

نقش ایمونومدولاتور آبی انار و دو میوه خرما و انجیر بر پیشگیری و درمان کولیت حاد تجربی در موش صحرایی نر

فریده ظفری زنگنه^{۱*}، علیرضا عبدالمهی^۱، محمد مهدی نقی زاده^۳ و فاطمه امینی^۴

^۱ تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، مجتمع بیمارستانی امام خمینی، بیمارستان ولیعصر (عج)، مرکز بهداشت باروری ولیعصر (عج)، موسسه مطالعات تاریخ پزشکی طب اسلامی و مکمل

^۲ تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، مجتمع بیمارستانی امام خمینی، بیمارستان ولیعصر (عج)، آزمایشگاه مرکزی بیمارستان ولیعصر (عج)

^۳ فسا، دانشگاه علوم پزشکی فسا، دانشکده پزشکی، گروه پزشکی اجتماعی، آمار حیاتی

^۴ تهران، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی

تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۴ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۱۲

چکیده

بیماری التهابی روده (Inflammatory bowel diseases) IBD یکی از شایع ترین بیماریهای گوارشی است. سبب شناسی و آسیب شناسی بیماری نامعلوم و شواهد محکم و اساسی وجود دارد که سایتوکینین های پیش التهابی مانند اینترلوکین ۶ و فاکتور تومور نکروزیس آلفا در این روند التهابی نقش کلیدی به عهده دارند. در دهه اخیر بررسی اثرات درمانی و پیش درمانی برخی از تعدیل کننده ها و یا مهارکننده این مدياتورها صورت گرفته که بر جنبه های مختلف مدل کولیت حاد تجربی که IBD انسان را تقلید می نماید، تأکید دارد. در این تحقیق اثر پیشگیرانه و درمان آب انار و دو میوه خرما و انجیر در رژیم غذایی روزانه در مدل کولیت حاد موش صحرایی با دو عامل اینتر لوکین ۶ و فاکتور تومور نکروزیس به عنوان متغیر پرداخته شد. لذا موشها به سه گروه کنترل، پیشگیری و درمان تقسیم شدند و مدل سازی کولیت حاد توسط اسید استیک ۴ درصد انجام شد. در گروه پیشگیری ابتدا دو ماه تغذیه با آب انار، و دو میوه انجیر و خرما صورت گرفت و بعد مدل سازی و در گروه درمان بعد از مدل سازی، تغذیه مورد نظر به مدت دو ماه انجام شد. نتایج این مطالعه نشان می دهد که فقط رژیم غذایی خرما در پیشگیری از التهاب حاد روده مؤثر است. به طوری که این رژیم توانست مانع از انجام مدل سازی شود.

واژه های کلیدی: کولیت حاد، اینترلوکین ۶، فاکتور تومور نکروزیس آلفا، موش صحرایی نر، انار، خرما، انجیر

* نویسنده مسئول، تلفن: ۶۶۵۸۱۶۱۶، پست الکترونیکی: Zangeneh14@gmail.com

مقدمه

طولانی (حدود ۲۰۰ سال) که در کشورهای آذربایجان، ارمنستان، ایران، افغانستان، پاکستان، اسرائیل، کالیفرنیا و آریزونا در امریکا، جنوب اروپا و آفریقا کشت می شود. انار در کلیه کتب مقدس آسمانی: تورات، انجیل به عنوان میوه ای که قدرت باروری را بالا می برد و شانس و خوشبختی را فزونی می دهد و همچنین در قرآن کریم ذکر شده است. انار به طور قابل توجهی در جشنها و هنرهای اساطیر مصر

انار با نام علمی *Punica granatum L.* معروف به pomegranate از خانواده پونیکاسه می باشد و گاهی نار نیز خوانده می شود. این میوه با ژنوتیپ مشابهی در سراسر جهان نامگذاری شده است. ایران میزبان یکی از متنوع ترین ژنتیک عظیم انار می باشد، به طوری که بیش از ۷۵۰ ژنوتیپ آن در مجموعه بین المللی انار ایرانی در یزد- ایران وجود دارد. انار درختچه ای است باستانی و عمر

اکسیدانی، خودکشی سلولی (آپوپتوزیس)، آنتی پرولیفراتیو (ضد رشد سلولی) و ضد التهابی آن می باشد. مکانیسم ضد التهابی انار به علت اثر مهارى آن بر مدياتورهای التهابی از جمله سیکلو اکسیژناز و لیپو اکسیژناز می باشد که سیکلواکسیژناز یک آنزیم کلیدی در ساخت پروستاگلاندین ها از آراشیدونیک اسید است و لیپو اکسیژناز کاتالیز کننده تبدیل آراشیدونیک اسید به لکوترین ها می باشد و آب انار می تواند مهار کننده هر دو روند فوق باشد (۳۲). یکی دیگر از خواص آب انار تأثیر آن بر لیپوپروتئین های HDL, LDL و نسبت آنهاست که آب انار با کاهش در جذب کلسترول و افزایش در دفع آن اثر مثبتی بر آنزیمهای مداخله گر در روند متابولیسم کلسترول دارد (۱۸). آب انار در بیماران مبتلا به فشار خون سبب مهار تبدیل آنژیوتانسین I به II شده و در نتیجه موجب کاهش فشار سیستولیکی می گردد (۹). وجود پلی فنل در آب انار که دارای خاصیت ضد پلاکتی است سبب سلامت قلب و گردش خون و متعاقب آن کاهش دهنده خطرات قلبی عروقی در افراد پر ریسک خواهد بود (۳۲). همچنین خاصیت ضد میکروبیال (۱۹) و ضد قارچ آب انار نیز مورد توجه می باشد (۳۷). انجیر با نام علمی *Ficus Carica L.* معروف به *fig tree, higo, fig* از فامیل *Urticacea* است که بیش از پنج هزار سال از کشت آن در مناطق مدیترانه ای می گذرد. انجیر در کتب مقدسه یهودیان و یونانیان قدیم نام برده شده و خداوند در قرآن کریم به آن و زیتون قسم یاد کرده است و بقراط آن را در بیماریهای التهابی و همچنین به عنوان ملین مفید دانسته است و در افزایش عقل و قوه دماغی مؤثر شناخته شده است (۱). انجیر در کتاب قانون شیخ الرئیس ابوعلی سینا مایه آرامش، سبب تعریق، فریبه و درمان سرفه و همچنین تر و خشک آن در درمان صرع مفید ذکر شده است (۲). انجیر عاری از چربی، سدیم و کلسترول می باشد. در بین میوه ها، انجیر از میوه هایی است که بالاترین میزان مواد معدنی را دارا بوده و به خصوص حاوی مقدار زیادی کلسیم و فیبر می باشد (۴۵).

