Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:26 +0430 on Wednesday July 4th 2018

ORIGINAL ARTICLE

Effect of Hydroalcoholic Extract of Saffron on the Functions of Rat Peritoneal Macrophages

Narges Damya[1],
Shiva Khezri[2],
Meysam Abtahi Froushani[3]

[1] MSc in Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

(Received March 13, 2017 ; Accepted October 16, 2017)

Abstract

Background and purpose: Saffron (*Crocus sativus*) is a medicinal plant with anti-inflammatory effects. Macrophages are major cells that participate in inflammatory and immunity responses. The present study was performed to investigate the immunomodulatory effects of hydro-alcoholic extract of Saffron on rat peritoneal macrophages.

Materials and methods: This experimental study was conducted in two groups of male rats; an experimental and a control group. The animals in treatment group received hydro-alcoholic extract of Saffron for 4 constitutive weeks (400 mg/kg- daily, orally). The control rats received the same volume of distilled water. At the end of the study, macrophages were isolated from peritoneal cavity of rats and challenged with opsonized yeast. Then, the macrophages were evaluated for the rate of respiratory burst, nitric oxide production, and cytokine production using nitro-blue tetrazolium reduction assay, Griess test, and ELISA, respectively.

Results: The results of stimulation of macrophages showed a significant decrease in respiratory burst ($P<0.001$) and nitric oxide production ($P<0.01$) in macrophages isolated from treatment groups compared to that in control rats. Nevertheless, the results of phagocytosis assay and vitality did not show any significant differences between macrophages in controls and treatment group. Moreover, Saffron caused a significant increase in production of anti-inflammatory IL-10 by macrophages isolated from treatment group ($P<0.01$). The level of pro-inflammatory IL-12 did not alter significantly. But, the IL-12 to IL-10 ratio decreased significantly ($P<0.01$).

Conclusion: It seems that Saffron is a natural source to intervene the damages caused by inflammatory macrophages in immunopathological conditions.

Keywords: Saffron, Crocus sativus, macrophage, cytokine, rat

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28(159): 14-22 (Persian).

Archive of SID
www.SID.ir

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۵۹ فروردین سال ۱۳۹۷ (۲۲-۱۴)

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:26 +0430 on Wednesday July 4th 2018

اثر عصاره هیدروالکلی زعفران بر فعالیت های ماکروفاژهای صفاقی رت

نرگس دمیا[1]
شیوا خضری[2]
میثم ابطحی فروشانی[3]

چکیده

سابقه و هدف: گیاه زعفران (*Crocus sativus*) یکی از انواع گیاهان دارویی با اثرات ضد التهابی است. ماکروفاژها نیز از سلول‌های مهم درگیر در پاسخ‌های التهابی و ایمنی هستند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات تعدیل‌کنندگی عصاره هیدروالکلی زعفران بر پاسخ ماکروفاژهای صفاقی در رت می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی، جامعه مورد مطالعه شامل دو گروه شاهد و تیمار می‌باشد. رت‌های گروه تیمار به مدت یک ماه عصاره هیدروالکلی زعفران (۴۰۰mg/Kg- روزانه- خوراکی) را دریافت کردند. گروه شاهد نرمال سالین را در همان حجم دریافت نمودند. در انتهای مطالعه سلول‌های ماکروفاژ از ناحیه صفاق رت‌ها جدا شد و پس از چالش با مخمر اپسونیزه شدت انفجار تنفسی به شیوه احیای نیتروبلو تترازولیوم، تولید نیتریک اکساید به شیوه گریس و میزان تولید سایتوکاینها به کمک الایزا در آنها سنجیده شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از تحریک ماکروفاژها نشان دهنده کاهش معنی‌دار قابلیت انفجار تنفسی ($p<۰/۰۰۱$) و اکسیدنیتریک تولید شده ($p<۰/۰۱$) در سلول‌های ماکروفاژ استحصال شده از موش‌های تحت تیمار در مقایسه با گروه شاهد بود. با این وجود شدت فاگوسیتوز و زیستایی ماکروفاژهای گروه تیمار نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداد. همچنین زعفران موجب افزایش تولید سایتوکاین ضدالتهابی IL-10 توسط ماکروفاژهای گروه تیمار شد($p<۰/۰۱$). سطح تولید سایتوکاین التهابی IL-12 تغییر معنی‌داری نیافت. هرچند که نسبت IL-12 به IL-10 کاهش معنی‌دار یافت($p<۰/۰۱$).

استنتاج: به نظر می رسدکه زعفران یک منبع طبیعی برای تعدیل آسیب‌های ناشی از ماکروفاژهای التهابی در شرایط ایموپاتولوژیک باشد.

