بررسی اثر عصاره اسطوخودوس بر تکثیر لنفوسیتی و سایتوکاین فاکتور نکروزدهنده تومورآلفا

عباس آزادمهر[۱]، رضا حاجی‌آقایی[۲]*، شمسعلی رضازاده[۲]، افشین افشاری[۳]، مژگان کیانی امین[۳]، بهزاد برادران[٤]، پریوش ابراهیمی[٥]

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
٤- استادیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز
٥- مربی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران پزشکی، تهران
*آدرس مکاتبه: کرج، کیلومتر آزادراه تهران - قزوین، بلوار کاوش، مجتمع تحقیقاتی جهاددانشگاهی، پژوهشکده گیاهان دارویی، صندوق‌پستی: ١٤٤٦ - ١٣١٤٥، تلفن: ١٨-٤٧٦٤٠١٠ (٠٢٦١)
نمابر: ٤٧٦٤٠٢١ (٠٢٦١)
پست الکترونیک: rhajiaghaee@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۲۰ **تاریخ تصویب:** ۸۹/۱۰/۲۲

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 لنفوسیتی و سایتوکاین فاکتور نکروز دهنده تومور الفا، بررسی شد.

روش بررسی: آزمایش ورود تیمیدین نشاندار بر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی تحریک شده با میتوژن فیتوهماگلوتینین جهت اثر بر تکثیر لنفوسیتی و تولید سایتوکاین فاکتور نکروز دهنده تومور الفا با روش الایزا بررسی شدند.

نتایج: عصاره گیاه در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمتر از آن، سبب تحریک تکثیر لنفوسیت‌های خون محیطی تحریک شده با میتوژن شد اما در غلظت‌های بیشتر اثر معنی‌داری بر تکثیر لنفوسیتی 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.

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

گل‌واژگان: اسطوخودوس، تکثیر لنفوسیتی، سایتوکاین فاکتور نکروز دهنده تومور الفا

www.SID.ir

مقدمه

یکی از افق‌هایی که همواره انسان را به دنبال کشف ناشناخته‌های خود کشانده، طبیعت و مواد ارزشمند موجود در آن است. طی سالیان متمادی داروهای طبیعی، خصوصاً گیاهان دارویی اساس و حتی در برخی موارد تنها راه درمان محسوب می‌شد و در عین حال، مواد اولیه موجود در آنها در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار می‌گرفت. استفاده گسترده گیاهان دارویی، می‌تواند به دلایل مختلفی از قبیل کمتر بودن عوارض جانبی، پذیرش بهتر بیمار به علت توصیه طب سنتی و استفاده نسل‌های 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 می‌باشد. محققان خواص متعددی درمانی از قبیل، ضداضطراب، ضدافسردگی، ضدالتهابی، ضداسپاسم، ضددرد، ضدباکتری، ضدانگل، ضدویروس، آرام‌بخشی، آنتی‌اکسیدانی را از این گیاه با ارزش گزارش کردند [۱،۲]. به دلایل فواید ارزشمند این گیاه و اسانس‌های فراوان موجود در آن، در صنایع آرایشی بهداشتی در ساخت انواع لوسیون‌های پوستی، انواع عطر، صابون و همین‌طور در صنایع غذایی، برای خوش طعم نمودن انواع خوراکی‌ها از قبیل کیک، بستنی و نوشیدنی‌ها استفاده می‌شود [۳،٤]. سایتوکاین فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا از واسطه‌های التهابی با نقش‌های مهم در پاسخ ایمنی می‌باشد که اهمیت و نقش آن در بیماری‌های خود ایمن مثل آرتریت روماتویید و کرون مشخص شده است [۵،٦]. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان، لنفوسیت‌ها (۹۰ – ۸۵ درصد) و مونوسیت‌ها (۱۵ – ۱۰ درصد)، یکی از منبع مهم سایتوکاین‌های تنظیم‌کننده پاسخ ایمنی در گردش خون و بخش‌های ملتهب بدن می‌باشند. یکی از سایتوکاین‌های مهم التهابی فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا می‌باشد که با فعال شدن پاسخ ایمنی توسط سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی تولید می‌شود و با اندازه‌گیری آن می‌توان جهت بررسی اثرات عملکردی مداخلات ضدالتهابی 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 اثرات ایمونومدولاتوری عصاره گیاه دارویی اسطوخودوس در محیط برون‌تنی با بررسی اثر بر تکثیر لنفوسیتی و سایتوکاین التهابی فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا اقدام نماییم.

مواد و روش‌ها

مواد و وسایل موردنیاز

کلیه حلال‌های مورد نیاز از شرکت Merck و محیط کشت‌ها و مواد بیوشیمیائی از قبیل تیمیدین نشاندار از شرکت‌های Gibco و Sigma خریداری شد.

