گیاهان دارویی نگهداری می شود.

جداسازی سلول های تک هسته ای و سنجش تحریک تکثیر لنفوسیتی

برای تهیه سلول های تک هسته ای خون محیطی، در شرایط کاملاً استریل از فرد سالم خون هپارینه گرفته شد و به لوله آزمایش استریل با آرامی و از جدار لوله با نسبت دو به یک بر روی فایکول متنقل و در دور ۸۰۰ گرم، دمای ۱۸ درجه سانتی گراد و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس با پیپت پاستور حلقه میانی حاوی سلول های تک هسته ای خون برداشته و به لوله دیگری انتقال داده شد و در دور ۴۵۰ گرم به مدت ۱۰ دقیقه، سلول ها سه بار با بافر PBS شسته شدند. به رسوب سلولی در آخرین شستشو یک سی سی محیط کشت ده درصد FBS-RPMI اضافه شد و با استفاده از تریپان بلو، سلول های زنده شمارش شدند. پس از جdasازی سلول های تک هسته ای، 1×10^5 سلول در هر چاهک میکرو پلیت ۹۶ خانه کشت شد و حجمنهایی با محیط کشت ده درصد

یکی از افق هایی که همواره انسان را به دنبال کشف ناشناخته های خود کشانده، طبیعت و مواد ارزشمند موجود در آن است. طی سالیان متعددی داروهای طبیعی، خصوصاً گیاهان دارویی اساس و حتی در برخی موارد تنها راه درمان محسوب می شد و در عین حال، مواد اولیه موجود در آنها در صنعت دارو سازی مورد استفاده قرار می گرفت. استفاده گسترده گیاهان دارویی، می تواند به دلایل مختلفی از قبیل کمتر بودن عوارض جانبی، پذیرش بهتر بیمار به علت توصیه طب سنتی و استفاده نسل های گذشته، سازگاری بیشتر با عملکرد فیزیولوژیک بدن و قیمت کمتر آن باشد. اسطوخودوس با نام علمی *Lavandula officinalis* از گیاهان دارویی شناخته شده بسیار قدیمی با اثرات مفید می باشد. محققان خواص متعددی درمانی از قبیل، ضد اضطراب، ضد افسردگی، ضد التهابی، ضد اسیاسم، ضد درد، ضد باکتری، ضد انگل، ضد ویروس، آرام بخشی، آنتی اکسیدانی را از این گیاه با ارزش گزارش کردند [۱، ۲]. به دلایل فواید ارزشمند این گیاه و انسان های فراوان موجود در آن، در صنایع آرایشی بهداشتی در ساخت انواع لوسيون های پوستی، انواع عطر، صابون و همین طور در صنایع غذایی، برای خوش طعم نمودن انواع خوراکی ها از قبیل کیک، بستنی و نوشیدنی ها استفاده می شود [۳، ۴]. سایتوکاین فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا از واسطه های التهابی با نقش های مهم در پاسخ ایمنی می باشد که اهمیت و نقش آن در بیماری های خود ایمن مثل آرتربیت روماتویید و کرون مشخص شده است [۵، ۶]. سلول های تک هسته ای خون محیطی انسان، لنفوسیت ها (۹۰ - ۸۵ درصد) و مونو سیت ها (۱۵ - ۱۰ درصد)، یکی از منبع مهم سایتوکاین های تنظیم کننده پاسخ ایمنی در گردش خون و بخش های ملتهب بدن می باشد. یکی از سایتوکاین های مهم التهابی فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا می باشد که با فعال شدن پاسخ ایمنی توسط سلول های تک هسته ای خون محیطی تولید می شود و با اندازه گیری آن می توان جهت بررسی اثرات عملکردی مداخلات ضد التهابی استفاده شود [۷]. با توجه به تنوع گیاهان در کشور و به خصوص منحصر به فرد بودن برخی از گیاهان در این تحقیق بران شدیم تا نسبت به شناسایی



رووش‌های آماری

نتایج آزمایش‌ها با نرم‌افزار SPSS16 جمع‌آوری و بررسی آماری با روش آنالیز واریانس ANOVA و Bonferroni انجام شده و گروه‌های دریافت‌کننده عصاره گیاهی با گروه کنترل که هیچ‌گونه عصاره گیاهی دریافت نکردند، مقایسه شدند. لازم به ذکر می‌باشد کلیه آزمایش‌ها سه بار تکرار شده و نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ نشان داده شده‌اند و $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