واژه های کلیدی: زعفران(*Crocus sativus*)، ماکروفاژ، سیتوکین، رت

مقدمه

سلول‌های ماکروفاژ نقش مهمی در آغاز و گسترش پاسخ‌های ایمنی ذاتی و همچنین شکل‌دهی به عملکرد سیستم ایمنی اکتسابی بازی می‌کنند. هم‌چنین این سلول‌ها نقش مهمی در حفظ هموستاز و ترمیم بافتی از

مولف مسئول: شیوا خضری- ارومیه: دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم E-mail:sh.khezri@urmia.ac.ir
۱. کارشناس ارشد زیست شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۱۲/۲۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۶/۳/۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۷/۲۴

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:26 +0430 on Wednesday July 4th 2018

طریق برداشت بقایای سلولی و پاکسازی سلول‌های آپوپتوتیک دارند(۱). ماکروفاژها تقریبا با همان سرعتی که نوتروفیل‌ها به میکروب پاسخ می‌دهند، عمل می‌کنند ولی طول عمر آن‌ها در جایگاه‌های التهاب بسیار بیش‌تر از نوتروفیلها است. بنابرین ماکروفاژها سلول‌های اجرایی اصلی در مراحل انتهایی پاسخ ایمنی ذاتی(چند روز پس از شروع عفونت) محسوب می‌شوند. نشان داده شده است که این سلول‌ها در محل التهاب تقسیم سلولی انجام دهند و بسته به ریز محیط اطرافی نقشهای متنوعی را بپذیرند. در بسیاری از بیماری‌های خودالتهابی و خودایمنی عملکرد نامناسب ماکروفاژها از جمله عوامل موثر در پیشبرد بیماری است(۲). در بین منابع مختلف ماکروفاژ موجود در بدن، استحصال ماکروفاژهای صفاقی در رت نسبت به سایر بافت‌ها جهت انجام مطالعات علمی آسان‌تر و کم هزینه‌تر می‌باشد(۲).

گیاهان دارویی منابع مهمی از مواد با اثر درمانی بالقوه مفید هستند(۴،۳). زعفران یک گیاه دارویی از خانواده زنبقیان که به گل سلامتی و طلای سرخ معروف است(۶،۵). بر اساس یافته‌های طب سنتی و مدرن، برای درمان اختلالات سیستم عصبی، تنفسی،دستگاه گوارش و سیستم ادراری به کار می‌رود(۵). اثرات درمانی زعفران به مواد تشکیل دهنده اصلی مانند کروسین، کروستین، پیکروکروسین، و سافرانال مرتبط باشد. ترکیب‌هایی شیمیایی عصاره‌ی این فراورده درخانواده‌ی کاروتنوییدها جای دارندو جزء پاداکسنده‌های قوی هستند(۷).

کنترل التهاب یک موضوع اصلی تحقیقات زیست پزشکی است. زیرا التهاب نقش عمده‌ای در پاتوژنز اختلالات مختلف از جمله آلرژی، آسم، بیماری‌های قلبی و عروقی و همچنین بسیاری از بیماری‌های خود ایمن و اختلالات مرتبط با پیوند بافت بازی می‌کند(۸). با وجودی که داروهای ضدالتهاب متعددی امروزه در دسترس می‌باشند، ولی بسیاری از آن‌ها دارای اثرات جانبی متعدد بوده که استفاده کارآمد از آن‌ها را محدود می‌کند. بر این اساس امروزه یافتن یک عامل طبیعی با قابلیت سرکوب التهاب، هدف بسیاری از مطالعات می‌باشد(۹). در مطالعات پیشین اثر زعفران را بر روی تابلوی خونی، مشابه عامل ضدالتهاب بسیار قوی دگزامتازون گزارش کرده‌اند(۵). هم‌چنین نشان داده شده است که کاروتنوئیدهای موجود در زعفران موجب تعدیل واکنش‌های دستگاه ایمنی می‌شوند(۱۰). عصاره آب و اتانول گلبرگ و کلاله زعفران اثرات ضد درد و هم‌چنین خاصیت ضدالتهابی قابل توجهی در موارد التهاب حاد و یا مزمن از خود نشان داده است(۱۱). با وجود مطالعات متعددی که در مورد اثرات بیولوژیک زعفران صورت گرفته است ولی به نظر نمی‌رسد که اطلاعات چندانی در مورد اثرات تجویز طولانی مدت این گیاه بر عملکرد ماکروفاژها به عنوان یکی از بازوهای سیستم ایمنی بدن در دسترس باشد. مطالعه حاضر به بررسی اثرات احتمالی تعدیل‌کنندگی عصاره هیدروالکلی زعفران بر پاسخ‌های ماکروفاژهای صفاقی رت‌های ویستاردر مواردی از قبیل شدت انفجار تنفسی، تولید نیتریک اکساید و وضعیت تولید سایتوکان‌های پلاریزه کننده پاسخ‌های ایمنی از قبیل IL-12 و IL-10 پرداخته است.

