ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۱، شماره۱۱، بهمن۱۳۹۵(شماره پی در پی۱۱۸)

مقاله پژوهشی

تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه علف چای بر مهاجرت سلولی و تولید واسطه‌های التهابی در پریتونئیت حاد القاء شده با زیموزان در موش سفید آزمایشکاهی

شهلا قاسمی، سید میثم ابطحی فروشانی*، عبدالغفار اونق
گروه میکروبیولوژی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۵/۸/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۲۵

چکیده:

زمینه و هدف: پریتونیت القاء شده با زیموزان به‌منظور مطالعه فراخوانی مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها به حفره صفاقی و هم‌چنین ارزیابی اثرات ضدالتهابی داروهای جدید و یا موجود به کار می‌رود. این مطالعه به منظور ارزیابی اثرات عصاره هیدرو الکلی گیاه علف چای بر پریتونیت حاد القاء شده با زیموزان در موش‌های سوری انجام شده است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۵۰ سر موش سوری نر به طور تصادفی در۵ گروه به ترتیب با دارونما(فسفات سالین نرمال)، ۱۰۰، ۲۰۰و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلو گرم عصاره‌ی هیدرو الکلی گیاه علف چای و دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلو گرم از داروی دیکلوفناک، یک ساعت قبل از القاء پریتونیت درمان شدند. به‌منظور القاء پریتونیت به هر موش۲۰۰ میکرو لیتر از محلول زیموزان با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به صورت داخل صفاقی تزریق شد. بعد از ۴۸ ساعت محوطه صفاقی با ۵ میلی‌لیتر PBS سرد شسته شده و سلول‌های جداشده به منظور ارزیابی شمارش تفریقی سلول‌ها، تولید نیتریک اکسید و شدت انفجار تنفسی مورد استفاده قرار گرفتند. داده‌های آماری با استفاده از آزمون‌های آماری تست کروسیکال والیس، مان ویتی و تعدیل بونفرونی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: بر اساس یافته‌های به دست آمده ، تولید نیتریک اکسید و میزان انفجار تنفسی در سلول‌های اگزودای استحصالی از لاواژ صفاق در موش‌هایی که عصاره علف چایی را در دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم یا دیکلوفناک (۱۰ میلی‌گرم بر کیلو گرم)را دریافت کرده بودند، نسبت به موش‌های شاهد (مبتلا به پریتونئیت و دریافت‌کننده فسفات سالین بافر)کاهش یافت. تعداد کلی سلول‌ها در محوطه صفاقی در همه گروه‌های درمانی کاهش یافت. با این حال نسبت تفریقی سلول‌ها، اختلاف معنی‌داری را در بین گروه‌های درمانی با عصاره هیدروالکلی گیاه علف چای را نشان نداد. استفاده از دیکلوفناک و عصاره گیاهی منجر به کاهش سطح سایتوکاین‌های التهابی TNF-α، IL-1 و IL-6 شد. در زمینه کاهش سطح تولید TNF-α و IL-1، دیکلوفناک قوی‌تر از دوزهای مختلف عصاره عمل کرده است. با این حال موش‌های مبتلا به پریتونئیت و دریافت کننده عصاره هیدروالکلی به خصوص در دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلو گرم کاهش بیشتری در سطح IL-6 نسبت به موش‌های مبتلا به پرتونئین و دریافت کننده دیکلوفناک نشان دادند.

نتیجه‌گیری: درمجموع به نظر می‌رسد که عصاره هیدروالکلی گیاه علف چای می‌تواند به‌عنوان یک منبع طبیعی برای کنترل التهاب ناشی از پریتونیت حاد به کار رود.

واژه‌های کلیدی: پریتونئت، زیموزان، علف چای

*نویسنده مسئول: **سید میثم ابطحی فروشانی،** ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروب شناسی
Email: meysamabtahi@hotmail.com

مقدمه

التهاب، پاسخ بافت‌های عروقی به جراحت، آزردگی و عفونت است. التهاب حاد اغلب با فیلتراسیون سلولی پر از نوتروفیل همراه است و در یک دوره چندروزه انجام می‌شود. درحالی‌که التهاب مزمن به‌وسیله فیلتراسیون سلولی محتوی سلول‌های تک‌هسته‌ای(مونوسیت، ماکروفاژ و لنفوسیت) مشخص می‌شود. التهاب مزمن ممکن است که برای هفته‌ها و یا حتی سال‌ها ادامه یابد و اغلب سبب تغییر غیرقابل برگشت بافت و از دست رفتن عملکرد آن می‌شود(۱).

مدت‌های مدیدی است که از پریتونیت عفونی القاشده به‌وسیله تزریق پاتوژن‌ها داخل حفره صفاقی، به‌عنوان یک مدل جهت مطالعه التهاب حاد استفاده شده است. متأسفانه این چنین مدل‌های التهابی به‌سختی کنترل می‌شوند، چون زمان دقیق و درجه پاسخ التهابی وابسته به پاتوژنیسیته و سرعت رشد میکروارگانیسم خاص استفاده شده، شدت و اثر پاسخ‌های ایمنی میزبان می‌باشد(۳ و ۲). تزریق زیموزان، جزء نامحلول پلی ساکاریدی دیواره سلولی مشتق شده از Saccharomyces cerevisiae، به‌عنوان مدل خودالقا شونده پریتونیت در موش و خرگوش به‌صورت وسیعی استفاده‌شده است (٤). تزریق داخل صفاقی زیموزان تمامی‌نشانه‌های اصلی التهاب حاد شامل درد، فیلتراسیون لوکوسیت‌ها و سنتز واسطه‌های التهابی شامل؛ لوکوترین‌ها و پروستاگلاندین ها را ایجاد می‌کند(٥). پریتونیت القایی به وسیله زیموزان به‌عنوان یک مدل بسیار مناسب جهت ارزیابی فرآیند التهاب حاد و هم‌چنین ارزیابی چگونگی فراخوانی سلول‌های مونوسیت ونوتروفیل به داخل صفاق و در نهایت به‌عنوان یک مدل بسیار کارآمد برای داروهای ضدالتهابی مطرح است(۴ــ۲). این مدل یک مدل خود محدود شونده مشابه پریتونیت موجود در انسان بوده و از آنجایی که ورود سلول‌ها به داخل محوطه صفاقی صورت می‌گیرد ارزیابی کینتیک سلول‌ها در این روش به‌سادگی صورت خواهد گرفت(۴).

