

اثر عصاره جوشانده سنجد بر غلظت سرمی IL-6 در موش‌های سفید کوچک دریافت‌کننده لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس

علی پندونه^۱، سید همایون صدرایی^{۲*}، غلامرضا کاکا^۳، محمود مفید^۴،
داود اسماعیلی^۵، عسگر امامقلی^۶

چکیده

زمینه و هدف: شیوع بیماری‌های التهابی در سراسر جهان رو به افزایش می‌باشد. تاکنون درمان‌های رایج نتوانسته‌اند در مبتلایان به بیماری‌های التهابی، درمان قطعی ایجاد کنند. از طرفی مطالعات اخیر اثرات ضد التهابی عصاره آبی سنجد را نشان داده‌اند. اینترلوکین ۶ سایتوکاینی است که میزان آن در بسیاری از بیماری‌های التهابی افزایش می‌یابد و لذا به عنوان مارکری برای بیماری‌های التهابی شناخته می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره آبی میوه سنجد بر غلظت سرمی IL-6 (pg/ml) در موش‌های دریافت‌کننده لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس بود.

روش بررسی: ۲۵ سر موش سوری به ۵ گروه مساوی پنج‌تایی تقسیم شدند. گروه کنترل عصاره دریافت نکرد. به چهار گروه بعدی به ترتیب دوزهای: ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی سنجد به طریق صفاقی و به مدت چهار روز تزریق شد. هر ۵ گروه از طریق تزریق داخل صفاقی ۱۰۰ میکروگرم لیپوپلی ساکارید باکتری بروسلا آبورتوس در روز چهارم دریافت کردند. پس از خون‌گیری از قلب موش‌ها سرم آنها جدا شد و بلافاصله در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و سپس غلظت IL-6 با روش اختصاصی Elisa اندازه‌گیری گردید.

یافته‌ها: غلظت سرمی IL-6 (pg/ml) کاهش معناداری را در گروه‌های آزمون ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ($P=0/005$)، ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ($P=0/014$)، ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ($P=0/012$) و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ($P=0/023$) نتیجه‌گیری: می‌توان گفت یکی از اثرات ضد التهابی عصاره سنجد ایجاد کاهش در غلظت سرمی IL-6 می‌باشد.

کلید واژگان: عصاره آبی سنجد، اینترلوکین ۶، لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس.

۱- مربی گروه ایمنولوژی.
۲- استاد گروه آناتومی.
۳- دانشیار مرکز تحقیقات علوم اعصاب.
۴- مربی گروه آناتومی.
۵- دانشیار گروه میکروبیولوژی.
۶- کارشناس ارشد مرکز تحقیقات علوم اعصاب.

۱- گروه ایمنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، تهران، ایران.
۲- گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، تهران، ایران.
۳- گروه علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، تهران، ایران.
۴- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، تهران، ایران.
۵- مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول:

سید همایون صدرایی؛ گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، تهران، ایران.

تلفن: ۰۰۹۸۹۱۲۷۲۴۱۱۷۰

Email: shsdraie@yahoo.com

مقدمه

امروزه بیماری‌های التهابی از انواع بیماری‌های شایع است که گریبان‌گیر جوامع بشری شده است (۱). علت این بیماری‌ها پاسخ‌های ایمنی است که در قالب واکنش‌های التهابی شکل می‌گیرد. این بیماری‌ها که شیوع آنها در کل جهان در حال افزایش می‌باشد، شامل آرتریت روماتوئید، استئو-آرتریت و بیماری کرون است (۱). به علاوه واکنش-های التهابی در ایجاد بعضی بیماری‌های دیگر مانند آسم آلرژیک (۲) و درماتیت آتوپیک (۳) نیز نقش بسیار مهمی دارد. داروهای رایج در درمان این بیماری‌ها دارای عوارض جانبی متعددی هستند. مثلاً "داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی" NSAID anti-inflammatory drugs که از رایج‌ترین این نوع داروها می‌باشد، دارای عوارض جدی بر سیستم گوارش شامل زخم معده و خونریزی‌های روده‌ای-معدی و نیز عوارض قلبی-عروقی می‌باشد (۴). لذا نیاز به درمان‌های جدید به گونه‌ای که ضمن مهار پاسخ‌های التهابی عوارض کمتری بر سایر بافت‌ها داشته باشد، کاملاً ضروری به نظر می‌رسد. امروزه کشف مواد طبیعی دارویی که در درمان بیماری‌ها حداقل عوارض جانبی را داشته باشند به شدت مورد توجه قرار گرفته است. یکی از علت‌های کاربرد این داروها در درمان بیماری‌ها، سازگار بودن آنها با طبیعت انسان است. میوه سنجد دارای ترکیبات متعددی شامل کربوهیدرات‌ها (۵)، اسیدهای چرب و نیز فلاونوئیدها (با اثرات ضد التهابی) و غیره می‌باشد (۶). فلاونوئیدها دارای اثرات ضد درد و ضد التهاب می‌باشد و در ترکیبات داروهای ضد التهاب به کار می‌رود (۷).