و یونان و تمثیلی از امپراطوری مقدس رومی، ماکسیمیان به طور ویژه ای مورد توجه بوده است. نام آن از شهر روم قدیم (کارتاز) که همان پونیکا که محل کشت آن بوده است و گرانا نیز در اسپانیاست گرفته شده است (۲۲ و ۴۴). در دهه گذشته مطالعات زیادی روی خواص آنتی اکسیدان، آنتی کارسینوژن و ضد التهابی انار انجام شده است. همچنین مطالعاتی در زمینه درمان و جلوگیری از سرطان، بیماریهای قلبی-عروقی، دیابت، اختلال در نعوظ، عفونتهای باکتریایی، مقاومت آنتی بیوتیکی و ضایعات پوستی ناشی از اشعه ماوراء بنفش صورت گرفته است. دیگر کاربرد قوی آن در ایسکمی مغز نوزاد، ناباروری آقایان، بیماری آرایمر و چاقی نیز قابل ذکر است. به طور سنتی در درمان اسهال، اولسرها، آفت و به عنوان تونیک خون و خاصیت ضد انگل مصرف داشته و لذا به "a pharmacy unto itself" معروف بوده است. نه فقط آب آن اثر درمانی دارد بلکه ریشه، پوست درخت، روغن دانه، گل و برگ آن نیز خاصیت دارویی فراوان دارد. آب انار دارای مواد مؤثره زیر: آنتوسیانین (۱۶)، گلوکز، اسید اسکوربیک (۲۱)، اسید الاژیک و کافئیک (۷)، کوئرستین (۸)، املاح به ویژه آهن (۲۸) و اسیدهای آمینه می باشد (۴۶). اسید الاژیک و کوئرستین دارای خاصیت آنتی اکسیدان و کارسینوژن می باشند (۳۴ و ۳۵). تحقیقات جدید نشان داده است که دو ماده اخیر در درمان سرطان پروستات مؤثر می باشند (۲۶ و ۲۷). مطالعات فارماکوکینتیکی نشان داده است که مصرف یکباره ۱۸۰ سی سی آب انار می تواند در مدت یک ساعت $31/9 \text{ ng/mL}$ اسید الاژیک را در پلاسما آنها با کلیرنس سریع چهار ساعت بعد از نوشیدن افزایش دهد (۴۰). همچنین افزایش $31/8$ ظرفیت آنتی اکسیدانی در پلاسما به مدت سی دقیقه ۱-۲ ساعت بعد از مصرف رخ می دهد (۳۶). ظرفیت آنتی اکسیدانی انار از طریق کاهش دهنده اکسیداتیو استرس و پراکسیداسیون لیپیدی می باشد (۱۵). خاصیت آنتی کارسینوژنیز انار در سرطان پروستات به علت اثر سینرژسم خواص آنتی

است و چون مقدار اسید اولئیک آن از ۵۸/۸-۴۱ درصد متغیر است، بنابراین می توان از خرما به عنوان منبع بزرگ اسید اولئیک یاد کرد و مقادیر ۴/۵-۱/۵ کیلوگرم / میلی گرم میوه تازه آن مهارکننده رادیکالهای سوپراکساید و هیدروکسیل می باشد (۶). خرما همچنین دارای ۶ ویتامین اصلی B1، B2، C، همچنین ویتامین A، اسید نیکوتینیک و اسید فولیک می باشد. کلاً میوه های خشک به طور عموم سرشار از مواد مغذی اند (۳۸).

بیماریهای التهابی دستگاه گوارش اتیولوژی یا سبب شناسی نامعلوم دارند و کولیت اولسراتیو (ulcerative colitis (UC) و بیماری کرون (CD) دو نوع اصلی از این بیماریها می باشند، که مزمن و عود کننده اند. معمولاً تشخیص بیماری التهابی روده (Inflammatory bowel diseases) (IBD) مشکل و با تردید همراه می باشد و گاهاً با همپوشانی (overlap) علائم بالینی دیگر، امر تشخیص با مشکل همراه است. بهترین اساس تشخیص و طبقه بندی در بیماریهای التهابی روده بررسی بافت موکوزال به همراه یافته های رادیولوژی و غیره می باشد. گزارشات نشان می دهد که IBD با اختلالات ایمنونولوژیک همراه است. در این مطالعه به تأثیر سه میوه انار، انجیر و خرما بر دو متغیر اینترلوکین ۶ و فاکتور تومور نکروزیس آلفا در دو مرحله پیشگیری و درمان مدل تجربی کولیت حاد در موش صحرایی نر پرداخته شده است.

مواد و روشها

۷۲ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰ گرم در سه گروه کنترل، پیشگیری و درمان تهیه و در دوازده گروه شش تایی (n=6) درون قفس نگهداری شدند. در گروه درمان مدل سازی همزمان با تغذیه مورد نظر انجام و در گروه پیشگیری دو ماه تغذیه مورد نظر که پایان یافت مدل سازی انجام گرفت. در این مطالعه جهت تغذیه از انار یزد، خرماهای خشک زاهدی و انجیر خشک اصطهبانات استفاده شده است. مدل سازی از روش القای

فعالیت آنتی موتازن عصاره انجیر و همچنین توانایی آن بر کروموزوم سلولهای مغز استخوان موش گزارش شده و مطالعات یاد شده کفایت بالای عمل آنتی موتازنی پراکسیدازهای آن را نشان می دهد (۴). نمونه های تجارتي میوه خشک و تازه انجیر در مقایسه با مطالعات *in vitro* به روش کالریمتریک با سنجش آنتی اکسیدانهای فنلیک نشان می دهد که خوردن ۴۰ گرم انجیر در فرد گرسنه به همراه نوشیدنی کربناته یا بدون آن، ظرفیت آنتی اکسیدانی ۴ ساعته در پلاسما ایجاد می نماید و آنتی اکسیدانهای انجیر می تواند لیپوپروتئینها را در پلاسما غنی کرده و آنها را از اکسیداسیون بعدی حفاظت نماید و در نهایت، تحقیقات آنتی اکسیدانی نشان داده است که انجیر بعد از مصرف در بدن انسان یک اثر آنتی اکسیدانی قوی *in vivo* را دارا می باشد (۴۷). همچنین نشان داده شده است که برگ انجیر باعث کاهش قند خون می شود که اثر فوق از طریق کاهش اکسیداتیواسترس صورت می گیرد (۴۱).