اجزای ایمنی ذاتی، از قبیل بیگانه‌خوارهای حرفه‌ای نقش مهمی‌در واکنش‌های دفاعی بر عهده دارند. بیگانه‌خوارهای حرفه‌ای شامل نوتروفیل‌ها و سیستم بیگانه‌خواری تک‌هسته‌ای، شامل مونوسیت‌ها و ماکروفاژها می‌باشند. به طور معمول نوتروفیل‌ها اولین و مونوسیت‌ها دومین خط دفاعی بدن در برابر عوامل بیگانه محسوب می‌شوند. این سلول‌ها فعالانه به سمت مواد کموتاکتیک و بیگانه مهاجرت کرده (کموتاکسی)، آن‌ها را می‌بلعند (فاگوسیتوز) و از بین برده و با تولید مدیاتورهای التهاب موجب ایجاد واکنشهای التهابی می‌شوند(٦ و ٥). یکی دیگر از وظایف مهم سلول‌های بیگانه خوار و هم‌چنین پاسخ‌های التهابی راه اندازی و تقویت واکنش‌های ایمنی تطبیقی است. امروزه تمایل به استفاده از گیاهان دارویی بلاخص در زمینه کاهش التهاب روز افزون است. در هر حال لازمه استفاده از این ترکیب‌های

گیاهی اطمینان از اثر بخشی آنها در یک مطالعه علمی و سیستماتیک است(۸ و۷).

هوفاریقون، علف چای، هزار چشم یا گل راعی بانام علمی،Hypericum perforatum از جمله این گیاه دارویی ارزشمند از خانواده Hypericaceae می‌باشد(۱۰ و۹). گیاه علف چای محتوی چندین ترکیب با فعالیت بیولوژیکی مانند؛ هایپرسین، سودوهایپرسین، فلاوونوییدها، پروسیانیدهای اولیگومریک و هایپرفورین می‌باشد. عصاره این گیاه به عنوان ضماد موضعی برای درمان زخم‌ها، سوختگی‌ها و درد عضلات استفاده می‌شود(۹). نشان داده است که هایپرفورین به عنوان یکی از ترکیب‌های اصلی گیاه علف چای دارای اثرات ضد باکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت بوده و ممکن است برای درمان اعتیاد به الکل نیز ممکن است که مفید باشد. هایپرسین و سودوهایپرسین نیز اثرات ضد باکتریایی و ضد ویروسی دارند(۱۴-۱۱). خاصیت این گیاه در درمان افسردگی‌های خفیف تا متوسط و هم‌چنین دردهای قاعدگی به اثبات رسیده به طوری که به عنوان یک دارو در بسیاری از کشورها از جمله ایران مجوز مصرف پیدا نموده است(۱۰).

اخیراً اثرات تعدیل کننده واکنش‌های ایمنی در مورد گیاه علف چای گزارش شده است(۱۵). با توجه به این که ایجاد التهاب و واکنش‌های ایمنی در بسیاری از جنبه‌ها به یکدیگر مربوط است، لذا در این مطالعه بر آن شدیم که اثرات احتمالی این گیاه را در یک مدل التهابی حاد (پریتونئیت القایی به وسیله زیموزان) در مدل موشی ارزیابی کنیم.

روش بررسی

این مطالعه از نوع مداخله‌ای ــ تجربی است جامعه مورد مطالعه، شامل ۵۰ سر موش‌های نر سوری با محدوده سنی ٦ تا ۸ هفته می‌باشد که از حیوان خانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه شدند.این موش‌ها در شرایط استاندارد آب، غذا، دما و نور کافی نگاهداری شدند. کلیه مراحل این تحقیق در کمیته اخلاق پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه مورد تأیید قرار گرفت.

بعد از تهیه گیاه علف چای، جنس و گونه آن به وسیله کارشناس دانشکده علوم تأیید شد. سپس گیاه در شرایط سایه خشک شده و به وسیله دستگاه خردکننده، کل گیاه به‌صورت پودر درآورده شد.عصاره‌گیری به شیوه متداول و به کمک حلال آب و اتانول به نسبت حجمی ۵۰ به ۵۰ صورت گرفت و پس از فیلتر کردن و خشک شدن عصاره در روتاری به‌صورت پودر لیوفلیزه در شرایط استریل تهیه شد(۱۵).

پس از طی زمان مورد نظر جهت تطابق موش‌ها (۲ هفته)، حیوانات به طور تصادفی در۵ گروه قرار گرفته و به ترتیب بادوزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ٤۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره‌ی هیدرو الکلی گیاه علف چای (گروه درمانی) و یا دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از داروی دیکلوفناک، یک ساعت قبل از القاء

پریتونیت درمان شدند. موش‌های گروه شاهد هم حجم موش‌های گروه تیمار بافر PBS دریافت نمودند.

برای القای پریتونیت، بدین منظور زیموزان مشتق از مخمر Saccharomyces cerevisiae (سیگما آمریکا) در شرایط استریل با بافر PBS در غلظت نهایی ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر حل شد. در زمان القای بیماری (یک ساعت بعد از تزریق اجزای ضدالتهاب) به هر موش به‌صورت داخل صفاقی ۲۰۰ میکرو لیتر از محلول فوق تزریق شد(۴).

چهل و هشت ساعت پس از تزریق زیموزان، موش‌ها با جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند. سپس حفره صفاقی موش‌ها لاواژ شد. برای این منظور شکاف کوچک، حدود ۰/۵ سانتی‌متری در خط میانی شکم ایجاد شد تا اجازه داده شود پوست شکم به سمت عقب کشیده شود که بعداً با اسپری اتانول ۷۰ درصد اسپری شد. ۵ میلی‌لیتر بافر PBS سرد حاوی ۰/۲ میلی‌مولار EDTA در شرایط استریل به داخل صفاق موش‌ها تزریق شد. پس از ماساژ حفره صفاقی، مایع لاواژ از حفره صفاقی به‌آرامی‌استخراج شد. مایع به یک لوله سانتریفیوژ ۱۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد. نمونه آسپیره شده بلافاصله با سانتریوفیوژ در ۲۰۰۰ دور در دقیقه در طی ۲۰ دقیقه سانتریوفیوژ شده و بخش سلولی و مایع رویی جدا گردیدند. از بخش رویی جهت سنجش نیتریک اکسید و تست‌های الایزا استفاده شد. بخش پلاک سلولی جهت سنجش انفجار تنفسی و شمارش سلول‌ها استفاده شد.