مواد و روش ها

در این پژوهش تجربی، جامعه مورد مطالعه شامل ۱۶ رت ماده در محدوده وزنی ۸۰ تا ۱۰۰ گرم بود که در دو گروه مساوی شاهد و تیمار قرار گرفتند. گروه تیمار عصاره را با دوز ۴۰۰ میلی گرم در کیلوگرم و گروه شاهد به طور هم حجم آنرمال سالین به مدت یک ماه از طریق گاواژ دریافت کردند. کلیه مراحل این پژوهش مورد تصویب شورای پژوهش دانشکده علوم دانشگاه ارومیه با کد /2461تد.ت قرار گرفت.

کلاله زعفران (*Crocus sativus*) از سطح بازار و از یک مارک مشخص تهیه شد و به تایید کارشناس هرباریوم دانشکده علوم دانشگاه ارومیه (شماره ۷۱۸۱) رسید. سپس، ۱۴ گرم کلاله زعفران را آسیاب کرده و با ۵۰۰ سی‌سی حلال (آب و اتانول به نسبت حجمی ۵۰ به

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:26 +0430 on Wednesday July 4th 2018

۵۰) مخلوط شد و در انکوباتور شیکر دار به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس با استفاده از پمپ خلا عصاره صاف شد و توسط دستگاه روتاری تغلیظ شد. عصاره تغلیظ شده توسط دسیکاتور خشک گردید. بازده عصاره در حد ۴۵ درصد وزنی بود(۱۲). عصاره خشک شده در نرمال سالین حل شد.

به منظور جداسازی ماکروفاژهای صفاقی ،پس از بی حسی نخاعی رت‌ها، با تزریق بافر فسفات استریل سرد به داخل حفره شکمی و ماساژ آهسته به منظور رهایش سلول‌ها، مایع تزریق شده به کمک پیپت پلاستیکی از صفاق موش مکیده شد. مایع سلولی در لوله آزمایش سه بار با بافر فسفات شستشو داده شدند. پس از شمارش سلول‌ها، سوسپانسیون سلولیبا تراکم ۱×۱۰^{۶}cell/ml تهیه و به پلیت۹۶ خانه اضافه و به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. مایع رویی خارج وچاهک‌ها سه بار با بافرفسفات شسته شدند،تا سلول‌های غیرچسبنده حذف شوند. سلول‌های که به کف فلاسک چسبیده باقی می‌مانند عمدتا ماکروفاژ خواهند بود(۱۴،۱۳).

در ادامه از آزمون ارزیابی زیستایی (Vitality) سلول‌های ماکروفاژ به عنوان شاخصی جهت ارزیابی قدرت حیاتی و فعالیت متابولیک این سلول‌ها استفاده شد. در این تست محلول MTT (شرکت Sigma–آمریکا) به چاهک‌های حاوی ماکروفاژ افزوده شد و بعد از انکوباسیون به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد، با افزودنDMSOودر طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت شد(۱۴).

به منظور ارزیابی دقیق‌تر عملکرد ماکروفاژها اقدام به سنجش عملکرد فاگوسیتوز و کشتار ماکروفاژها شد. در این ارزیابی لوله‌های (T) شامل سوسپانسیون‌های ماکروفاژدر بافر HBSS با سرم رت و لوله‌های (C) شامل بافر HBSS با سرم رت فاقد ماکروفاژ به مدت ۵ دقیقه انکوبه شدند. سپس مخمر ساکارومایسس سرویسیه به هر دو گروه اضافه گردید. در زمان صفر از هر دو لوله (C_0وT_0) نمونه‌برداری شد. بعد از انکوباسیون به مدت ۹۰ دقیقه، نیز نمونه‌برداری از هر دو لوله (T_{90} و C_{90}) صورت گرفت. در مرحله بعد به منظور لیز ماکروفاژها، نمونه‌های برداشته شده از لوله T (زمان‌های صفر و ۹۰ دقیقه) با آب مقطر استریل تیمار شدند. سپس نمونه‌ها را به پلیت ۹۶ خانه ریخته و انکوباسیون به مدت چهار ساعت انجام شد. در نهایت با افزودن محلول MTT وDMSO در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت شد. بعلاوه لوله‌های T بعد از ۹۰ دقیقه انکوباسیون (T_{90}) سانتریفیوژ شدند و مخمرهای خارج سلولی[1] (EC) فاگوسیت نشده جدا شدند. سپس از مایع رویی نمونه‌ها به پلیت ۹۶ خانه ریخته و با افزودن MTT و DMSO، نتیجه در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت شدند. درصد فاگوسیتور از این رابطه حساب شد(۱۶،۱۵).