خرما با نام علمی *Phoenix dactylifera* معروف به *Date* یا *Palm* از خانواده *Palmaceae* محصول مناطق گرمسیری است. خرما میوه ای حیاتبخش و یکی از پرمصرف ترین میوه ها در رژیم غذایی کشورهای عربی می باشد. این میوه دارای چندین اثر مهم فارماکولوژیکی نظیر آنتی اکسیدان و آنتی موتازن است (۴۵) و از نظر املاح، بسیار غنی و حداقل پانزده ماده معدنی یا مینرال دارد که درصد آنها در نوع تر و خشک متفاوتست و میزان پتاسیم آن بسیار بالا می باشد (۵). عناصر کمیاب در این میوه مغذی چشمگیر و سلنیوم بالای آن در جلوگیری از سرطان و همچنین در عملکرد سیستم ایمنی حائز اهمیت می باشد و فلوراید آن در جلوگیری از پوسیدگی دندان نقش مؤثری دارد. این میوه حاوی درصد بالایی از کربوهیدرات (۸۸-۴۴ درصد)، چربی (۵-۲/۰ درصد)، پروتئین (۶/۵-۲/۳ درصد)، ویتامینها و همچنین درصد بالایی از فیبرهای غذایی ست. خرما دارای ۴ نوع اسید چرب غیر اشباع از جمله شامل: اسید پالمیتیک، اولئیک، لینولئیک و لینولنیک

بعد از دو ماه مدل سازی در آنها صورت گرفته است) شامل دو زیر گروه: الف- تغذیه معمولی، ب- تغذیه با میوه های مورد نظر می باشد.

۳) گروه درمان (موشهایی که مدل سازی شده اند و به طورهمزمان تغذیه با میوه های مورد نظر در رژیم غذایی روزانه شان قرار داده شده است) شامل دو زیر گروه: الف- تغذیه معمولی، ب- تغذیه با میوه های مورد نظر می باشد. گروههای تغذیه ای انار از آب انار یزد که با دست تهیه شده به میزان ۱۰ سی سی در ۹۰ سی سی آب آشامیدنی (برای حجم آبخوری یک قفس ۶ تایی) (11)، گروه میوه انجیر خشک (اصطهبانات) به میزان وزن تقریبی هر عدد ۴ گرم، روزانه ۲ گرم انجیر برای هر موش و خرما خشک زاهدی به میزان وزن تقریبی هر عدد ۶ گرم با هسته، روزانه یک و نیم گرم خرما برای هر موش (۳) در نظر گرفته شده است که همراه غذای روزانه و معمولی حیوان درون قفس آنان قرار داده شده است.

روش تجزیه و تحلیل آماری: در این مطالعه برای مقایسه و سنجش تأثیر آب انار و دو میوه انجیر و خرما جهت بررسی تفاوت افزایش یا کاهش التهاب از روش آماری آنالیز تی تست Paired T-Test استفاده شد. برای مقایسه بین گروههای تغذیه ای با کنترل از روش آنالیز ANOVA و برای بررسی اینکه در هر گروه مطالعه چه تعداد موش درمان شده اند از روش **کای-دو** استفاده شده است.

نتایج

۱- نتایج ایمونولوژیک: الف- گروههای مورد بررسی در

این مطالعه شامل: گروه دست نخورده (Intact): بدون انجام مداخله و دو ماه تغذیه معمولی، گروه کنترل (Colitis): ایجاد کولیت توسط اسید استیک ۳ درصد

گروههای درمان [مدل سازی و آب انار (MP) مدل سازی و میوه خرما (MD) مدل سازی و میوه انجیر (MF)]، در این گروهها ابتدا مدل کولیت حاد ایجاد شد و سپس دو ماه

کولیت حاد با استفاده از اسید استیک بر اساس تکنیکهای مک فرسن و همکاران در سال ۱۹۷۸ (۳۱) و یامادا و همکاران در سال ۱۹۹۱ (۴۸) استفاده شد که بر اساس این طراحی بعد از سه روز باید مدل التهاب حاد در کولون موش صحرایی رخ دهد. جهت القاء کولیت، اسید سی اسید استیک ۴ درصد (PH=2.3) را به آرامی توسط کاتر در ۵ سانتیمتری داخل رکتوم حیوان انفیوز کرده و بعد از ۳۰ ثانیه با ۱/۵ سی سی سرم فیزیولوژی داخل کولون شستشو داده شد. مدل التهابی اسید استیک دارای قیمت ارزان، تجویز آسان و قابل دسترس می باشد و دیگر آنکه کولیت القایی با اسید استیک به علائم پاتولوژیک التهاب حاد روده ای انسان نزدیک تر است. در گروه درمان، همزمان با مدل سازی کولیت حاد در حیوان تغذیه میوه های مورد نظر آغاز می شود. در گروه پیشگیری، بعد از دو ماه رژیم تغذیه ای با میوه های نام برده شده، حیوانات را تلقیح اسیدی نموده و یک هفته بعد حیوانات گروه اخیر یعنی گروه پیشگیری و همچنین گروه درمان را بیهوش نموده و سپس از قلب آنها خون گرفته می شود. بعد از جمع آوری خون، سرم را جدا و سپس جهت بررسی تغییرات دو فاکتورهای التهابی اینترلوکین (IL-6) و تومور نکروزیس آلفا (TNF- α) به روش ELISA با استفاده از دو کیت Rat IL6, Rat TNF- α از شرکت استرالیایی eBioscience اقدام گردید. جهت بررسی بافتی بعد از باز کردن شکم حیوان، دو سانتیمتر از انتهای کولون را به سمت رکتوم جدا کرده و بعد از شستشو برای بررسی پاتولوژیک درون فرمل ۱۰ درصد قرار داده تا بافت فیکس شود.

گروههای مورد مطالعه در این تحقیق شامل: (۱) گروه کنترل با دو زیر گروه: الف- گروه دست نخورده یا نرمال و ب- گروه دیگر کنترلی که فقط موشهای مدل سازی شده اند.

(۲) گروه پیشگیری (موشهایی که دو ماه تغذیه شده اند و

نخورده نزدیک شد ($P = 0.610$). همچنین کاهش همزمان TNF- α در این گروه ($P = 0.067$) می تواند نشانه‌ای برامکان کاهش التهاب در گروه مذکور باشد، که برای اثبات آن نیاز به بررسی دقیق‌تر خواهد بود.

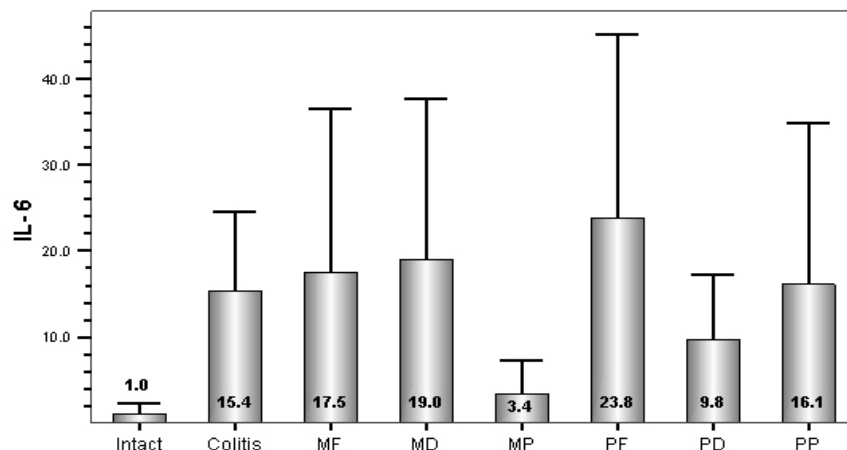
د- مداخلات پیشگیرانه از ابتلا به کولیت حاد: در سه گروه مورد بررسی سه نوع مداخله غذایی مختلف به مدت دو ماه صورت گرفت. سپس بعد از پایان دو ماه، این سه گروه تحت مدل سازی کولیت حاد قرار گرفتند. سطح IL-6 در دو گروه PD و PP (پیشگیری با رژیم خرما و آب انار) نسبت به گروه کنترل کاهش داشت ($P = 0.476$) و ($P = 0.610$)، هرچند هیچ یک از این تغییرات معنی دار نبودند اما نزدیک بودن سطح IL-6 در این دو گروه به گروه دست نخورده می تواند نشانه‌ای از مقاوم شدن این گروهها در برابر مکانیسم التهابی روده باشد. همچنین کاهش معنی دار TNF- α در گروه PD (پیشگیری به همراه رژیم خرما) نسبت به گروه کنترل ($P = 0.010$) و کمتر شدن سطح این عامل التهابی در گروه دست نخورده ($P = 0.038$) نشانه‌ای از تأثیر پیشگیری این رژیم غذایی در ایجاد التهاب حاد روده ای می باشد.