به‌منظور حذف گلبول‌های قرمز احتمالی و رنگ‌آمیزی بخش سلولی، بخش پلاک سلولی با بافر هنکس به حجم اولیه رسانده شد. سپس با کشیدن ته لوله فالکون روی یک سطح ناصاف به‌آرامی و بدون آسیب رساندن به سلول‌های لکوسیت، سلول‌ها به حالت سوسپانسیون درآمدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی به نسبت ۱ به ۲۰ با محلول مارکانو رقیق شد. مخلوط حداقل به مدت ۵ دقیقه به آرامی تکان داده شد و ٤٠ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی که با محلول مارکانو به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق شده بود، بین لام نئوبار و لامل به آرامی تزریق شد و سلول‌ها در زیر میکروسکوپ معمولی شمارش شد. پنج خانه از جداول لام نئوبار شمارش شده، سپس عدد به دست آمده در پنج (برای ۲۵ خانه بودن لام نئوبار) و سپس در بیست (به دلیل رقیق شدن نمونه با محلول مارکانو) و سپس در $۱۰^{٤}$ ضرب شد. حاصل محاسبه تعداد سلول‌ها در یک میلی‌لیتر نمونه می‌باشد.

به منظور شمارش تفریقی لکوسیت‌ها از رنگ‌آمیزی گیمسا استفاده شد. در نهایت در هر لام در قسمت‌های مختلف ۱۰۰ سلول شمارش شده و نسبت نوتروفیل به مونوسیت محاسبه شد.

برای انجام تست NBT(انفجار تنفسی)، ۰/۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی با ۰/۵ میلی‌لیتر محلول NBT یک‌دهم در صد در بافر هنکس و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول مخمر اپسونیزه($۱۰^{۸}$ سلول در میلی‌لیتر) مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ٥ درصد دی اکسید کربن انکوبه شد.

نمونه با دور ۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از حذف مایع رویی برداشته شد، چند قطره متانول ۷۰ درصد به محتویات لوله فوق اضافه شد و ۱۰ دقیقه جهت تبخیر الکل در محیط آزمایشگاه قرار داده شد. با استفاده از بافر حجم این محتویات لوله حجم اولیه رسانده شد. مقدارهای ۲۰۰ میکرو لیتری از محتویات این لوله در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته تخت اضافه گردید. به هرکدام از این چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر KOH ۲ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید. درنهایت داده‌های این آزمایش با قرائت پلیت ۹۶ خانه ته تخت در دستگاه الایزا نگار با طول موج ۴۹۲ نانومتر مشخص شد(۴).

میزان تولید نیتریک اکسید در سرم به وسیله روش رنگ سنجی گریس و استفاده از منحنی استاندارد نیتریت سدیم تعیین گردید. به‌طور خلاصه، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه مایع لاواژ شده به صورت دوتایی به داخل چاهک‌های پلت ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول ۱ درصد سولفانیل آمید به چاهک‌ها اضافه شد. پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق نگاه‌داری شد. آنگاه به تمام حفره‌ها ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول ۱ درصد N-۱-۱ نفتیل اتیلن دی‌آمین‌دی‌هیدرو کلراید اضافه شد و بار دیگر به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق نگاه‌داری شد. در نهایت جذب نوری نمونه در طول‌موج ۵۳۰ نانومتر به وسیله دستگاه الایزانگار 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(۱۶).

سنجش سایتوکاین‌ها در بخش مایع، برای سنجش هر یک از سایتوکاین‌های TNF-α، IL-1 و IL-6 از کیت‌های ELISA مربوطه(شرکت Peprotech- بریتانیا) استفاده شد و بر طبق دستوالعمل مندرج در دفترچه راهنمای هر کدام از کیت‌ها اقدام گردید.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز کروسیکال والیس، آزمون مان ویتنی یو تعدیل بونفرونی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

در حین شمارش تعداد کلی سلول‌ها و هم‌چنین شمارش تفریقی آن‌ها از محلول مارکانو که حاوی متیلن بلو است، به‌منظور حذف گویچه‌های قرمز استفاده شد. رنگ‌آمیزی به‌وسیله متیلن بلو، تفریق بین لوکوسیت‌ها را به دلیل تفاوت در مورفولوژی سلول و هسته ممکن می‌سازد. مونوسیت‌ها و ماکروفاژها به وسیله هسته‌های کلیوی شکل و سیتوپلاسم وسیع شان تشخیص داده می‌شوند. نوتروفیل‌ها به وسیله هسته‌های چندلوبی و سیتوپلاسم بسیار کمتر از مونوسیت‌ها و ماکروفاژها آشکار می‌شوند. لنفوسیت‌ها به راحتی به وسیله هسته‌های کروی و سیتوپلاسم بسیار کوچک قابل شناسایی هستند.

بر این اساس نمودار ۱ـ الف مشخص است که عصاره‌های هیدروالکلی هم‌راستا با دیکلوفناک منجر

به کاهش معنی‌دار در میزان تام ارتشاح سلول به داخل صفاق موش‌های مبتلا به پریتونئیت شده است، به طوری که دیکلوفناک منجر به کاهش ۵۲ درصدی در میزان سلول‌های ارتشاح یافته به صفاق موشهای مبتلا شده و تحت درمان با دیکلوفناک نسبت به موش‌های شاهد(مبتلا و دریافت کننده PBS) شده است. این نسبت در موش‌های دریافت کننده عصاره در دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ترتیب به میزان ۳۲ ، ۳۹ و ۴۶ درصد نسبت به موشهای گروه شاهد کاهش یافته است. آنالیز آماری داده‌ها نشان داد باوجودی که با افزایش دوز عصاره تعداد سلول‌های ارتشاح یافته در موش‌های مبتلابه پریتونئیت کاهش می‌یابد، ولی تغییر یاد شده ازنظر آماری معنی‌دار نیست(عدم وابستگی به دوز، نمودار ۱). هم‌چنین با وجود کاهش بیشتر در سطح سلول‌های ارتشاح یافته به وسیله دیکلوفناک، به نظر نمی‌رسد که تفاوت معنی‌داری بین عملکرد عصاره‌های هیدرو الکلی و هم‌چنین داروی دیکلوفناک وجود داشته باشد(نمودار ۱-الف).