میزان تکثیر لنفوسيتی

نتایج حاصل از آزمایش تکثیر لنفوسيتی بر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی که در مجاورت رقت‌های مختلف $0/1$ ، 1 ، 10 ، 50 ، 100 ، 200 میکروگرم بر میلی‌لیتر و فیتوهم‌ماگلوتینین انکوبه و به اندکس تحریک تکثیر سلولی تبدیل شد (طبق فرمول SI کنترل منفی ۱ در نظر گرفته شد)، عصاره گیاه در غلظت پنجاه میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمتر از آن، سبب تحریک ضعیف تکثیر لنفوسيت‌های خون محیطی تحریک شده با میتوژن گردید ($p < 0.05$) اما در غلظت‌های بیشتر اثر معنی‌داری بر تکثیر لنفوسيتی مشاهده نشد. این نتایج نشان داد که عصاره گیاه در غلظت‌های کمتر می‌تواند سبب تحریک ملایم تکثیر لنفوسيتی شده اما در غلظت‌های بیشتر از پنجاه میکروگرم بر میلی‌لیتر هیچ اثر معنی‌داری بر تحریک تکثیر سلولی نشان نداد (نمودار شماره ۱).

FBS-RPMI به 100 میکرومتر رسانده شد. سپس سلول‌ها با میتوژن فیتو هماگلوتینین 10 میکروگرم بر میلی‌لیتر تحریک و به مدت 72 ساعت با یا بدون عصاره گیاه در غلظت‌های $0/1$ ، 1 ، 10 ، 50 ، 100 ، 200 میکروگرم بر میلی‌لیتر برای هر غلظت سه بار در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد با 5 درصد CO_2 اندکوبه شدند. بعد از سه روز، 25 میکرومتر، 3H تیمیدین رقیق شده ($1:100$) به کلیه چاهک‌ها افروده شد. پس از 18 ساعت از افرودن 3H تیمیدین، سلول‌ها توسط دستگاه cell-Harvester نیمه اتوماتیک بر روی کاغذ هاروستر برده شدند. کاغذها پس از خش دیسک‌های فیلتر از روی کاغذ جدا و هر یک در تیوب‌های مخصوص بتا کانتر حاوی مایع سیتیلاسیون قرار گرفته و تابش اشعه بتا توسط دستگاه بتا کانتر اندازه‌گیری شد. سپس میزان ایندکس تحریک سلول‌ها با فرمول شماره 1 محاسبه شد.

$\text{SI} = \frac{\text{Mی‌باشد و مفهوم } 1 > \text{SI}}{\text{می‌باشد و مفهوم } 1 < \text{SI}}$ یعنی اثر تحریکی و به مفهوم اثر مهاری است [۸].

پس از پایان این مدت، مایع رویی حاصل از کشت سلولی جمع‌آوری و تا زمان انجام تست الایزا در فریزر -70 - درجه جهت اندازه‌گیری سایتوکاین نگهداری شد.

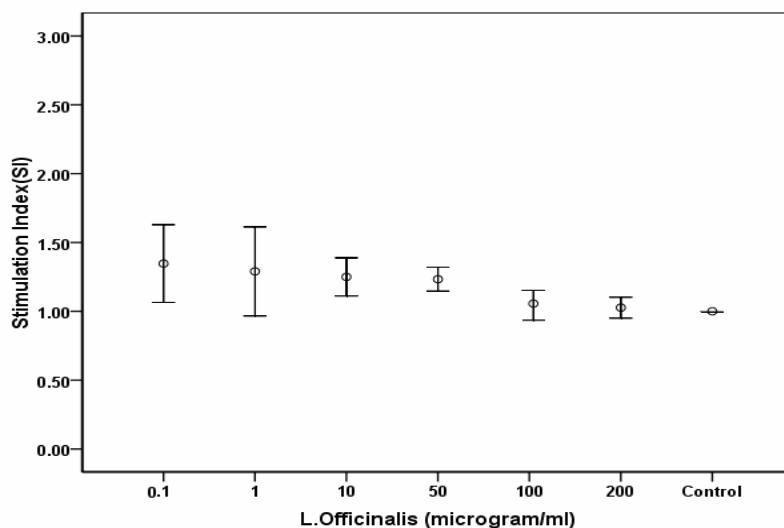
اندازه‌گیری غلظت سایتوکاین فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا

غلظت سایتوکاین فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا مایع رویی حاصل از کشت سلولی با روش الایزا و با استفاده از دستورالعمل کیت تجاری شرکت Diaclone فرانسه با استفاده از منحنی استاندارد اندازه‌گیری شد [۸].

تعداد سلول‌های کانت شده در گروه کنترل منفی (محیط کشت) - تعداد سلول‌های کانت شده در گروه تیمار شده با عصاره گیاه
SI=-----

تعداد سلول‌های کانت شده در گروه کنترل منفی (محیط کشت) - تعداد سلول‌های کانت شده در گروه کنترل مثبت (PHA)

فرمول شماره 1 - میزان ایندکس تحریک سلول‌ها



نمودار شماره ۱- ایندکس تحریکی مربوط به تکثیر لنفوسيتی بعد از تیمار با عصاره گیاه

نتایج با آزمون آنالیز واریانس ANOVA نشان داد که در غلظت‌های کمتر از پنجاه میکروگرم بر میلی‌لیتر، عصاره اثر تحریکی معنی‌داری در تکثیر لنفوسيتی داشت اما در غلظت‌های بالاتر این رابطه معنی‌دار نبود. نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ نشان داده شده‌اند.