تغذیه آب انار، خرما و انجیر در رژیم غذایی حیوانات منظور شده است.

گروههای پیشگیری شامل: [پیشگیری و آب انار (PP)، پیشگیری و میوه خرما (PD)، پیشگیری و میوه انجیر (PF)]: این گروهها دو ماه تغذیه با آب انار، خرما و انجیر را داشته‌اند و بعد از دو ماه مدل سازی کولیت حاد صورت گرفته است.

ب- ایجاد کولیت حاد یا مدل سازی: یافته‌های این مطالعه نشان می دهد که IL-6 در نتیجه ایجاد کولیت حاد نسبت به گروه دست نخورده افزایش معنی داری داشته است ($P = 0.002$). اما عامل التهابی TNF- α در پی التهاب تفاوت معنی داری با گروه دست نخورده نشان نمی دهد.

ج- مداخلات درمانی کولیت حاد: پس از ایجاد التهاب کولیت حاد، گروههای مورد مطالعه، سه نوع مداخله غذایی مورد نظر را دریافت کردند. در نتیجه این مداخله غذایی تنها در گروه MP (گروه مدل کولیت و آب انار) سطح IL-6 نسبت به گروهی که پس از ایجاد مدل کولیت از غذاهای معمولی استفاده کرده بودند کاهش یافت. اگرچه این کاهش چندان معنی دار نبود ($P = 0.067$)، اما به اندازه‌ای سطح IL-6 در این گروه کاهش یافت که به گروه دست



نمودار ۱- نمایش مقایسه اثر میزان عیار فاکتور التهابی اینتر لوکین ۶ در دو گروه مطالعه درمان و پیشگیری در تغذیه با آب انار و دو میوه خرما و انجیر با گروههای کنترلی کولیت حاد و گروه دست نخورده در موش صحرائی نر.

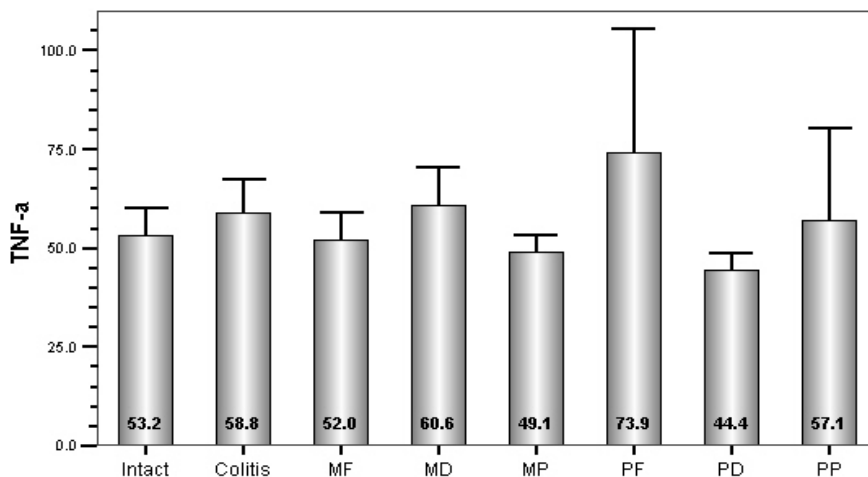
گروههای درمان با رژیم انجیر، خرما و آب انار (MF, MD, MP) گروههای پیشگیری با رژیم انجیر، خرما و آب انار (PF, PD, PP)

جدول ۱- بررسی نتایج حاصل از مقایسه میزان عیارفاکتور التهابی اینترلوکین ۶ در سرم خون دو گروه مطالعه درمان و پیشگیری در تغذیه با آب انار و دو میوه خرما و انجیر با گروههای کنترلی کولیت حاد و گروه دست نخورده موش صحرایی نر.

Group	IL-6						P-value ¹	P-value ²
	N	Median	Q ₁	Q ₃	Mean	SD		
Intact	6	0.4	0.0	2.6	1.00	1.28	---	---
Colitis	6	15.0	6.2	22.8	15.40	9.10	0.002	---
MF	6	9.4	3.6	39.2	17.53	18.99	0.026	0.818
MD	6	16.3	2.6	35.4	19.03	18.74	0.041	0.937
MP	4	3.1	0.0	6.7	3.35	3.89	0.610	0.067
PF	5	23.6	4.4	34.6	23.80	21.46	0.009	0.792
PD	4	10.4	5.0	14.5	9.75	7.48	0.114	0.476
PP	4	11.3	2.2	30.0	16.10	18.81	0.114	0.610

P-value¹: مقایسه با گروه دست نخورده: Comparison with intact group (Mann-Whitney rank test)

P-value²: مقایسه با گروه کولیت یا گروه کنترل: Comparison with Colitis (Mann-Whitney rank test)



نمودار ۲- نمایش مقایسه اثر میزان عیار فاکتور التهابی تومور نکروزیس آلفا در سرم خون دو گروه مطالعه درمان و پیشگیری در تغذیه با آب انار و دو میوه خرما و انجیر با گروههای کنترلی کولیت حاد و گروه دست نخورده در موش صحرایی نر.

توسط دو ماه تغذیه با آب انار نشان داد که آب انار موجب رفع ادم ساب موکوزال و ارتشاح سلولی شده است (شکل ۳C). و در تغذیه با میوه خرما و انجیر عروق دیلاته و ارتشاح سلولی وجود داشت ولی به میزان بسیار کم قابل رؤیت بود و یک عدد فولیکول نیز مشاهده شد (شکل ۳E). در گروه پیشگیری، در تغذیه با آب انار فقط به میزان بسیار کمی ادم ساب موکوزال مشاهده شد (شکل ۳F).