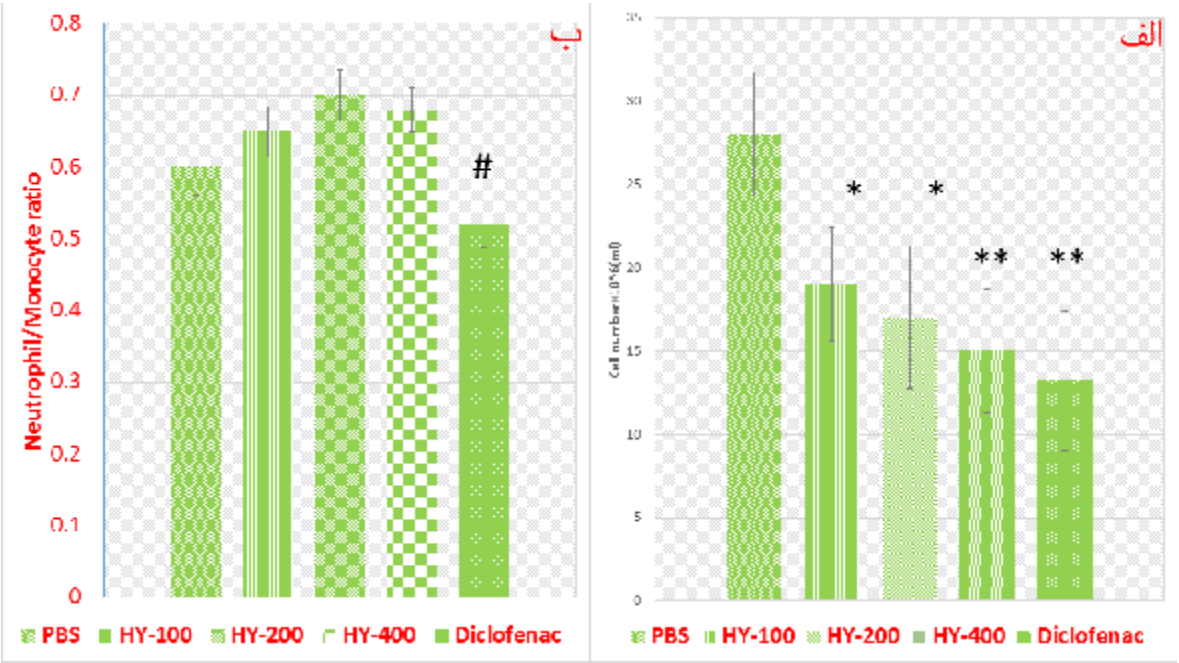
نسبت سلول‌های نوتروفیل به مونوسیت در گروه شاهد به طور متوسط(۰/۰٤ ± ۰/٦)بود. این نسبت در گروه‌های دریافت کنده عصاره در دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ترتیب به میزان(۰/۰۳٤ ± ۰/٦٥)، (۰/۰۳۵ ± ۰/۷) و (۰/۰۳± ۰/٦٨) رسید. ارزیابی شمارش تفریقی سلول‌های موجود در محوطه بطنی موش‌های مبتلا به پریتونئیت مشخص کرد با وجود این که عصاره هیدروالکلی منجر به کاهش تعداد کلی سلول‌های واردشده به صفاق شد، ولی بر روی نسبت نوتروفیل به مونوسیت‌ها تأثیر خاصی ندارد(نمودار ۱-ب). نسبت سلول‌های نونروفیل به مونوسیت در گروه دریافت کننده دیکلوفناک(۰/۰۳۲ ± ۰/۵۲) بود. بر اساس آنالیز آماری به نظر می‌رسد که برخلاف عصاره‌های هیدرو الکلی، دیکلوفناک منجر به کاهش معنی‌دار در نسبت نوتروفیل به مونوسیت در مایع ارتشاحی به صفاق می‌شود(نمودار ۱-ب).

در تست احیای NBT توانایی و ظرفیت سلول‌های ایمنی ذاتی در تولید رادیکال‌های آزاد به ویژه آنیون سوپراکسید مشخص می‌گردد. آنیون سوپر اکسید تولید شده، ماده رنگیNBT (زرد، شفاف و محلول در آب) را احیا نموده و به فورمازان آبی نامحلول در داخل نوتروفیل تبدیل می‌کند. میزان فورمازان تولید شده با روش فتومتری برای ارزیابی عملکرد انفجار تنفسی نوتروفیل اندازه‌گیری شد(نمودار ۲-الف). شدت انفجار تنفسی در همه دوزهای عصاره هیدروالکلی و هم‌چنین داروی دیکلوفناک کاهش معنی‌داری می‌یابد. داده‌ها نشان داد که دیکلوفناک منجر به کاهش ٤۷ درصدی در شدت انفجار تنفسی در سلول‌های ارتشاح یافته به صفاق در موش‌های مبتلا شده و تحت درمان با دیکلوفناک نسبت به موش‌های شاهد شده است. این نسبت در موش‌های دریافت کننده عصاره در دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ترتیب به میزان ۱۵ ،۳۵ و ۴۵ درصد نسبت به موش‌های گروه شاهد کاهش یافته است. آنالیز نتایج به دست‌آمده هم‌چنین