تهیه عصاره گیاه اسطوخودوس

گیاه *L. officinalis* از مزرعه پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی جمع‌آوری و در سایه خشک شد. پس از خشک شدن، گیاه آسیاب شد و مقدار ۱۰۰ گرم از آن به روش پرکولاسیون با حلال اتانول ۹۰ درجه عصاره‌گیری شد. بازده عصاره‌گیری ۱۰ درصد بود. نمونه هرباریوم این گیاه با شماره ۳۲۲ در هرباریوم پژوهشکده گیاهان دارویی نگهداری می‌شود.

جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای و سنجش تحریک تکثیر لنفوسیتی

برای تهیه سلول‌های تک هسته‌ای 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 منتقل و در دور ۸۰۰ گرم، دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس با پیپت پاستور حلقه میانی حاوی سلول‌های تک هسته‌ای خون برداشته و به لوله دیگری انتقال داده شد و در دور ٤۵۰ گرم به مدت ۱۰ دقیقه، سلول‌ها 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، سلول‌های زنده شمارش شدند. پس از جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای، ۱×۱۰^{۵} سلول در هر چاهک میکروپلیت ۹٦ خانه کشت شد و حجم نهایی با محیط کشت ده درصد

Archive of SID
www.SID.ir

FBS-RPMI به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس سلول‌ها با میتوژن فیتو هماگلوتینین ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تحریک و به مدت ۷۲ ساعت با یا بدون عصاره گیاه در غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای هر غلظت سه بار در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO_2 ۵ درصد انکوبه شدند. بعد از سه روز، ۲۵ میکرولیتر، 3H تیمیدین رقیق شده (۱:۱۰۰) به کلیه چاهک‌ها افزوده شد. پس از ۱۸ ساعت از افزودن 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 سینتیلاسیون قرار گرفته و تابش اشعهٔ بتا توسط دستگاه بتا کانتر اندازه‌گیری شد. سپس میزان ایندکس تحریک سلول‌ها با فرمول شماره ۱ محاسبه شد.

ایندکس تحریکی جهت گروه کنترل Stimulation Index (SI) =1 می‌باشد و مفهوم SI >1 یعنی اثر تحریکی و SI<1 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 ۷۰- 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].

روش‌های 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 mean ± SD نشان داده شده‌اند و $p <$ ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

میزان تکثیر لنفوسیتی

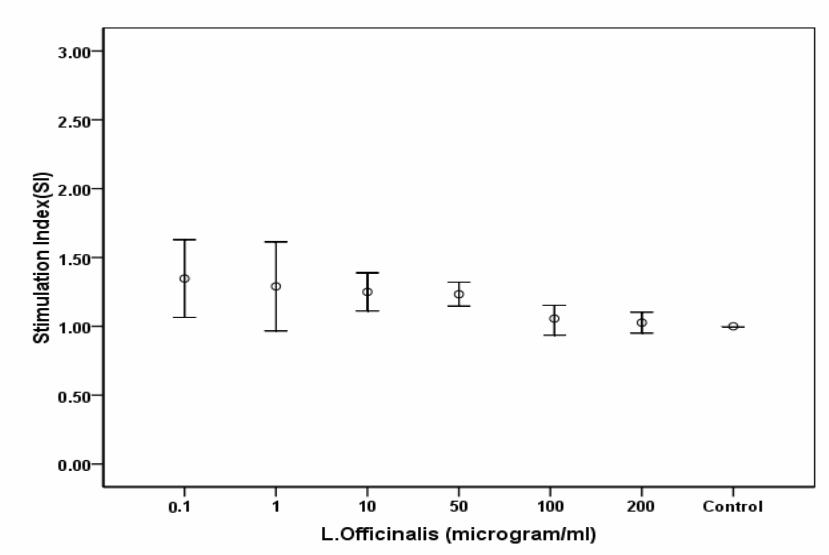
نتایج حاصل از آزمایش تکثیر لنفوسیتی بر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی که در مجاورت رقت‌های مختلف ۰/۱، ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و فیتوهماگلوتینین انکوبه و به اندکس تحریک تکثیر سلولی تبدیل شد (طبق فرمول SI کنترل منفی ۱ در نظر گرفته شد)، عصاره گیاه در غلظت پنجاه میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمتر از آن، سبب تحریک ضعیف تکثیر لنفوسیت‌های خون محیطی تحریک شده با میتوژن گردید ($p<$۰/۰۵) اما در غلظت‌های بیشتر اثر معنی‌داری بر تکثیر لنفوسیتی مشاهده نشد. این نتایج نشان داد که عصاره گیاه در غلظت‌های کمتر می‌تواند سبب تحریک ملایم تکثیر لنفوسیتی شده اما در غلظت‌های بیشتر از پنجاه میکروگرم بر میلی‌لیتر هیچ اثر معنی‌داری بر تحریک تکثیر سلولی نشان نداد (نمودار شماره ۱).

$$SI = \frac{\text{تعداد سلول‌های کانت شده در گروه کنترل منفی (محیط کشت) - تعداد سلول‌های کانت شده در گروه تیمار شده با عصاره گیاه}}{\text{تعداد سلول‌های کانت شده در گروه کنترل منفی (محیط کشت) - تعداد سلول‌های کانت شده در گروه کنترل مثبت (PHA)}}$$

فرمول شماره ۱- میزان ایندکس تحریک سلول‌ها

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار شماره ۱- ایندکس تحریکی مربوط به تکثیر لنفوسیتی 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 لنفوسیتی داشت اما در غلظت‌های بالاتر این رابطه معنی‌دار نبود. نتایج به صورت mean ± SD نشان داده شده‌اند.