۲- نتایج هیستولوژیک: در مدل سازی کولیت حاد در موش صحرایی موارد هیستوپاتولوژیک زیر قابل رؤیت و گزارش می باشد (شکل ۳): ادم ساب موکوزال همراه با عروق دیلاته و پر خون شدن سلولها در بافت کولون، ارتشاح سلولهای آماسی تک سلولی و همچنین تجمعات سلولهای لنفوییدی که به صورت تشکل فولیکولی می باشد (شکل ۳B). نتایج بافتی حاصل از درمان کولیت حاد

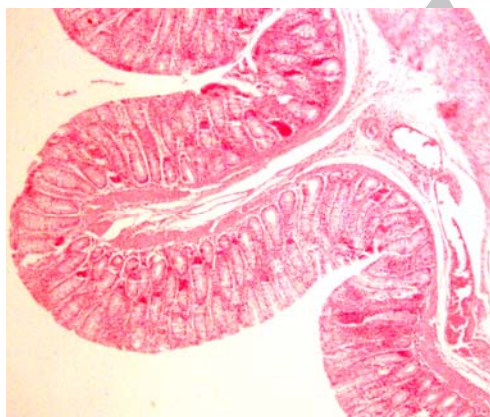
۳). پیشگیری از کولیت حاد توسط تغذیه با میوه خرما کاملاً با عدم وجود آسیبهای بافتی در کولون همراه بوده است (شکل ۳G). در مورد تغذیه پیشگیرانه با انجیر آسیبهای بافتی هر سه مورد ذکر شده در بالا وجود داشت (شکل ۳H).

جدول ۲- بررسی نتایج حاصل از مقایسه میزان عیار فاکتورالتهابی تومور نکروزیس آلفا در سرم خون دو گروه مطالعه درمان و پیشگیری در تغذیه با آب انار و دو میوه خرما و انجیر با گروههای کنترلی کولیت حاد و گروه دست نخورده موش صحرایی نر.

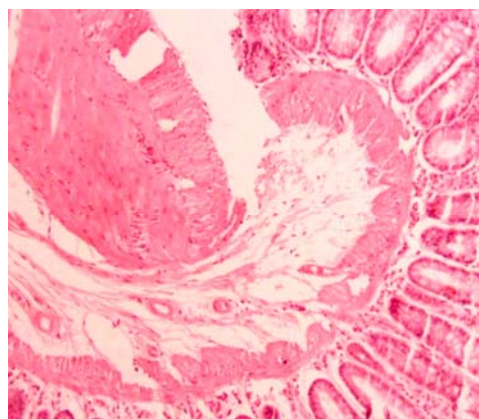
Group	TNF-alpha						P-value ¹	P-value ²
	N	Median	Q ₁	Q ₃	Mean	SD		
Intact	6	51.5	48.8	55.0	53.17	7.01	---	---
Colitis	6	56.9	52.0	64.0	58.77	8.66	0.240	---
MF	6	50.0	49.2	50.4	52.03	6.98	0.818	0.093
MD	6	56.1	53.0	69.8	60.63	9.97	0.132	0.699
MP	4	49.5	45.7	52.5	49.10	4.09	0.352	0.067
PF	5	57.6	52.6	84.8	73.92	31.54	0.177	0.662
PD	4	45.3	41.3	47.5	44.40	4.51	0.038	0.010
PP	4	50.0	43.1	71.0	57.05	23.29	0.762	0.352

P-value¹: Comparison with intact group (Mann-Whitney rank test)

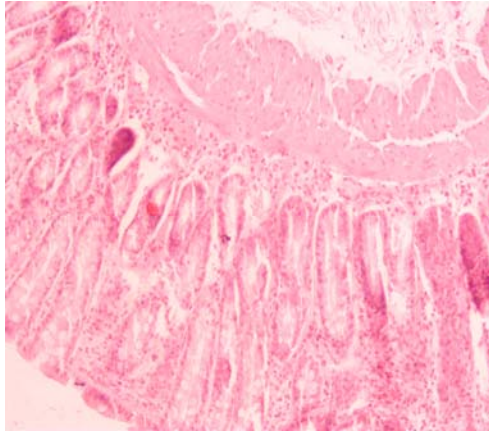
P-value²: Comparison with Colitis (Control) group (Mann-Whitney rank test)