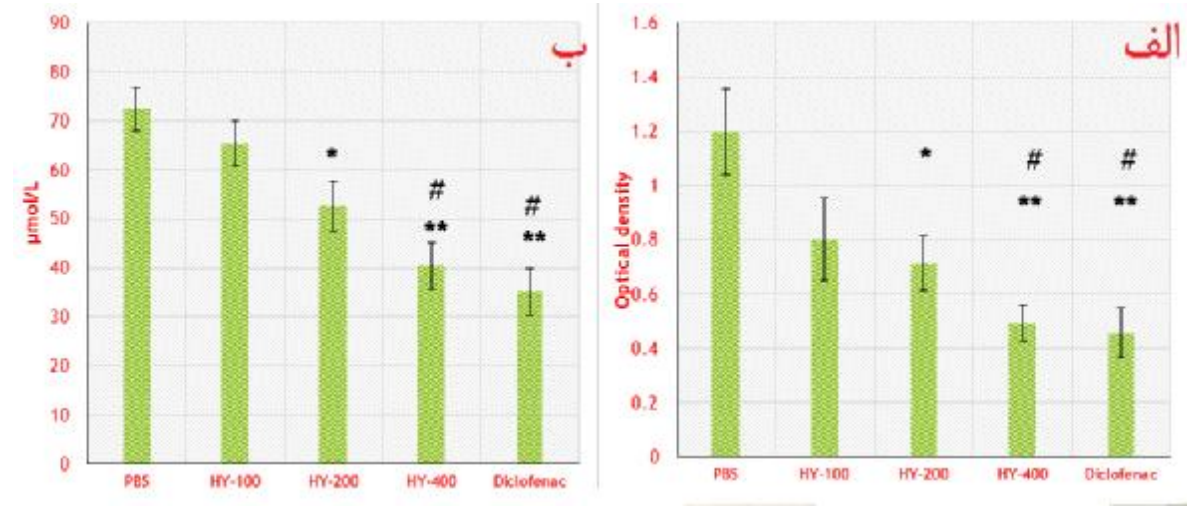
نشـــان داد کـــه شـــدت انفجـــار تنفســـی در دوز ٤٠٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره هیدرو الکلی گیاه علف چـای هـیچ تفـاوت معنـی‌داری بـا داروی دیکلوفنـاک ندارد(نمودار ۲ـالف).

نیتریک اکسید از اکسیداسیون درون‌سـلولی ال ـ آرژینین به وسـیله نیتریـک اکسـید سـنتتازها تولیـد می‌شود. اکسید نیتریت به‌شدت ناپایدار است و در اثـر اکسیداسیون به نیترات و نیتریت تبـدیل مـی‌شـود کـه مـی‌تـوان مقـدار آن را بـه روش رنـگ سـنجی گـریس تعیین نمود. نتایج نشـان داد کـه دیکلوفنـاک منجـر بـه کـاهش ٥١ درصـدی در نیتریـک اکسـاید موجـود در لاواژ صـفاقی نسـبت بـه مـوش‌هـای مبـتلا شـده ازموش‌های شـاهد شـد. میـزان نیتریـک اکسـاید لاواژ صـفاقی در مـوش‌هـای دریافـت کننـده عصـاره در دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گـرم بـر کیلـوگرم بـه ترتیـب بـه میـزان ۹ ، ۳۷ و ۴۴ درصـد نسـبت بـه موش‌های گروه شاهد کاهش یافته است. آنالیز آماری مشخص کرد که عصاره هیدروالکلی گیاه علـف چـای در دوز ۱۰۰ میلـی‌گـرم بـر کیلـوگرم منجـر بـه تغییـر معنی‌داری در سطح تولید نیتریک اکسید نشـد(نمـودار ۲ــب). تولیـد نیتریـک اکسـید بـه‌طـور معنـی‌داری در دوزهای ۲۰۰ و ٤٠٠ میلی‌گرم بر کیلـوگرم از عصـاره هیـدرو الکلـی و هـم‌چنـین داروی دیکلوفنـاک کـاهش می‌یابد. در اینجا به نظر می‌رسد که شدت کاهش تولید نیتریک اکساید در حین استفاده از دوز ٤٠٠ میلی‌گـرم بر کیلوگرم از عصاره هیـدرو الکلـی گیـاه علـف چـای هـیچ تفـاوت معنـی‌داری بـا داروی دیکلوفنـاک نـدارد (نمودار ۲ـ ب).