IL-6 سایتوکاینی است که از سلول‌های مختلف (ماکروفاژ، فیبروبلاست و غیره) در پاسخ به عوامل عفونی و یا آسیب‌های بافتی تولید می‌شود (۸). IL-6 سایتوکاین اصلی در پاسخ فاز حاد می‌باشد (۱). لازم به ذکر است که

واکنش التهاب شامل یک مجموعه پاسخ است که قسمتی از آن پاسخ فاز حاد می‌باشد.

پاسخ فاز حاد شامل افزایش غلظت پروتئین‌های پلاسما است که مدت کوتاهی پس از ورود عوامل عفونی روی می‌دهد. این پروتئین‌ها شامل C-Reactive Protein (CRP)، فیبرینوژن و آمیلوئید A سرمی است (۹).

IL-6 القاء‌کننده مهم در تولید پروتئین‌های فوق از کبد می‌باشد (۱). این سایتوکاین هم‌چنین باعث افزایش عمر سلول‌های لنفوسیت، آستروسیت، سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های خون‌ساز (سلول‌های هماتوپوئیتیک) می‌شود (۸). به علاوه اثرات درمانی و ضد درد عصاره آبی سنجد بر بعضی بیماری‌ها مانند آرتریت روماتوئید که از دسته بیماری‌های التهابی محسوب می‌شود، گزارش شده است (۱۰).

با توجه به گزارش‌های فوق و برای پی‌بردن به چگونگی اثر عصاره بر واکنش‌های التهابی بر آن شدیم تا تأثیر عصاره سنجد را بر IL-6 به عنوان یکی از سایتوکاین‌های مهم التهابی (۱) مورد سنجش قرار دهیم.

روش بررسی

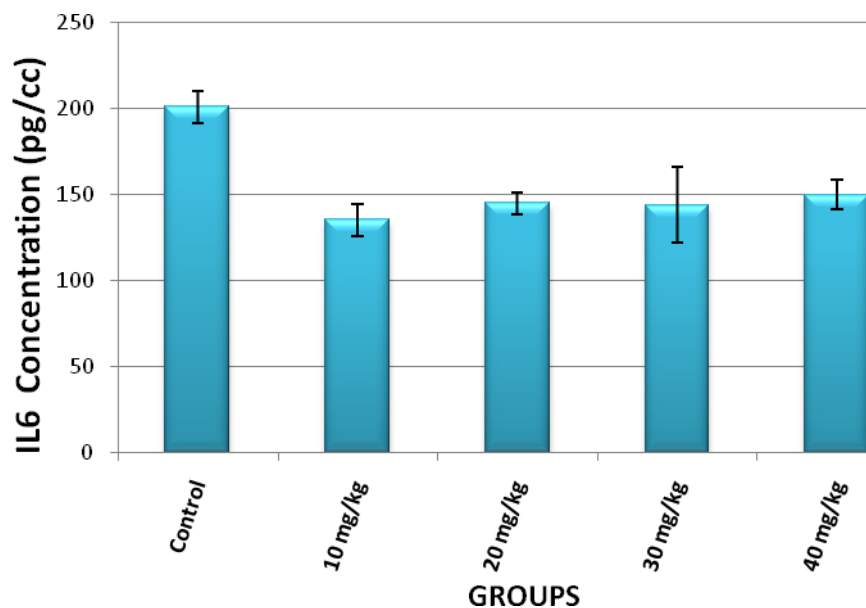
مطالعه ما از نوع تجربی بود. در این مطالعه از مدل حیوانی موش کوچک آزمایشگاهی استفاده شد. ۲۵ سر موش با میانگین وزنی 25 ± 5 w انتخاب شدند. از لیپوپلی ساکارید باکتری بروسلا آبورتوس به عنوان آنتی‌ژن برای القاء واکنش التهابی استفاده شد. روش تهیه لیپوپلی ساکارید از باکتری بروسلا همان روشی بود که در اکثر مقالات به کار رفته بود (۱۱). عصاره آبی سنجد توسط کمالی نژاد در گروه فارماکولوژی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهیه گردید. موش‌ها به پنج گروه پنج‌تایی تقسیم شدند. یک گروه کنترل که فقط آنتی‌ژن دریافت کردند و چهار گروه دیگر