$$PHAGOCYTOSIS\% = ODT0 - 100 \times \frac{EC/Bg}{ODT0}$$

$$Bg(bacterial\ growth) = \frac{ODC90}{ODC0}$$

در ادامه روند کار قابلیت‌های انفجار تنفسی و تولید نیتریک اکساید پس از برداشت مخمر اپسونیزه در ماکروفاژها ارزیابی شد. به طور خلاصه به منظور سنجش قابلیت انفجار تنفسی، ماکروفاژهای موجود در پلیت ۹۶ خانه به مدت نیم ساعت در حضور مخمر اپسونیزه و محلول نیتروبلوتترازولیوم(NBT) انکوبه وسانتریفیوژ گردید. پس از حذف مایع رویی با اضافه شدن KOH وDMSO نتیجه در طول موج ۴۹۰نانومتر قرائت گردید(۱۴).

جهت سنجش قابلیت تولید نیتریک اکساید ، سوسپانسیون مخمر اپسونیزه با سرم تازه رت و سوسپانسیون ماکروفاژمجاور شدند. این سلول‌ها به مدت ۸۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس از مایع رویی کشت سلول‌های ماکروفاژ به داخل پلیت ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته شد. سپس محلول ۱ درصد سولفانیل آمید (شرکت Sigma –آمریکا) به چاهک‌ها اضافه شد.

1. Extracellular

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:26 +0430 on Wednesday July 4th 2018

آنگاه به تمام حفره‌ها، محلول ۱ درصد N-۱-۱نفتیل اتیلن دی‌آمین دی‌هیدروکلراید (شرکت Sigma -آمریکا) اضافه شد و در نهایت در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت گردید. همزمان با استفاده از غلظت‌های مختلف نیتریت سدیم منحنی استاندارد ترسیم شده و از طریق رگرسیون و معادله خطی، غلظت نیتریت موجود در نمونه‌ها تعیین گردید(۱۷).

در نهایت به منظور سنجش پروفایل سایتوکاین‌های موجود در سوپ رویی کشت ماکروفاژها به شرح زیر عمل شد. سوسپانسیون مخمر اپسونیزه با سرم تازه رت و سوسپانسیون ماکروفاژبه مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. سپس مایع رویی آن‌ها جمع‌آوری شد و در نهایت سطح سایتوکاین‌های IL-12و IL-10 با استفاده از کیت‌های الایزای مربوطه (شرکت BENDERMED–آلمان) و بر طبق دستورالعمل مندرج در دفترچه راهنمای مورد سنجش قرار گرفت.

تجزیه تحلیل آماری

جهت مقایسه داده‌ها از آزمون آنالیز Student's t-Test مستقل (غیر زوجی) استفاده شد. داده‌ها به صورت Mean±SD گزارش شدند. سطح معنی‌داری، $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج میزان ارزیابی فعالیت زیستی (میزان احیای MTT) ماکروفاژهای استحصال شده حاکی از عدم تغییر معنی دارآن در گروه تحت درمان با عصاره هیدروالکلی زعفران نسبت به گروه شاهد بود.همچنین براساس نتایج ما به نظر می‌رسد که میزان فاگوسیتوز مخمر اپسونیزه بین دو گروه شاهد و تیمار اختلاف معنی‌داری وجود ندارد(جدول شماره ۱).

نتایج حاصل از چالش سلول‌های ماکروفاژ با مخمر اپسونیزه نشان داد که میزان انفجار تنفسی و به تبع آن احیا NBT در گروه موش‌های که زعفران را دریافت نموده بودند، نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد (جدول شماره۱، $p<۰/۰۰۱$). واسطه‌های فعال نیتروژن از جمله نیتریک اکساید نیز از جمله فراورده‌های ماکروفاژها هستند. همچنین نتایج به دست آمده حاکی از کاهش تولید میزان نیتریک اکساید توسط سلول‌های ماکروفاژ استحصال شده از موش‌های تحت تیمار با زعفران نسبت به گروه شاهد بود (جدول شماره ۱، $p<۰/۰۱$).