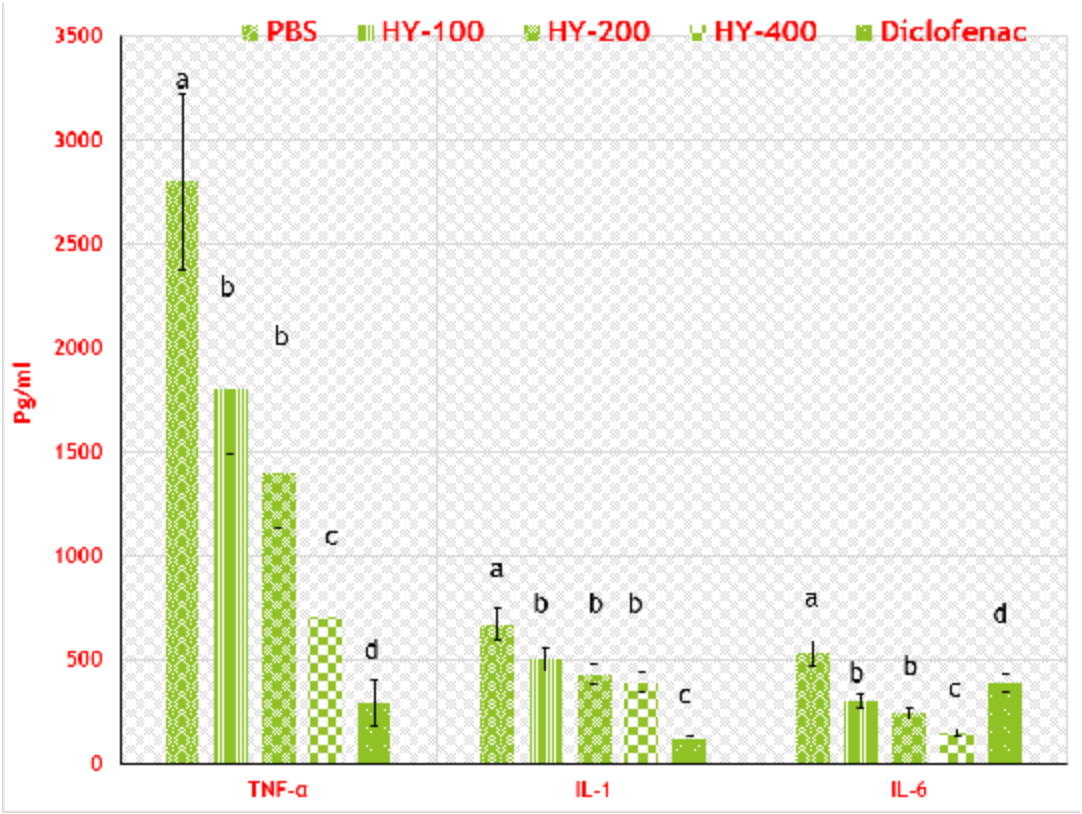
مطابق نمودار ۳، بـه نظـر مـی‌رسـد کـه پـیش درمانی موش‌های مبتلا شده با عصـاره هیـدرو الکلـی علف چای موجب کاهش معنی‌دار تولیـد IL-1 و IL-6 و TNF-αشـده اسـت. بـر ایـن اسـاس سـطح IL-1 در موش‌های مبتلا و دریافت کننده دیکلوفنـاک بـه میـزان ۸۰ درصـد و در مـوش‌هـای مبـتلا و دریافـت کننـده عصـاره در دوزهـای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلـی‌گـرم بـر کیلوگرم به ترتیب به میزان ۳۵، ۲۵ و ۴۱ درصد نسبت به موش‌های گروه سالم کـاهش یافـت. کـاهش سـطح TNF-α نیز بـه ترتیـب در مـوش‌هـای مبـتلا و دریافـت کننده دیکلوفناک و عصاره به میزان ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به میـزان نسـبت بـه مـوش‌هـای گروه سالم کاهش یافت. البته سطح IL-6 در موش‌هـای مبتلا و دریافت کننده دیکلوفناک به میـزان ۲٦ درصـد و در موش‌هـای دریافـت کننـده عصـاره در دوزهـای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بـه ترتیـب بـه میزان ۴۳، ۵۴ و ۷۱ درصد نسبت به موش‌هـای گـروه سالم کاهش یافت. آنالیز آماری مشـخص کـرد کـه در کـاهش اینترلـوکین ۱ بـین دوزهـای مختلـف عصـاره تفاوت معنی‌داری وجود نداشـت، امـا کـاهش TNF-α و اینترلوکین ٦ به‌صورت کاملاً وابسته بـه دوز عصـاره هیدروالکلی علف چای صورت گرفته اسـت. بـه‌عـلاوه نمودار ۳ نشان داد که در زمینـه کـاهش سـطح تولیـد TNF-αو اینترلوکین ۱، دیکلوفناک قـوی‌تـر از دوزهـای مختلف عصاره عمل کرده اسـت. بـااین‌حـال درزمینـه کـاهش تولیـد اینترلـوکین ٦، عصـاره هیـدرو الکلـی بـه‌خصـوص در دوز ٤٠٠ میلـی‌گـرم بـر کیلـوگرم به‌صورت مؤثرتری عمل کرده است.



نمودار ۱. الف)ارزیابی تعداد کلی سلول‌های ارتشاح یافته به صفاق موش‌های سالم و مبتلا به پریتونیت . ب) ارزیابی تغییرات نسبت نوتروفیل به مونوست در سلولهای استحصالی از لاواژ صفاق موش‌های سالم و مبتلابه پریتونئیت.* و ** به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح p<۰/۰۱ و p<۰/۰۰۱ نسبت به موش‌های مبتلا و بدون درمان می‌باشد. # نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح p<۰/۰۱ نسبت به سایر گروه‌ها می‌باشد (PBS :گروه مبتلا به پروتونئیت و درمان شده با پلاسبو، HY-100،HY-200 و HY-400 :گروه مبتلا به پروتونئیت و درمان شده با عصاره هیدروالکلی علف چای در دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ،Diclofenac: گروه مبتلا به پروتونئیت و درمان شده با دیکلوفناک با دوز ۱۰ mg/kg).



نمودار ۲. الف) ارزیابی شدت انفجار تنفسی در سلول‌های استحصالی از لاواژ صفاق موشهای مبتلابه پریتونیت. ب) ارزیابی میزان تولید نیتریک اکسید در مایع رویی لاواژ صفاق موش‌های مبتلابه پریتونیت. * و ** به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح p<۰/۰۱ و p<۰/۰۰۱ نسبت به موش‌های مبتلا و بدون درمان می‌باشد. # نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح p<۰/۰۱ نسبت به موش‌های دریافت‌کننده عصاره به میزان ۱۰۰ و یا ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌باشد (PBS :گروه مبتلا به پروتونئیت و درمان شده با پلاسبو، HY-100،HY-200 و HY-400 :گروه مبتلا به پروتونئیت و درمان شده با عصاره هیدروالکلی علف چای در دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ،Diclofenac: گروه مبتلا به پروتونئیت و درمان شده با دیکلوفناک با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم).



نمودار۳. ارزیابی میزان تولید سایتوکاینها در مایع رویی لاواژ صفاق موش‌های مبتلابه پریتونئیت. حروف غیر همسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد (PBS :گروه مبتلا به پروتونئیت و درمان شده با پلاسبو، HY-200،HY-100 و HY-400 :گروه مبتلا به پروتونئیت و درمان شده با عصاره هیدروالکلی علف چای در دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ،Diclofenac: گروه مبتلا به پروتونئیت و درمان شده با دیکلوفناک با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم).