روش آماری: برای بررسی آماری از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه استفاده شد. از تست LSD به منظور بررسی تفاوت در بین گروه‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

غلظت سرمی IL-6 (pg/ml) کاهش معناداری را در گروه‌های آزمون ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ($P=0/005$)، ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ($P=0/014$)، ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ($P=0/012$) و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ($P=0/023$) در مقایسه با گروه شاهد نشان داد.

علاوه بر آنتی‌ژن دوزهای مختلف از عصاره سنجد (۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) محلول شده در بافر PBS را به صورت داخل صفاقی در چهار روز متوالی دریافت کردند. روز پنجم همه گروه‌ها لیوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس (۱۰۰ میکروگرم داخل صفاق) را به عنوان آنتی‌ژن دریافت نمودند. روز بعد موش‌ها با اتر بیهوش شدند و سپس خون‌گیری از طریق قلب انجام شد. سرم خون‌ها جدا شد و تا انجام مرحله بعدی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. در مرحله بعد سرم‌های تهیه شده با کیت الیازی اختصاصی IL-6 (Invitrogen Life Technologies) برای تعیین غلظت سرمی این سایتوکاین مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۱: تغییرات غلظت اینترلوکین ۶ (IL-6) در موش‌های درمان شده با دوزهای مختلف عصاره آبی میوه سنجد نسبت به گروه کنترل ($p < 0/05$ اختلاف با گروه کنترل)

بحث

هدف این مطالعه بررسی عصاره سنجد بر غلظت سرمی IL-6 (به عنوان یک مارکر واکنش‌های التهابی) در موش‌های کوچک آزمایشگاهی بود.

این مطالعه توانست کاهش غلظت IL-6 در سرم موش‌هایی که عصاره G سنجد را دریافت کرده بودند، نسبت به کنترل نشان دهد. اما این غلظت در سرم گروه‌های موشی با دریافت دوزهای مختلف عصاره تفاوت معناداری نداشت. لذا در طیف دوزی به کار رفته مقدار عصاره دریافت شده بر شدت کاهش IL-6 در گروه‌های مختلف نسبت به یکدیگر تأثیری نداشت (شکل ۱). میوه سنجد با دارا بودن ترکیبات متعددی از جمله فلاونوئیدها با اثرات ضد التهاب (۷) به عنوان دارویی با اثرات ضد درد و نیز با اثرات درمان بر بعضی بیماری‌های التهابی گزارش شده است (۱۰).

همچنین در یک مطالعه (۱۲) معلوم شد که عصاره سنجد در درمان بیماران مبتلا به استئوآرتریت (OA) تأثیر مثبت دارد. از آنجا که معلوم شده است، یکی از علت‌های تخریب غضروف در بیماران مذکور IL-6 می‌باشد (۱۳) می‌توان گفت یکی از اثرات عصاره بر بهبود بیماران مبتلا به OA ایجاد کاهش در غلظت IL-6 می‌باشد.

در مطالعه‌ای اثر مهارکننده عصاره سنجد بر آنزیم‌های مبدل اسید آراشیدونیک به پروستوگلندین‌ها (آنزیم COX) مشاهده شد (۱۴). پروستوگلندین‌ها از مهم‌ترین واسطه‌گرهای واکنش التهابی محسوب می‌شوند (۱۵).

از طرفی معلوم شده است که پروستوگلندین E2 با افزایش تولید IL-6 باعث تخریب مفاصل در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید می‌شود (۱۶). لذا می‌توان علت احتمالی کاهش غلظت سرمی IL-6 را به مهار آنزیم‌های مولد پروستوگلندین‌ها نسبت داد.