یکی از گیاهان دارویی شناخته شده بسیار قدیمی با اثرات مفید می‌باشد که مصارف متعددی دارد. محققان خواص متعددی درمانی از قبیل، ضداضطراب، ضدافسردگی، ضدالتهابی، ضدآبسیسم، ضددرد، ضدبالکتری، ضدانگل، ضدوبیروس، آرامبخشی، آنتیاکسیدانی را از این گیاه با ارزش گزارش کردند [۱،۲،۹]. با توجه به اینکه از گیاه اسطوخودوس به طور سنتی برای درمان ضددرد، آرامبخش و ضدمیگرن استفاده می‌شود، قضاؤت علمی در مورد خواص ایمونومدولاتوری این گیاه با استفاده از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در مورد این باور سنتی، با بررسی اثر عصاره بر تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای و تولید سایتوکاین التهابی فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا انجام شد. تحقیقی در سال ۲۰۰۶ توسط استانداند و همکاران نشان داد، اسانس گیاه L. angustifolia در غلظت‌های کم سبب تقویت فعالیت لنفوسيت‌های کشنده طبیعی و سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی می‌شود [۱۰]. نتایج سنجش تکثیر لنفوسيتی با استفاده از آزمایش تکثیر سلولی بیانگر تحریک ضعیف تکثیر لنفوسيت‌های خون محیطی با عصاره گیاه اسطوخودوس در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمتر از آن بود. در غلظت‌های بیشتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر هیچ اثر

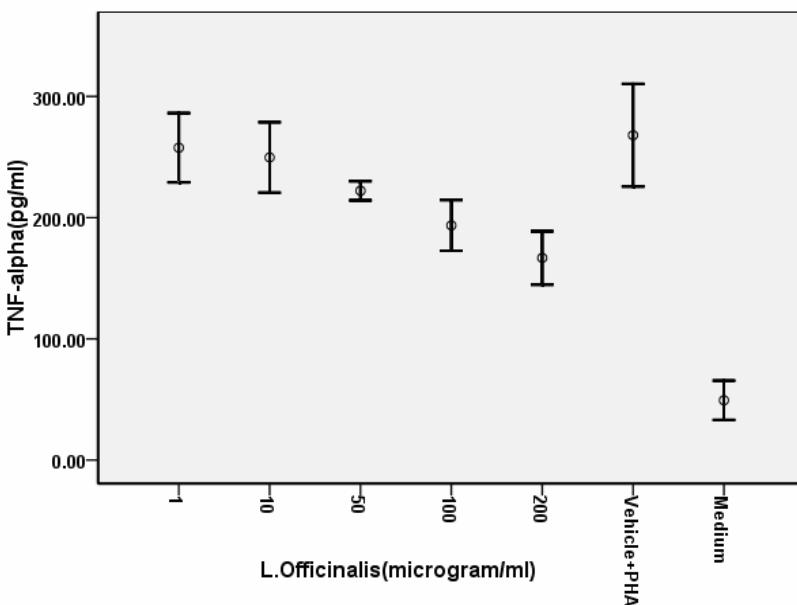
میزان غلظت فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا

به منظور بررسی اثر عصاره گیاه بر تولید سایتوکاین فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی مایع رویی حاصل از کشت سلولی جمع آوری و آزمایش الیزا انجام شد. تغییرات غلظت سایتوکاین فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا که با استفاده از جذب‌های خوانده شده (برای هر رقت سه بار) و منحنی استاندارد به دست آمد، با روش‌های آماری آنالیز شد. نتایج حاصل نشان داد که عصاره گیاه در غلظت‌های ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بیشتر از آن سبب کاهش معنی‌دار تولید سایتوکاین فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا شد ($p < 0.05$). این نتایج نشان داد که عصاره می‌تواند در غلظت‌های بیشتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سبب کاهش تولید سایتوکاین فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا شد اما در غلظت‌های کمتر از آن اثر معنی‌داری در تولید این سایتوکاین مشاهده نشد (نمودار شماره ۲).

بحث

استفاده از گیاهان دارویی در طب سنتی در کشور ما سابقه طولانی و قدیمی دارد. اسطوخودوس با نام علمی





نمودار شماره ۲- اثر عصاره بر تولید سایتوکاین فاکتور نکروز دهنده تومور الفا

نتیجه با آزمون آنالیز واریانس ANOVA نشان داد که عصاره در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر و بیشتر از آن در مقایسه با گروه کنترل (میتوژن فیتوهماگلوتینین بدون عصاره) سبب کاهش معنی داری در تولید سایتوکاین فاکتور نکروز دهنده تومور الفا شده است. نتایج به صورت mean \pm SD نشان داده شده اند.