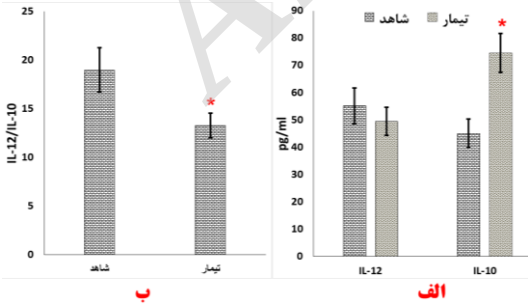
به دنبال چالش ماکروفاژهای صفاقی با مخمر اپسونیزه میزان تولید سایتوکاین‌های ضد التهابی IL-10 افزایش داشت (جدول شماره ۲ ، $p<۰/۰۱$) اما سطح سایتوکاین التهابی IL-12 تغییر معنی‌داری را نشان نداد (نمودار شماره ۱). با این حال مقایسه نسبت IL-12 به IL-10 حاکی از کاهش معنی‌دار آن در گروه دریافت کننده زعفران می‌باشد(نمودار شماره ۱، $p<۰/۰۱$).

جدول شماره ۱ : ارزیابی فعالیت ماکروفاژهای صفاقی در رت های گروه شاهد و رتهای تیمار شده با عصار هیدروالکلی زعفران

گروه	میزان فعالیت زیستی*	درصد فاگوسیتوز	شدت انفجار تنفسی*	میزان نیتریک اکساید**
شاهد	۰/۸۲±۰/۰۸۱	۷۱/۹۸±۸/۲۵	۰/۹۱±۰/۲۵	۷۴/۵۶±۷/۸۶
تیمار	۰/۸۸±۰/۰۶۴	۷۹/۱۱±۵/۴۵	۰/۶۱±۰/۱۳	۵۳/۱۷±۸/۲۱
سطح معنی داری	=۰/۰۸	=۰/۵۹	<۰/۰۰۱	<۰/۰۱

* میزان جذب نوری

** میکرومولار



نمودار شماره ۱: ارزیابی تولید سایتوکاین توسط ماکروفاژهای صفاقی در رت‌های گروه شاهد و رت‌های تیمار شده با عصار هیدروالکلی زعفران. الف) میزان تولید سایتوکاین‌های IL-12 و IL-10.ب) نسبت ایتوکاین‌های IL-12 به IL-10. * نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $p<۰/۰۱$ نسبت به گروه شاهد است.

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:26 +0430 on Wednesday July 4th 2018

بحث

ارزیابی نتایج حاصل از پژوهش حاضر، حاکی از اثرات عمیق تجویز خوراکی زعفران برعملکرد ماکروفاژها به عنوان یکی از بازیگران اصلی التهابات مزمن است به‌طوری که در ماکروفاژهای صفاقی استحصالی از رت‌های تحت تیمار با عصاره هیدروالکلی زعفران قابلیت انفجار تنفسی و تولید اکسید نیتریک مقایسه با ماکروفاژهای صفاقی استحصالی از رت‌های شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافته بود. همچنین زعفران موجب افزایش تولید سایتوکاین ضد التهابی IL-10 توسط ماکروفاژهای گروه تیمار شد. سطح تولید سایتوکاین التهابی IL-12 تغییر معنی‌داری نیافت. هرچند که نسبت IL-12 به IL-10 کاهش معنی‌دار یافت. با این وجود شدت فاگوسیتوز و زیستایی ماکروفاژهای گروه تیمار نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی داری نشان نداد.