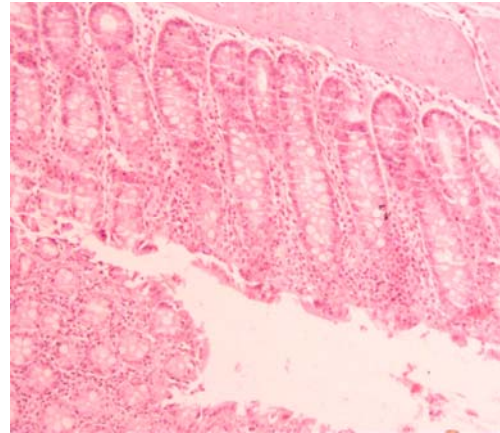
A



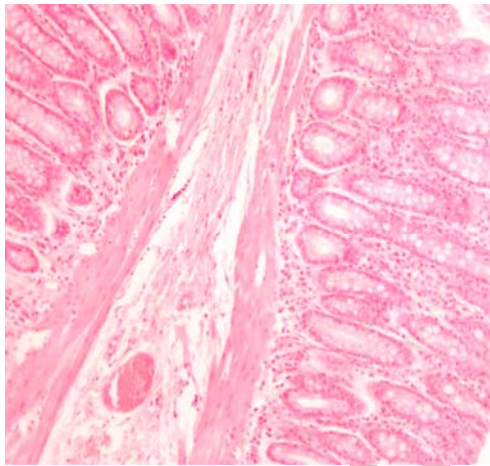
B



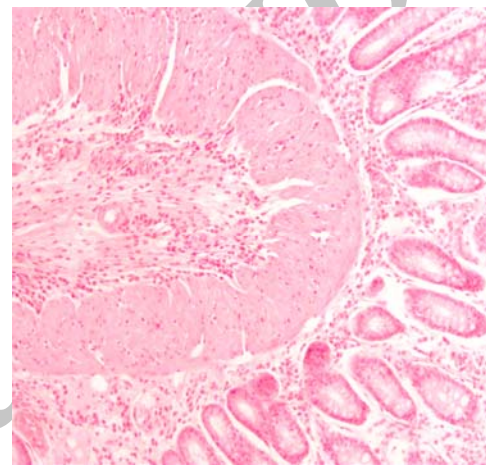
C



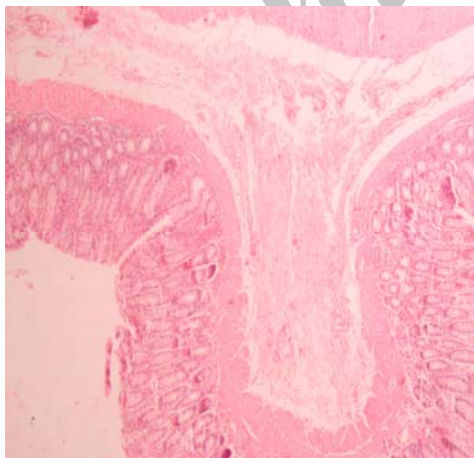
D



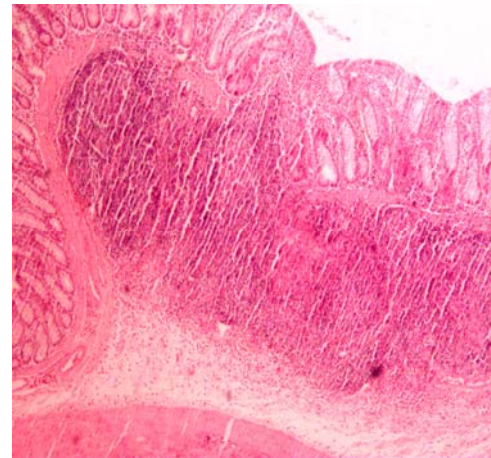
E



F



G



H

شکل ۳- یافته‌های هیستوپاتولوژیک در مقاطع بافتی از کولون موش صحرایی: **A**- شاهد یا بافت نرمال، **B**- بافت کولون مدل سازی شده (کولیت حاد)، گروه درمان: **C**- بافت کولون مبتلا به کولیت حاد و تغذیه با آب انار، **D**- بافت کولون مبتلا به کولیت حاد و تغذیه با میوه خرما، **E**- بافت کولون مبتلا به کولیت حاد و تغذیه با میوه انجیر، **F**- تغذیه با آب انار، **G**- تغذیه با میوه خرما، **H**- تغذیه با میوه انجیر

بحث

این تحقیق برای اولین بار نشان داد که مصرف روزانه میوه خرما در پیشگیری بیماری التهابی حاد روده IBD (Inflammatory bowel diseases) مؤثر است. با توجه به اینکه اتیولوژی این بیماری همچنان ناشناخته است لذا می‌طلبند که تحقیقات در این جهت به طور هدفمند پیش رود. دو فرضیه بزرگ در این اتیولوژی ناشناخته وجود دارد که ارتباط بین میکروفلورای روده و پاتوژنیز IBD را مشروح می‌سازد. اولین فرضیه آنکه IBD موجب پاسخهای ایمنولوژیک غیرطبیعی نسبت به میکرو فلورای طبیعی روده می‌گردد. در این حالت، اختلالات سیستمهای ایمنی داخل مخاطی موجب پاسخهای ایمنی مفرط و التهاب روده می‌شود. فرضیه دوم عبارت است از IBD که موجب تغییرات غیر طبیعی در ساختار میکروفلورای روده می‌گردد. در حالت اخیر تغییرات در ترکیب میکروفلورای روده به پاسخهای آسیب شناسی می‌انجامد و سبب التهاب لایه موکوزال در روده می‌گردد. یافته های مولکولی به دست آمده از بررسی تغییرات در باکتریای روده ای غیرقابل کشت در بیماران با IBD، بیشتر پشتیبان فرضیه اخیر است (17). التهاب حاد یا فیزیولوژیک یک پاسخ مفید میزبان به آسیب بافتی است، اما اگر تأخیر زمانی در رفع آن به وجود آید، ممکن است به بیماریهای وابسته به سیستم ایمنی منجر شود. در دهه گذشته به کارگیری عصاره میوه انار در درمان بیماری التهابی آرتریت روماتوئید (۱۰، ۴۲ و ۴۳) بیماری التهابی روده و همچنین در سرطان (۱۰ و ۴۲) مفید و توصیه شده است. التهاب مزمن می‌تواند توسط یکسری تغییرات زودرس به پیشرفت سرطان بیانجامد که از طریق جذب مدياتورهای محلول پیش التهابی مثل، فاکتور تومور نکروزیس الفا، اینترلوکین های ۶، NF κB و لیبیدهای بیواکتیو مشابه ایکوزانوئیدها صورت می‌گیرد (28). فاکتورهای فعال نسخه برداری (NF κB) یک فامیل از

فاکتور نسخه برداری است که تاکنون پنج عضو آن شناسایی شده است. فاکتورهای فعال نسخه برداری در بیان بعضی سایتوکینین ها و عوامل تنظیم کننده در پاسخهای سیستم ایمنی دخالت تام داشته و در پاسخ به سیگنالها یا پیام های مربوط به رشد، تفکیک، مرگ سلولی و دیگر موارد فعال می‌شود. همچنین در این روند لیبیدهای بیواکتیو مشابه ایکوزانوئیدها، برای مثال پروستاگلاندین E2 و فرآورده های مشتق شده از لیپواکسیژناز را می‌توان نام برد (30). توضیح این مکانیسم های پیچیده التهابی حاد و مزمن استراتژیهای پیشگیرانه و درمانی جدیدی را در مورد بیماریهای التهابی پیشنهاد می‌نماید. مطالعات اپیدمیولوژیک دهه گذشته نشان می‌دهد که مصرف فرآورده های غنی شده از مواد شیمیایی گیاهی (فیتوکمیکال) در رژیم غذایی انسان، شامل میوه و سبزیجات می‌تواند خطر ابتلا به سرطان را کاهش دهد (12). انار، خرما و انجیر (منتخب از میوه های ذکر شده در کتب مقدس) منابع قوی و سرشار از مواد با فعالیتها ضد التهابی اند که در این استراتژی می‌توانند کاربرد مفیدی داشته باشند. میوه های تر، خشک، عصاره و فرآورده های غذایی این میوه ها محتوی سطوح بالایی از این مواد شیمیایی گیاهی است. خواص آنتی اکسیدان، آنتی کارسینوژن و ضد التهابی انار سبب شده که در درمان و پیشگیری سرطان، بیماریهای قلبی عروقی، دیابت، اختلالات نعوظ، عفونتهای باکتریایی، مقاومتها آنتی بیوتیکی و همچنین در آسیب پوستی ناشی از اشعه ماوراء بنفش مفید شناخته شود (22). دو خاصیت آنتی اکسیدان و آترواسکلروتیک انار به علت وجود پلی فنلهای فراوان در آن است که شامل: الاژیک اسید در دو فرم آزاد و پیوند شده با گلیکوزیدها، گالوتانینس و آنتوسیانین ها (cyanidin, delphinidin and pelargonidin glycosides) و فلاونوئیدهای دیگر (quercetin, kaempferol and luteolin glycosides) (۹، ۱۳، ۱۴، ۲۰، ۲۳ و ۲۴) است. پلی فنل پونی کالائین بوفور در آب انار وجود دارد که