تایید نموده و مشخص شد که عصاره گیاه در غلظت های ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر و بیشتر از آن سبب کاهش معنی دار تولید سایتوکاین فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا شد اما در غلظت های کمتر از آن، اثر معنی داری در مهار تولید این سایتوکاین مشاهده نشد.

نتیجه گیری

در یک نتیجه گیری کلی می توان گفت، اثرات ایمونومدولاتوری عصاره گیاه اسطوخودوس با تحریک تکثیر لنفوسيتی در غلظت های کمتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر و کاهش تولید سایتوکاین فاکتور نکروز دهنده تومور الفا در غلظت های بیشتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر، می تواند زمینه ساز تحقیقات دیگر در این حیطه باشد. همچنین بررسی جهت شناسایی دیگر اثرات میانجیگر ایمونومدولاتوری عصاره این گیاه می تواند مفید باشد.

معنی داری بر تحریک تکثیر سلولی مشاهده نشد. در تحقیقی در سال ۲۰۰۰ که توسط حیدری و همکارانش در مورد بررسی اثر ضددردی عصاره متانولی گیاه اسطوخودوس انجام شده، مشخص شد که پیش درمانی حیوانات با نالوکسان تاثیری در اثر ضددردی عصاره نداشت و لذا احتمال دخالت گیرنده های اپیوئیدی، در اثر ضددردی عصاره گیاه اسطوخودوس متفقی است و با توجه به نتایج به دست آمده و با مقایسه اثر ضددردی رقت موثر عصاره با آسپرین و مورفین به نظر می رسد که آثار ضددردی عصاره گیاه اسطوخودوس ناشی از تأثیرش بر روی فرایندهای التهابی است [۱۱]. در تحقیق اخیر با توجه به گزارش قبلی (حیدری و همکارانش، سال ۲۰۰۰) مبنی بر اینکه احتمال ضددردی عصاره گیاه اسطوخودوس می تواند از طریق فرآیندهای التهابی باشد، تولید فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا را که یکی از سایتوکاین های مهم و میانجیگر در پاسخ های التهابی است را اندازه گیری کردیم. نتایج ما نیز موافق با گزارش قبلی که احتمالاً عصاره گیاه اسطوخودوس می تواند از مسیر فرآیندهای التهابی اثر ضددردی داشته باشد را

منابع

1. Gamez MJ, Jimenez J, Navarro C and Zarzuelo A. Study of essential oil of *Lavendula dentata* L. *Pharmazie* 1990; 45 (1): 69 - 70.
2. Buchbauer G, Jirovetz L, Jager W, Dietrich H and Plank C. Aromatherapy: evidence for sedative effects of the essential oil of lavender after inhalation. *Z. Naturforsch. C.* 1991; 46 (11 - 12): 1067 - 72.
3. Fakhari A, Salehi P, Heydari R, Nejad Ebrahimi S, Haddad P. Hydrodistillation headspace solvent micro extraction; a new method for analysis of the essential oil components of *Lavandula angustifolia* Mill. *J. Chromatogr. A.* 2005; 1098 (1 - 2): 14 - 78.
4. Kim NS and Lee DS. Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography – mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2002; 982 (1): 31 - 47.
5. Elliott MJ, Feldmann M and Maini RN. TNF alpha blockade in rheumatoid arthritis: rationale, clinical outcomes and mechanisms of action. *Int. J. Immunopharmacol.* 1995; 17 (2): 141 - 5.
6. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF and Rutgeerts PJ. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N. Engl. J. Med.* 1997; 337 (15): 1029 - 35.
7. Calder PC, Yaqoob P, Thies F, Wallace FA and Miles EA. Fatty acids and lymphocyte functions. *Br. J. Nutr.* 2002; 87 (S1): S31 - S48.
8. Amirghofran Z, Azadmehr A and Javidnia K. *Haussknechtia elymatica*: a plant with immunomodulatory effects. *Iran J. Immunol.* 2007; 4 (1): 26 - 31.
9. Hajhashemi V, Ghannadi A and Sharif B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *J. Ethnopharmacol.* 2003; 89: 67 - 71.
10. Standen MD, Connellan PA and Leach DN. Natural killer cell activity and lymphocyte activation: Investigating the effects of a selection of essential oils and components in vitro. *The Inter. J. Aromatherapy* 2006; 16: 133 - 9.
11. Heidare MR, Zahedi MJ and Rezvani H. Analgesic effect of *lavandula officinalis* and histopathological studies in mice. *Danesh. Med.* 2000; 8 (30): 23 - 30.