بحث

بیماری‌های التهابی همواره به عنوان یک چالش در زندگی انسانها مطرح بوده اند. داروهای ضدالتهابی در دسترس به دلیل عوارض بالا و سایر مشکلات ممکن است که همیشه در همه موارد مفید نباشند. در همین راستا امروزه توجه زیادی به گیاهان دارویی شد(۱۷). در ارتباط با اثرات تعدیل‌کننده ایمنی گیاه علف چای، به وسیله ابطحی و همکاران (۲۰۱۵) مطالعه‌ای صورت گرفته است. در این مطالعه نشان داده شده است که در موش‌های تحت تیمار با عصاره علف چای، میزان تولید آنتی‌بادی اختصاصی علیه گویچه‌های قرمز گوسفندی افزایش یافته و همچنین شدت پاسخ‌های ایمنی سلولی به‌صورت شدت واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری و همچنین میزان تکثیر لنفوسیت‌های T در جمعیت سلول‌های طحالی کاهش یافته است. بنابراین به نظر می‌رسد که تجویز عصاره هیدروالکلی گیاه علف چای موجب کاهش فعالیت‌های ایمنی سلولی و افزایش پاسخ‌های ایمنی هومورال می‌شود(۱۵).

تحقیق‌های قبلی در شرایط برون تنی مشخص کرده است که ترکیب‌های موجود در گیاه علف چای از قبیل هایپرفورین میزان بیان ژن‌های سیکلوژناز در مونوسیت ماکروفاژها کاهش می‌یابد(۱۸). هم‌چنین مشخص شده است که عصاره گیاه علف چای موجب مهار فعالیت آنزیم‌های سیکلواکسیژناز و ۵ـ لیپواکسیژناز خالص شده می‌گردد(۲۰). فراورده‌های آنزیم سیکواکسیژناژ و لیپواکسیژناژ نقش اساسی و مهمی را در راه اندازی واکنش‌های التهابی و فراخوانی سلول‌های ایمنی به محل بافت ملتهب از طریق تولید پروستانوئیدها و لکوترین‌ها بازی می‌کنند(۱۹ و ۵). یکی از اولین مظاهر التهاب فراخوانی سلول‌های التهابی است(۵). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در شرایط پریتونیت القاشده توسط زیموزان، عصاره‌های هیدروالکلی و هم‌چنین دیکلوفناک، منجر به کاهش معنی‌دار در میزان ارتشاح سلول به داخل صفاق شده است. بااین‌حال به نظر نمی‌رسد که تفاوت معنی‌داری بین عملکرد عصاره‌های هیدروالکلی و هم‌چنین داروی دیکلوفناک وجود داشته باشد. هم‌چنین بر اساس نتایج به دست آمده، به نظر نمی‌رسد که عملکرد عصاره در کاهش تعداد سلول‌های ورودی به بافت ملتهب به صورت وابسته به دوز باشد. باوجود این که عصاره هیدرو الکلی منجر به کاهش تعداد کلی سلول‌های وارد شده به صفاق شد، ولی بر روی نسبت نوتروفیل به مونوسیت‌ها تأثیر خاصی نداشت. در عین حال به نظر می‌رسد برخلاف عصاره‌های هیدرو الکلی دیکلوفناک منجر به ورود انتخابی‌تر سلول‌های مونوسیت به داخل صفاق می‌گردد. احتمالاً دیکلوفناک با تغییر تأثیرگذاری بر روی بروز مولکول‌های چسبان یا تغییر بروز الگوهای کموکاینی تولیدشده به وسیله سلول‌های اندوتلیال منجر به تغییر ترافیک سلولی شده است.

نابودسازی یک عامل عفونی به وسیله سلول‌های ایمنی ذاتی به همکاری بخش‌های لیزوزومی و هم‌چنین تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن مرتبط می‌باشد(۲۱و ۲۰). تولید بیش‌ازحد رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن در ایجاد و گسترش آسیب‌های بافتی ایجادشده در طی یک فرآیند حاد التهابی نقش زیادی بازی می‌کند، به‌طوری که بسیاری از علایمی که در مدل‌های التهابی حاد از قبیل پریتونئیت مشاهده می‌شود ناشی از تولید لجام‌گسیخته و مضر واسطه‌های التهابی، از قبیل؛ رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتریک اکسید خواهد بود(۴). بر اساس نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد که تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و هم‌چنین نیتریک اکسید، به‌طور معنی‌داری در دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ از عصاره هیدرو الکلی و هم‌چنین داروی دیکلوفناک کاهش می‌یابد. نتایج به‌دست آمده هم‌چنین نشان داد که کاهش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن در دوز ۴۰۰ از عصاره هیدروالکلی گیاه علف چای هیچ تفاوت معنی‌داری با داروی دیکلوفناک ندارد، از

این جهت تأثیر عصاره گیاهی قابل مقایسه با دیکلوفناک می‌باشد. در همین راستا نشان داده شده است که میزان شدت انفجار تنفسی در سلول‌های فاگوسیت کننده طحالی در موش‌های دریافت‌کننده عصاره علف چای و تیمار شده با گویچه‌های قرمز گوسفندی در مقایسه با موش‌هایی که تنها با گویچه‌های قرمز گوسفندی ایمن شده بودند، کاهش معنی‌داری یافته است(۱۵).

در گذشته نشان داده شده است که هایپرفورین قادر به تعدیل تولید نیتریک اکسید در سلول‌های میکروگلیا و ماکروفاژ می‌باشد. هم‌چنین هایپرفورین، قادر به کاهش میزان فاگوسیتوز زیموزان به وسیله سلول‌های ماکروفاژ به میزان ۴۰-۲۰ درصد از طریق کاهش مانوز- رسپتور و تعدیل حرکت سلولی می‌باشد(۱۸)، بنابراین ممکن است که قسمتی از کاهش میزان تولید نیتریک اکسید و انفجار تنفسی و هم‌چنین تغییر در حضور سلول‌ها که ما در این مطالعه مشاهده کردیم به دلیل تأثیر هایپرفورین موجود در عصاره هیدرو الکلی و از طریق مشابه با مکانیسم گزارش شده در مطالعه یادشده باشد. هم‌چنین مشخص شده است که فلاونوئیدها و بسیاری از ترکیب‌های دیگر موجود در گیاه، خاصیت آنتی‌اکسیدانتی دارند(۲۳ و۲۲). این مسئله ممکن است که تا حدودی اثرات کاهنده تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن به وسیله عصاره را توجیه کند.