ارتشاح سلولهای آماسی تک هسته ای متوقف و سلولها نرمال گزارش شده اند که از این نظر مطالعه لاروزا و همکاران در سال ۲۰۱۰ را تأیید می نماید. در این مطالعه آنها نشان دادند که آب انار و متابولیت حاصل از آن (Urolithin-A (UROA هر دو سبب کاهش التهاب در مدل کولیت حاد در موش صحرایی می شوند (۳۳). همین پاسخ بهبودی بافتی نیز در اثر پیشگیرانه آب انار در مدل کولیت حاد یافت می شود، به طوری که نتایج به ویژه داده هیستولوژیک یا بافتی حاکی از سلامت کولون و عدم مدل سازی بعد از دو ماه مصرف آب انار است، به طوری که ادم ساب موکوزال بسیار کم و ارتشاح سلولی و فولیکول لنفاوی وجود ندارد. رژیم روزانه میوه خرما در این مدل سازی فقط در پیشگیری مؤثر بود، به طوری که ادم ساب موکوزال، ارتشاح سلولهای آماسی تک هسته ای و فولیکول لنفاوی که در مدل کولیت حاد از علائم آسیب بافتی بود هیچ کدام دیده نشد و از نظر میزان سایتوکینین ها سبب کاهش معنی دار فاکتور تومور نکروزیس آلفا نسبت به گروه شاهد شد ($P < 0.01$) و توانست از مدل سازی جلوگیری نماید. مصرف خرما در درمان کولیت حاد پاسخ معنی داری نشان نداد که تقریباً شبیه به پاسخ میوه انجیر بود. میوه انجیر نه در درمان تأثیری نشان داد و نه در پیشگیری که از این نظر تحقیق بیشتری را می طلبد.

پنجاه درصد خاصیت آنتی اکسیدانی آن به این پلی فنل نسبت داده می شود (۲۰). خاصیت ضد سرطان آب انار به اسید الازیک به عنوان عامل باز دارنده در سیکل یا چرخه سلولی و مرگ سلولی (آپوپتوزیس) که موجب مهار و رشد تومور می شود، نسبت داده می شود (۳۱). تانینهای تغلیظ شده و محلول در آب دارای خاصیت ضد سرطان (در دو محیط *invitro and invivo*) می باشند (۲۰). خاصیت آنتی پرولیفراتیو (تکثیر سلولی) آب انار می تواند ۱۰۰-۳۰ درصد مهار کننده این فعالیت سلولی در سرطان کولون باشد (۳۷). در این تحقیق اثر پیشگیرانه و درمان آب انار و دو میوه خرما و انجیر در رژیم غذایی روزانه در مدل کولیت حاد موش صحرایی با دو عامل اینتر لوکین ۶ و فاکتور تومور نکروزیس به عنوان متغیر پرداخته شد. نتایج هیستولوژیک و ایمونولوژیک در این مدل سازی نشان می دهد که IL-6 در نتیجه ایجاد کولیت حاد نسبت به گروه دست نخورده افزایش معنی داری داشته است ($P = 0.002$) و حال آنکه عامل التهابی $TNF-\alpha$ در پی التهاب کولون تفاوت معنی داری با گروه دست نخورده نشان نمی دهد. در به کارگیری رژیم روزانه آب انار به مدت دو ماه فقط در یافته هیستولوژیک در درمان مدل کولیت التهابی مؤثر بود. میزان اینتر لوکین ۶ کاهش نشان داد ولی در حد معنی دار نبود ولی در یافته هیستو پاتولوژیک یا آسیب شناسی بافتی علائم ادم ساب موکوزال کاهش داشت و

منابع

- ۱- نفیسی الف، ۱۳۶۹، خواص خوردنی ها و آشامیدنی ها طی قرون و اعصار در بین ملل مختلف جهان. دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، صفحه: ۱۷۳
- ۲- شرفکندی ع، ۱۳۷۰، قانون در طب (ابوعلی سینا)، ترجمه انتشارات سروش، تهران، صفحه ۳۷۶۲۲.
- ۳- فریده ظفری زنگنه، لیلا معزی، اشرف امیرزرگر، ۱۳۸۸، تأثیر رژیم غذایی حاوی میوه های خرما، انجیر و زیتون بر وزن، آستانه درد و حافظه موش سفید آزمایشگاهی. فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، جلد ۲۵، شماره ۲، صفحه ۱۵۸-۱۴۹.
- 4-Agabeili R.A, Kasimova T.E, Alekperov U.K, Antimutagenic activity of plant extracts from *Armoracia rusticana*, *Ficus carica* and *Zea mays* and peroxidase in eukaryotic cells, *Tsitol Genetic Journal*; 38: 40-45.
- 5- Ali-Mohamed A.Y. and Khamis A.S, 2004, Mineral ion content of the seeds of six cultivars of Bahraini date palm (*Phoenix dactylifera*). *Journal of Agriculture Food Chemistry*; 52: 6522-6525.

- 6- Al-Shahib W, Marshall R.j, 2003, The fruit of the date palm: it's possible use as the best food for the future? *International Journal of Food Science Neutral*; 54: 247-259.
- 7- Amakura Y, Okada M, Tsuji S, Tonogai Y, 2000, Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. *J Chromatogr A*; 891:183-188.
- 8- Artik N, Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by using HPLC, 1998, *Fruit Processing*; 8: 492-499.
- 9- Aviram M, Dornfield L, Rosenblatt M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R. et al, 2000, 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*; 71: 1062-1076.
- 10- Balkwill F, Charles KA, Mantovani A, 2005, Smoldering inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cel*; 7: 211-217.
- 11- Begoña Cerdá, José J. Cerón Francisco A. Tomás-Barberán, and Juan Carlos Espín. Repeated Oral Administration of High Doses of the Pomegranate Ellagitannin Punicalagin to Rats for 37 Days Is Not Toxic. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 3493-3501.
- 12- Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* .1992; 18: 1-29.
- 13- Cerda B, Ceron jj, Tomas-Barberan FA, Espin jc, 2003, Repeated oral administration of high doses of pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic, *J. Agric. Food Chem*; 51: 3493-3501.
- 14- Cerda B, Llorach R, Ceron JJ, Espin jc, Tomas-Barberan FA, 2003, Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice, *Eur. J. Nutr*; 42: 8-28.
- 15- Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK, Singh RP, 2002, Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models, *J Agric Food Chem*; 50: 4791-4795.
- 16- Du CT, Wang PL, Francis FJ, 1975, Anthocyanins of pomegranate, *Punica granatum*. *J Food Sci*; 40: 417-418.
- 17- Endo K, Shiga H, Kinouchi Y, Shimosegawa T, Rinsho Byori, 2009, Inflammatory bowel disease: *IBD*; 57: 527-32.
- 18- Esmailzadeh A, Tahbaz F, Gaieni I, et al, 2006, Cholesterol-lowering effect of concentrated pomegranate juice consumption in type II diabetic patients with hyperlipidemia, *Int J Vitam Nutr Res*; 76: 147-151.
- 19- Fazeli MR, Bahmani S, Jamalifar H, Samadi N, 2011, Effect of probiotic on antioxidant and antibacterial activities of pomegranate juices from sour and sweet cultivars, *Nat Prod Res*; 25: 288-97.
- 20- Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA, 2000, Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem*; 48: 4581-4589.
- 21- <http://www.nutritiondata.com/facts-C00001-01c20Ws.html>. Nutrition data for pomegranate. [Accessed January 10, 2008]
- 22- Jurenka J, 2008, Therapeutic Applications of Pomegranate (*Punica granatum L.*), *Alternative Medicine Review*; 13: 128-144.
- 23- Kaplan M, Hayek T, Raz A, Coleman R, Dornfield L, Vayan J., et al, 2001, Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis, *J. Nutr*; 131: 2082-2089.
- 24- Kim ND, Mehta R, Yu W, Neeman I, Livney T, Amichay A, et al, 2002, Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer, *Breast Cancer Res. Treat*; 71: 203-217.
- 25- Liang Y, Zhou Y, Shen P, 2004, NF-kappaB and its regulation on the immune system. *Cell Mol Immunol*; 1: 343-50.
- 26- Lansky EP, Jiang W, Mo H, et al, 2005, Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. *Invest New Drugs*; 23: 11-20.
- 27- Lansky EP, Harrison G, Froom P, Jiang WG, 2005, Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel, *Invest New Drugs*; 23: 121-122.
- 28- Lansky EP, Newman RA, 2007, *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer, *J Ethnopharmacol*; 109: 177-206.