لنفوسیت‌های T_{H17} از زیر گروه‌های لنفوسیت‌های T_H است که به دلیل تولید IL-17 به این نام خوانده می‌شوند. این سلول‌ها نقش عمده‌ای در ایجاد بیماری‌های التهابی مانند آرتریت روماتوئید، مالٹیپل اسکلروزیس (MS) و غیره ایفا می‌کنند. IL-6 نقش مهمی در تمایز این لنفوسیت‌ها از سلول‌های T_{CD4}^+ ایفا می‌کند (۱۷).

دسته دیگری از لنفوسیت‌ها به نام لنفوسیت‌های T تنظیمی (T_{Reg}) هستند که با مهار فعالیت سلول‌های T_H باعث ایجاد تولرانس و نیز جلوگیری از آغاز واکنش‌های التهابی می‌شوند. تأثیر IL-6 بر روی این دسته از لنفوسیت‌های T جلوگیری از تمایز و مهار تولید آنها از پریکرسرهای مربوطه می‌باشد (۱۷).

با این توضیح می‌توان گفت عصاره سنجد با کاهش IL-6 احتمالاً تعادل فعال شدن T_{H17} و T_{Reg} را به نفع مهار پاسخ‌های ایمنی و کاهش واکنش التهابی تغییر می‌دهد.

اضافه می‌نماید که تاکنون اثر مستقیم عصاره سنجد بر لنفوسیت‌های T تنظیمی به عنوان اصلی‌ترین رده سلولی مهارگر پاسخ‌های ایمنی بررسی نشده است. می‌توان با بررسی اثر آن بر این رده سلولی مکانیزم‌های احتمالی بیشتری از اثرات این عصاره را بر پاسخ‌های ایمنی روشن کرد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نقش مهم IL-6 در واکنش‌های التهابی و اثر عصاره سنجد بر این سایتوکاین می‌توان گفت یکی از اثرات ضد التهابی عصاره سنجد ایجاد کاهش در غلظت سرمی IL-6 می‌باشد.

- 1-Rincon M. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. Trends in immunology 2012; 33 (11): 571-577.
- 2-Rincon M, Irvin Ch G. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. Int J Biol Sci 2012; 8 (9): 1281-90.
- 3-Toshitani A, Ausel JC, Chan Sc, Li Sh, Hanifin JM. Increased interleukin 6 Production by T cells derived from patients with dermatitis. J Invest Dermatol 1993; 100 (3): 299-304.
- 4-Hillstrom C, Jakobson JG. Lornoxicam: pharmacology and usefulness to treat acute postoperative and musculoskeletal pain a narrative review. Expert Opin Pharmacother 2013; 14(12): 1679-1694.
- 5-Ayaz FA, Kadioglu A, Dogru A. Soluble sugar composition of *Elaeagnus angustifolia* L. Var. *Orientalis*(L) Kuntze (Russian olive) fruits. Turk J Botany 1999; 23: 349-354.
- 6-Karimi Gh , Hosseinzadeh H , Rassoulzadeh M , Razavi B , Taghiabadi E. Antinociceptive Effects of *Elaeagnus angustifolia* fruits on sciatic nerve ligated mice . Iran J Basic Med Sci 2010 ; 13 (3) : 97-101.
- 7-Mercader AG, Pomilio AB. naturally – occurring dimmers of flavonoids as anti carcinogens. Anticancer agents Med Chem 2013; 13(8): 1217-35.
- 8-Horn F, Henz C, Heidrich K. Interleukin – 6 transduction and lymphocyte function. Immunobiology 2000; 202: 151-167.
- 9-Steel DM, Whitehead AS. The major acute phase reactants: C- Reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid a protein. Immunology Today 1994; 15 (2): 81-88.
- 10-Hamadani A, Hussein J, Semnani S, Javan M, Saeedi F, Sarema S. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Elaeagnus angustifolia* fruit extract. Journal of Ethnopharmacology 2000; 72 (1-2) : 287-292.
- 11-Pakzad I, Rezaee A, Rasaee MJ, Zavarani HA, Kazemnegad A, Tabaraee B, Raivandi S. Extraction, purification and detoxification of *Brucella abortus* lipopolysaccharide and biological activities evaluation. Hakim Med J 2003; 6(4): 74-86. (In Persian)
- 12-Alishiri G, Ahmadiani A, Bayat N, Kamalinejad M, Salimzadeh A, Saremi S, "et al". Efficacy of *Elaeagnus Angustifolia* Extract in Treatment of Osteoarthritis of Knee: A Randomized Double Blind Placebo-Controlled Trial. Kowsar 2007; 12: 49-57. (In Persian)
- 13-Doss F, Menard J, Hashild M, Kreutzer Hj, Mittimeier T, Muller-steinhardt M, Muller B. Elevated IL-6 levels in the synovial fluid of osteoarthritis patients stem from plasma cells. Scand J Rheumatol 2007; 36 (2): 136-139.
- 14-Farahbakhsh S, Arbabian S, Emami F, Rastegar Moghadam B, Ghoshooni H, Noroozadeh A, "et al". inhibition of cyclooxygenase type 1 and 2 enzyme by aqueous extract of *elaeagnus angustifolia* in mice. Neuroscience 2011; 2(2): 31-37.
- 15-Beaduin AE , Pun M , Yang C , Nicholl DD , Steinback CD , Slater DM , "et al". Cyclooxygenase 1 and 2 differentially regulate blood pressure and cerebrovascular Response to acute and chronic intermittent hypoxia : implications for apnea. J Am Heart Assoc 2014; 3(3): e000875.
- 16-Emanuela R, Gerret A. Fitz Gerald prostaglandins and inflammation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2011 May; 31(5): 989-1000.
- 17-kimura A, kishimoto T. IL-6: Regulator of Treg / Th17 balance. Eur J Immunol 2010; 40(7): 1830-5.