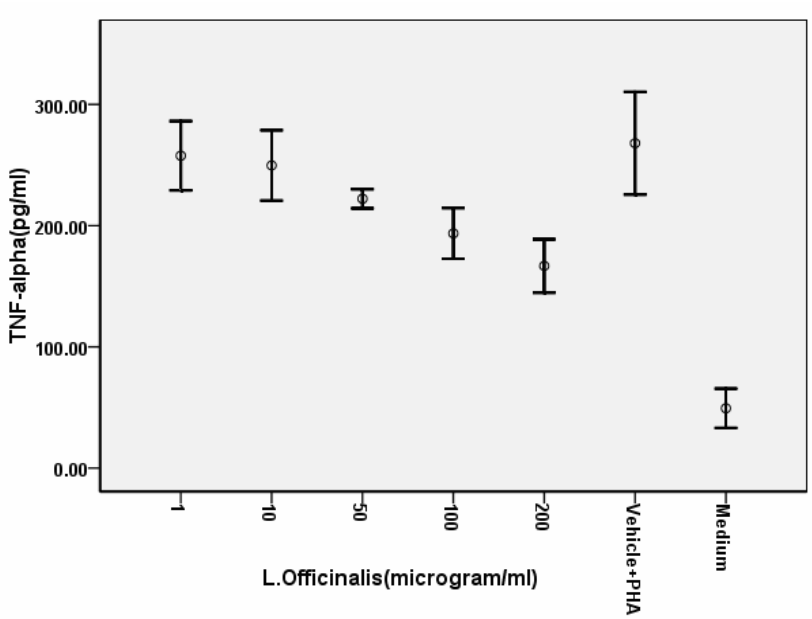
میزان غلظت فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا

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 جمع‌آوری و آزمایش الایزا 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 *L. officinalis* 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، ضداسپاسم، ضددرد، ضدباکتری، ضدانگل، ضدویروس، 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، قضاوت 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 استاندن و همکاران نشان داد، اسانس گیاه *L. angustifolia* در غلظت‌های کم سبب تقویت فعالیت لنفوسیت‌های کشنده طبیعی و سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی می‌شود [۱۰]. نتایج سنجش تکثیر لنفوسیتی با استفاده از آزمایش تکثیر سلولی بیانگرتحریک ضعیف تکثیر لنفوسیت‌های 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

Archive of SID
www.SID.ir



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 میلی‌لیتر و بیشتر از آن در مقایسه با گروه کنترل (میتوژن فیتوهماگلوتینین بدون عصاره) سبب کاهش معنی‌داری در تولید سایتوکاین فاکتور نکروز دهنده تومور الفا شده است. نتایج به صورت mean ± SD نشان داده شده‌اند.

معنی‌داری 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 نداشته و لذا احتمال دخالت گیرنده‌های اپیوئیدی، در اثر ضددردی عصاره گیاه اسطوخودوس منتفی است و با توجه به نتایج به دست آمده و با مقایسه اثر ضددردی رقت موثر عصاره با آسپرین و مورفین به نظر می‌رسد 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 می‌تواند از طریق فرآیندهای التهابی باشد، تولید فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا را که یکی از سایتوکاین‌های مهم و میانجیگر در پاسخ‌های التهابی است را اندازه‌گیری کردیم. نتایج ما نیز موافق با گزارش قبلی که احتمالاً عصاره گیاه اسطوخودوس می‌تواند از مسیر فرآیندهای التهابی اثر ضددردی داشته باشد را تایید نموده و مشخص شد که عصاره گیاه در غلظت‌های ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بیشتر از آن سبب کاهش معنی‌دار تولید سایتوکاین فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا شد اما در غلظت‌های کمتر از آن، اثر معنی‌داری در مهار تولید این سایتوکاین مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری

در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت، اثرات ایمونومدولاتوری عصاره گیاه اسطوخودوس با تحریک تکثیر لنفوسیتی در غلظت‌های کمتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کاهش تولید سایتوکاین فاکتور نکروز دهنده تومور الفا در غلظت‌های بیشتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، می‌تواند زمینه‌ساز تحقیقات دیگر در این حیطه باشد. همچنین بررسی جهت شناسایی دیگر اثرات میانجیگر ایمونومدولاتوری عصاره این گیاه می‌تواند مفید باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

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 lavander 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 histopatological studies in mice. *Danesh. Med.* 2000; 8 (30): 23 - 30.

Archive of SID

www.SID.ir