مطالعات گذشته به خوبی نشان داده است که ماکروفاژها بر اساس ریز محیط اطراف خود قادر به برنامه‌ریزی و تبدیل به سلول‌های با عملکرد متفاوت می‌باشند. به طور ساده سلول‌های ماکروفاژ فعال شده از طریق کلاسیک یا ماکروفاژهای M1 دارای خاصیت التهابی قوی بوده و در حذف عفونت‌های داخل سلولی نقش مهمی را بازی می‌کنند. از طرفی به دلیل قابلیت‌های التهابی بالا و تولید سطوح بالایی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن، قادر به مشارکت در ایجاد آسیب‌های بافتی می‌باشند، به طوری که ماکروفاژهای M1 به عنوان سلول‌های اجرایی اصلی در بیماری‌های خود ایمن اختصاصی بافت عمل می‌کنند(۱۹،۱۸) ماکروفاژهای M1 دارای مقدار زیادی IL12 و IL23 و مقدار کمی IL10 تولید می‌کنند(۱۹). ماکروفاژهای M2یا ماکروفاژهای فعال شده به روش جایگزین به میزان کمتری سایتوکین‌های التهابی و رادیکال‌های آزاد تولیدکرده و عمدتا نقش مهمی را در اختتام التهاب و ترمیم بافتی از طریق تولید فاکتورهای تروفیک بازی می‌کنند(۱۹،۱۸). نکته اصلی این‌که ماکروفاژهای ضد التهاب M2 با توجه نقشی که در اختتام التهاب و ایجاد ترمیم از طریق پاکسازی بافت‌بازی می‌کنند، دارای قابلیت فاگوسیتوز بیش‌تری نسبت به ماکروفاژهای التهابی می‌باشند(۱۸). نتایج ما نیز به حاکی از افزایش قابلیت فاگوسیتوز ماکروفاژها در گروه دریافت‌کننده عصاره زعفران بود، هرچند که تغییر یاد شده از نظر آماری معنی‌دار نبود.

در تست احیای NBT توانایی و ظرفیت سلول‌های فاگوسیت‌کننده از قبیل ماکروفاژها در تولید رادیکال‌هایی آزاد اکسیژن به‌ویژه آنیون سوپر اکسید سنجیده می‌شود. رادیکال‌های آزاد منجر به احیای NBT وتبدیل آن به کریستال‌های فورمازون آبی و نامحلول می‌گردد. میزان فورماوزون تولید شده به عنوان شاخص از عملکرد انفجار تنفسی ماکروفاژها به روش سنجی اندازه‌گیری می‌شود(۴). هم‌چنین در این مطالعه میزان تولید نیتریک اکساید از طریق میزان اجزای احیای نیتریت به شیوه رنگ‌سنجی گریس سنجیده شد(۴). براساس نتایج تحقیق حاضر به نظر می‌رسد که زعفران به دلیل کاهش میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن و هم‌چنین تغییر نسبت سایتوکاینها به سمت پروفایل ضدالتهابی موجب برنامه‌ریزی سلول‌های به سمت مشابه با ماکروفاژهای M2 می‌شود. مشخص شده است که رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن با وجودی که نقش اساسی را در حذف عوامل فاگوسیت شده بازی می‌کنند، زمانی که میزان تولید آنها بیش از حد باشد و یا تولید آن‌ها در شرایط نامناسب صورت گیرد، منجر به ایجاد و گسترش آسیب‌های بافتی خواهند شد(۲۰). رادیکال‌های آزاد تولید شده در واکنش‌های التهابی می‌توانند در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌های خودایمنی و خودالتهابی نقش مهمی را ایفا نمایند(۲۱). در شرایط طبیعی بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد تعادل دقیقی وجود دارد. عدم تعادل در این فرایند منجر به بروز استرس اکسیداتیو و نیتراتیو شده و زمینه ایجاد تغییرات پاتولوژیک را در سطح ماکرومولکول‌های سلول فراهم می‌کند(۲۲). در هر استرس ناشی از رادیکال‌های آزاد، مواد پاداکسنده

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:26 +0430 on Wednesday July 4th 2018

نقش مهمی در کاهش و اختتام واکنش‌ها بازی می‌کنند. با توجه به گزارشات متعدد که حاکی از اثرات پاداکسنده اجزای زعفران است(۵)، احتمالا بخش مهمی از کاهش شدت تولید رادیکال‌های آزاد در ماکروفاژهای صفاقی رت‌های تحت تیمار با زعفران که در این مطالعه مشاهده شد، مربوط به اثرات پاداکسنده عصاره هیدروالکلی زعفران می‌باشد.

اخیرا نقش عصاره زعفران در کاهش علائم بیمارهای التهابی از قبیل آنسفالومیلیت تجربی خود ایمن (EAE، مدل تجربی اسکلروز متعدد) وآسم نشان داده شده است(۲۴،۲۳). لازم به ذکر است که تولید لجام گسیخته رادیکال‌های آزاد در کلیه این بیماری‌ها توسط ماکروفاژ از ویژگی‌های اساسی پاتوژنز آن‌ها است. تولید واسطه‌های التهابی از قبیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن در مونوسیت‌ها از طریق فعالیت محصولات ژن‌های میلوپراکسداز، نیتریک اکسید سنتاز القایی در همکاری با فراورده ژن سیکلواکسیژناز ۱ و ۲ (COX-1 و COX-2) صورت می‌گیرد. به نحو قابل توجهی مهار همه این ژن‌های یاد شده پس از استفاده از کروسین گزارششده است(۲۵). علاوه بر این کیم و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارش کردند که کروسین موجب مهار فاکتور اجزای P50 و P65 فاکتور نسخه برداری NF-kB (از جمله عوامل مهم راه انداز مسیرهای التهابی در سلول‌های ایمنی ذاتی) در رده سلولی می‌شود(۲۶).