Effect of *Angustifolia* Aqueous Extract on IL-6 Serum Levels in Mice Receiving Lipopolysaccharide of *Brucella abortus*

Ali Pandooneh¹, Seyed Homayoon Sadraie^{2*}, Gholam Reza Kaka³, Mahmood Mofid⁴, Davood Esmaili⁵, Asgar Emamgholi⁶

1-Lecturer in Immunology.

2-Associate Professor of Anatomy

3-Associate Professor of Neuroscience Research Center

5-Assistant Professor of

6-Master of Science of Neuroscience Research Center.

1-Department of Immunology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2-Department of Anatomy, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3-Department of Neuroscience Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4-Department of Anatomy, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

5-Department of Microbiology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

6-Department of Neuroscience Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding Author:

Seyed Homayoon Sadraie;

Department of Immunology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Tel: +989124270494

Email: shsadraie@yahoo.com

Abstract

Background and Objectives: The incidence of inflammatory disease is increasing around the world. Conventional therapies in patients with inflammatory diseases unable to cure completely. However, recent studies have shown anti-inflammatory effects of *angustifolia* aqueous extract. The IL-6 cytokine level is increased in many inflammatory diseases and is recognized as a marker for inflammatory diseases. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of *angustifolia* aqueous extract on IL-6 serum levels in mice receiving lipopolysaccharide of *Brucella abortus*.

Subjects and Methods: Twenty five mice were divided into five equal groups. The control group did not receive the extract. The four next groups intraperitoneally received the different dose of 10, 20, 30 and 40 mg/kg of *angustifolia* aqueous extract daily for four days. All groups intraperitoneally received 100 µg of lipopolysaccharide of *Brucella abortus* on the fourth day. Blood samples were collected by cardiac puncture. The sera were separated and kept frozen at -80°C and thawed shortly before determination of IL-6 levels by the ELISA kit.

Results: Our results showed that serum concentrations of IL -6 (pg/ml) in groups receiving *angustifolia* aqueous extract at dose of 10 mg/kg (P<0.05), 20 mg/kg (P = 0.014), 30 mg/kg (P =0.012) and 40 mg/kg (P=0.023) significantly decreased when compared to control group (p <0.05).

Keywords: *Angustifolia* aqueous extract, IL-6, Lipopolysaccharide of *Brucella abortus*.

► Please cite this paper as:

Pandooneh A, Sadraie SH, Kaka GhR, Mofid M, Esmaili D, Emamgholi A. Effect of *Angustifolia* Aqueous Extract on IL-6 Serum Levels in Mice Receiving Lipopolysaccharide of *Brucella Abortus*. *Jundishapur Sci Med J* 2015; 14(2):151-156.

Received: July 14, 2014

Revised: Dec 15, 2015

Accepted: Mar 9, 2015