- 29- Larrosa M, González-Sarrías A, Yáñez-Gascón MJ, Selma VM, Azorín-Ortuño M, Toti S, Tomás-Barberán F, Dolara P, Carlos Espín J, 2010, Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *The Journal of Nutritional Biochemistry*; 21: 717-725.
- 30- Liang Y, Zhou Y, Shen P. NF-kappaB and its regulation on the immune system. *Cell Mol Immunol*. 2004 ; 1: 343-50.
- 31- MacPherson BR, Pfeiffer CJ, 1978, Experimental production of diffuse colitis in rats, *Digestion*; 17: 135-50.
- 32- Mattiello T, Trifirò E, Jotti GS, Pulcinelli FM. Effects of pomegranate juice and extract polyphenols on platelet function. *J Med Food*. 2009; 12: 334-9.
- 33- Mertens-Talcott SU, Talcott ST, Percival SS. Low concentrations of quercetin and ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis in MOLT-4 human leukemia cells. *J. Nutr.* 2003; 133: 2669–2674.
- 34- Mertens-Talcott SU, Bomser JA, Romero C, et al. Ellagic acid potentiates the effect of quercetin on p21waf1/cip1, p53, and MAP-kinases without affecting intracellular generation of reactive oxygen species in vitro. *J Nutr.* 2005; 135: 609-614.
- 35- Mertens-Talcott SU, Percival SS. Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer Lett.* 2005; 218: 141-151.
- 36- Mertens-Talcott SU, Jilma-Stohlawetz P, Rios J, et al. Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum L.*) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. *J Agric Food Chem.* 2006; 54: 8956-8961.
- 37- Pai MB, Prashant GM, Murlikrishna KS, Shivakumar KM, Chandu GN, 2010, Antifungal efficacy of *Punica granatum*, *Acacia nilotica*, *Cuminum cyminum* and *Foeniculum vulgare* on *Candida albicans*: an in vitro study, *Indian J Dent Res*; 21: 334-6.
- 38- Parker R.S, Swanson J.E, 2002, Bioavailability and vitamin A value of carotenes from red palm oil assessed by an extrinsic isotope reference method. *Asia Practice Journal Clinical Nutrition*; 11: 438-442.
- 39- Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, Heber D, 2005, 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, *Nutr Biochem*; 16: 360-7.
- 40- Seeram NP, Henning SM, Zhang Y, et al, 2006, Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours, *J Nutr*; 136: 2481-2485.
- 41- Serraclara A, Hawkins F, Perez C, Dominguez E, Campillo J.E, Torres M.D, 1998, Hypoglycemic action of an oral fig-leaf decoction in type-I diabetic patients. *Diabetes Research Clinical Practice*; 39: 19-22.
- 42- Shukla M, Gupta K, Rasheed Z, Khan KA, Haqqi TM, 2008, Consumption of hydrolyzable tannins-rich pomegranate extract suppresses inflammation and joint damage in rheumatoid arthritis, *Nutrition*; 24(7-8):733-43.
- 43- Simmons DL, Buckley CD, 2005, Some new, and not so new, anti-inflammatory targets, *Current Opinion in Pharmacology*; 5: 394–397.
- 44- Stover E, Mercure E.W, The pomegranate: a new look at the fruit of paradise, 2007, *Hort Science*; 42: 1088–92.
- 45- Vinson J.A., Zubik L., Bose P., Samman N., Proch J. Dried fruits: excellent in vivo antioxidants, *J Am Coll Nutr*, 2005; 24: 44-50.
- 46- Waheed S, Siddique N, Rahman A, et al, INAA for dietary assessment of essential and other trace elements in 14 fruits harvested and consumed in Pakistan, *J Radioanalytical Nucl Chem*, 2004; 260: 523-531.
- 47- Willett W.C., Sacks F., Trichopoulou A., Drescher G., Ferro-Luzzi A., Helsing E. and Trichopoulos D. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1995; 61: 1402-1406.
- 48- Yamada T, Zimmerman BJ, Specian RD, Grisham MB. Role of neutrophils in acetic acid-induced colitis in rats. *Inflammation*. 1991; 15: 399-411.

Immunomodulatory effects of pomegranate juice, Date palm and fig fruits on prevention and treatment of experimental acute colitis model in male rat

Zangeneh Z. F.¹, Abdollahi A.R.², Naghizadeh M.M.³ and Aminee F.⁴

¹ Vali-e-Asr, Reproductive Health Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Research Institute for Islamic and Complementary Medicine (RICM), Tehran, I.R. of Iran.

² Vali-e-Asr Hospital, Pathology Laboratory, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R. of Iran

³ Veterinary Faculty, Tehran University, Tehran, I.R. of Iran

⁴ Central Biostatistics, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, I.R. of Iran

Abstract

Inflammatory bowel diseases (IBD) are the one of the most common alimentary diseases. Etiology and pathogenesis of IBD remain obscure. There is substantial evidence that proinflammatory cytokines such as Interleukin-6 (IL-6) and Tumour Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha) exhibit a key role in the inflammatory process. In the last decade investigations were done on treatment and pretreatment effects of some modulators and inhibitors of these mediators which emphasize different aspects of experimental colitis models mimicking IBD in human. The aim of this study is investigation of therapeutic and prophylactic effects of pomegranate, fig and date in daily regimen in experimental acute colitis model on rat. The results of this study show that pomegranate juice induces both therapeutic and prophylactic effects and date has only therapeutic effect on colitis.

Keywords: Inflammatory bowel disease (IBD), Interleukin-6, Tumour Necrosis Factor-alpha.