نقش اصلی اینترلوکین ۱۰، محدودکردن و ختم پاسخ‌های التهابی و ممانعت از ایجاد آسیب‌های بافتی در شرایط التهابی می‌باشد. در عوض اینترلوکین ۱۲ یکی از سایتوکاین‌های پیش التهابی بوده که در ایجاد و گسترش آسیب‌های بافتی نقش بازی می‌کند. این سایتوکاین از عوامل پلاریزه‌کننده پاسخ‌های ایمنی به سمت پاسخ‌های ایمنی سلولی (پاسخ‌های Th1) می‌باشد(۲۷). نتایج حاضر حاکی از افزایش معنی‌دار تولید سطح اینترلوکین ۱۰ در ماکروفاژهای استحصالی از رت‌های گروه تیمار بود. با این حال سطح اینترلوکین ۱۲در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری را با گروه شاهد نشان نداد. با این وجود کاهش معنی‌دار نسبت IL-12 به IL-10 موجب تغییر به سمت شرایط ضدالتهابی خواهد شد. این تغییر توازن به سمت محیط سایتوکاینی ضدالتهابی جمله عوامل دیگر کاهش فعالیت التهابی ماکروفاژها و تولید رادیکال‌های آزاد می‌باشد. در تحقیقات پیشین نشان داده شده است که زعفران هیچ تاثیری بر روی بیان سیتوکین وابسته به Th1، IL-2 و IFN-γ ندارد(۲۸). این یافته با مطالعه ما که حاکی از عدم تغییر سطح اینترلوکین ۱۲ (عامل پلاریزه کننده به سمت Th1) است، هم راستا می‌باشد.

میزان احیای MTT به کریستال‌های آبی فورمازون توسط میتوکندری ماکروفاژها شاخصی از فعالیت زیستی این سلول‌ها می باشد(۴). لازم به ذکر است که عدم تغییر فعالیت میزان فعالیت زیستی ماکروفاژهاکه در سلول‌های استحصال شده از رت‌های گروه تیمار نسبت به گروه شاهد مشاهده شد، تاییدی بر تغییر پویا در برنامه ریزی و پلاریزه شدن سلول‌های ماکروفاژها و نه مهار ساده فعالیت این سلول‌ها پس از مجاورت با عصاره هیدروالکلی زعفران به سمت فنوتیپ ضدالتهابی می‌باشد. از آن‌جایی‌که در شرایط بسیاری از بیماریهای خود ایمنی و خود التهابی از قبیل (اسکلروز متعدد، دیابت و...)، فعالیت بیش از حد ماکروفاژهای التهابی منجر به ایجاد آسیب بافتی می‌گردد، ممکن است که عصاره هیدروالکلی زعفران به عنوان یک منبع طبیعی موثر جهت تخفیف علائم و بهبود شرایط پاتولوژیک مطرح شود.

References

1. Pello OM. Macrophages and c-Myc cross paths. OncoImmunology 2016; 5(6): e1151991.

2. Klopfleisch R. Macrophage reaction against biomaterials in the mouse model–

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:26 +0430 on Wednesday July 4th 2018

Phenotypes, functions and markers. Acta Biomater. 2016; 43: 3-13.

3. Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food and Bioproducts Processing 2011; 89(3): 217-233.
4. Abtahi FSM, Esmaili GH, Khamisabadi M, Lotfallahzade B. Immunomudulatory effects of hydroalcoholicextract of Hypericumperforatum. Avicenna J Phytomed 2015; 5(1): 62-68.
5. Rezaee Khorasany A, Hosseinzadeh H. Therapeutic effects of saffron (Crocus sativus L.) in digestive disorders: a review. Iran J Basic Med Sci 2016; 19(5): 455-469 (Persian).
6. Sadati SN, Ardekani MR, Ebadi N, Yakhchali M, Dana AR, Masoomi F, et al. Review of scientific evidence of medicinal convoy plants in traditional Persian medicine. Pharmacogn Rev 2016; 10(19): 33-38.
7. Boskabady MH, Farkhondeh T. Antiinflammatory, Antioxidant, and Immunomodulatory Effects of Crocus sativus L. and its Main Constituents. Phytother Res 2016; 30(7): 1072-1094.
8. Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. Int J Biochem Cell Biol 2009; 41(1): 40-59.
9. Abtahi Froushani SM, Zarei L, Esmaeili Gouvarchin Ghaleh H, Mansori Motlagh B. Estragole and methyl-eugenol-free extract of Artemisia dracunculus possesses immunomodulatory effects. Avicenna J Phytomed 2016: 6(5): 526-534.
10. Perera CO, Yen GM. Functional properties of carotenoids in human health. Int J Food Proper 2007; 10(2): 201-230.
11. Rezaee R, Hosseinzadeh H. Safranal: from an aromatic natural product to a rewarding pharmacological agent. Iran J Basic Med Sci 2013; 16(1): 12-26.
12. Najafi M, Ghavimi H, Gharakhani A, Garjani A. Effects of hydroalcoholic extract of Cynodon dactylon (L.) pers. on ischemia/ reperfusion-induced arrhythmias. DARU 2015; 16(4): 233-238.
13. Ray A, Dittel B. Isolation of Mouse Peritoneal Cavity Cells. J Vis Exp 2010; (35): 1488.
14. Motlagh BM, Ahangaran NA, Froushani SM. Calcitriol modulates the effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on macrophage functions. Iran J Basic Med Sci 2015; 18(7): 672-676.
15. Fijalkowski K, Czernomysy-Furowicz D, Irwin JA, Nawrotek P, Pobucewicz A. Secretory virulence factors produced by Staphylococcus aureus isolates obtained from mastitic bovine milk–effect on bovine polymorphonuclear neutrophils. Res Veter Sci 2012; 93(1): 82-87.
16. Mehrzad J, Duchateau L, Burvenich C : Phagocytic and bactericidal activity of blood and milk-resident neutrophils against Staphylococcus aureus in primiparous and multiparous cows during early lactation. Vet Microb 2009; 134(1): 106-112.
17. Morvaridi A, Delirezh N, Hobbenaghi R , Abtahi Froushani SM, Malekinejad H. The effects of All-Trans Retinoic Acid on clinical symptoms, nitric oxide levels and total antioxidant capacity of plasma in mouse model of multiple sclerosis. RJMS 2013; 20(108): 11-19 (Persian).
18. Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:26 +0430 on Wednesday July 4th 2018

vs. functional differentiation. M1/M2 Macrophages: The Arginine Fork in the Road to Health and Disease. Front Immunol 2014; 5: 510-514.

19. Rojas J, Salazar J, Martínez MS, Palmar J, Bautista J, Chávez-Castillo M, Gómez A, Bermúdez V, et al. Macrophage heterogeneity and plasticity: impact of macrophage biomarkers on atherosclerosis. Scientifica (Cairo) 2015; 2015: 851252.
20. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. Am J Med 2000; 109(1):33-44.
21. Cohen HB, Mosser DM. Extrinsic and intrinsic control of macrophage inflammatory responses. J Leukoc Biol 2013; 94(5): 913-919.
22. Gwyer Findlay E, Hussell T. Macrophage-mediated inflammation and disease: a focus on the lung. Mediators inflame 2012: 140937: 1-7.
23. Ghazavi A, Mosayebi G, Salehi H, Abtahi H. Effect of ethanol extract of saffron (Crocus sativus L.) on the inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57bl/6 mice. Pak J Biol Sci 2009; 12: 690-695.
24. Mokhtari-Zaer A, Khazdair MR, Boskabady MH. Smooth muscle relaxant activity of Crocus sativus (saffron) and its constituents: possible mechanisms. Avicenna J Phytomed. 2015; 5(5):36-75
25. Aggarwal BB, Deb L, Prasad S. Curcumin differs from tetrahydrocurcumin for molecular targets, signaling pathways and cellular responses. Molecules 2014; 20(1): 185-205.
26. Kim JH, Park GY, Bang SY, Park SY, Bae SK, Kim Y. Crocin suppresses LPS-stimulated expression of inducible nitricoxide synthase by upregulation of heme oxygenase-1 via calcium/calmodulin-dependent protein kinase 4. Mediators Inflamm 2014: 728709.
27. Abtahi Froushani SM, Delirezh N, Hobbenaghi R, Mosayebi G. Synergistic effects of atorvastatin and all-trans retinoic acid in ameliorating animal model of multiple sclerosis. Immunol Invest 2014; 43(1): 54-68.
28. Bani S, Pandey A, Agnihotri VK, Pathania V, Singh B. Selective Th2 upregulation by Crocus sativus: a neutraceutical spice. Evid Based Complement Altern Med 2011; 639862.

Archive of SID

www.SID.ir