در تحقیقی که به وسیله ابطحی و همکاران صورت گرفته به ارزیابی پاسخ‌های سیتوکاینی در جمعیت سلول‌های طحالی موش‌های ایمن شده با گویچه‌های قرمز گوسفند نیز پرداخته شده است. در این مطالعه نشان داده شده است که استفاده از عصاره هیدروالکلی منجر به کاهش تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی اینترلوکین۱۷ و اینترفرون گاما وسایتوکاین التهابی اینترلوکین۶ شده است. سطح اینترلوکین۱۰ به‌عنوان یک عامل ضدالتهابی کاهش معنی‌داری نشان نداد. هرچند که نسبت اینترفرون گاما به اینترلوکین۱۰ واینترلوکین۱۷ به اینترلوکین ۱۰ به‌طور معنی‌داری به نفع اینترلوکین۱۰ تغییر یافت(۱۵). ارزیابی ما در رابطه با تولید سیتوکین‌های التهابی نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار تولید اینترلوکین ۱ و اینترلوکین ۶ و TNF-α به وسیله روش‌های درمانی ما بود. کاهش TNF-α و اینترلوکین ۶ به صورت کاملاً وابسته به دوز در رابطه با عصاره هیدروالکلی علف چای صورت گرفت. البته در کاهش اینترلوکین ۱ بین دوزهای مختلف عصاره تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. در زمینه کاهش تولید TNF-α واینترلوکین ۱ به نظر می‌رسد که دیکلوفناک قوی‌تر از دوزهای مختلف عصاره عمل کرده است. در گذشته نیز نشان داده شده است که فلاونوئیدهای موجود در گیاه همراه با سودوهایپرسین و هایپرفورین موجود، موجب مهار واسطه‌های التهابی از قبیل اینترلوکین ۱ و TNF-α می‌شوند(۹). هرچند که درزمینه کاهش تولید اینترلوکین ۶ عصاره هیدرو الکلی به‌خصوص در دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت مؤثرتری عمل

کرده است. به نحو جالب توجهی در مطالعه‌های گذشته نیز ذکر گشته است که عمده اثرات ضدافسردگی این گیاه مربوط به کاهش سطح اینترلوکین ٦ در مغز مبتلایان به افسردگی بوده است(٢٤و١٠). در اینجا نیز مزیت عصاره هیدروالکلی نسبت به داروی دیکلوفناک در کاهش اینترلوکین ٦ مشاهده شد. درگذشته نیز به وسیله محمودی و همکاران مطالعه‌ای در رابطه با اثرات ضدالتهابی و ضد دردی گیاه علف چای در مدل ایجاد ادم به وسیله کاراژینان وضد دردی به وسیله فرمالین و صفحه داغ انجام شده است. بر این اساس محققین گزارش کرده‌اند که عصاره گیاه علف چای با دوزهای ١٠٠ و ١٥٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم اثر مشابهی در کاهش ادم ایجادشده به وسیله کاراژینان، در مقایسه با داروی ضدالتهاب استاندارد دیکلوفناک در دوز٤ میلی‌گرم بر کیلوگرم نشان داده است. در آزمون فرمالین نیز گیاه علف چای به‌طور معنی‌داری موجب کاهش شدت درد شده بود(٢٥). هم‌چنین نشان داده شده است که ماکروفاژهای تیمار شده با برخی از اجزای عصاره گیاه علف چای از قبیل سودوهایپرسین، آمنوفلاوون و کوئرستین منجر به کاهش بیان آنزیم سیکلوژناز٢ و تولید نیتریک اکسید پس از تحریک با LPS می‌شود. کاهش سطح سیتوکاین‌های اینترلوکین٦ ، TNF-α واینترلوکین١ بتا نیز درماکروفاژهای تحریک‌شده با LPS و تحت تیمار با کوئرستین گزارش شده است(٢٧ و ٢٦).

در نهایت ذکر این نکته لازم است که میزان LD50 در مورد سمیت حاد عصاره گیاه علف چای در مطالعه‌های گذشته در صورت تجویز داخل صفاقی ١١١١١/٤٧میلی‌گرم بر کیلوگرم در موش سوری تعیین شده است(٢٥). دوزهای استفاده‌شده در این مطالعه به مراتب از سطح قابل ایجاد مسمومیت کمتر بوده است. با توجه به یافته‌های این تحقیق به خوبی مشخص است که استفاده از عصاره هیدروالکلی علف چای به صورت قابل مقایسه با داروی استاندارد دیکلوفناک، به عنوان یک ضد التهاب غیر استروئیدی عمل کرده و منجر به کاهش التهاب حاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری

در مجموع یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره هیدروالکلی گیاه علف چای می‌تواند به عنوان یک منبع طبیعی برای کنترل التهاب از طریق تأثیرگذاری بر عملکردهای سلول‌های ایمنی ذاتی به کار رود.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه دکتری حرفه ای دامپزشکی بوده که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه انجام شده است. نویسندگان این مقاله از کارشناس محترم آزمایشگاه ایمنی شناسی دانشکده دامپزشکی، اصغر علیاری کمال تشکر را دارند.

REFERENCES

1.Kratofil RM, Kubes P, Deniset JF. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. Trends Immunol 2016; 32(10): 470–7.
2.Ajuebor MN, Flower RJ, Hannon R, Christie M, Bowers K, Verity A, et al. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 recruits monocytes in the zymosan peritonitis model. J Leukoc Biol 1998; 63(1): 108-16.
3.Carlo T, Levy BD. Molecular circuits of resolution in airway inflammation. Scientific World J 2010; 10: 1386-99.
4.Cash JL, White GE, Greaves DR. Zymosan-induced peritonitis as a simple experimental system for the study of inflammation. Methods Enzymol 2009; 461: 379-96.
5.Sheldon IM, Owens SE, Turner ML. Innate immunity and the sensing of infection, damage and danger in the female genital tract. J Reprod Immunol 2016; S0165-0378(16): 30027-4.
6.Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. Biomark Res 2014; 2: 1.
7.Sen T, Samanta SK. Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. Adv Biochem Eng Biotechnol 2015; 147: 59-110.
8.Sofowora A, Ogunbodede E, Onayade A. The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. Afr J Tradit Complement Altern Med 2013; 10(5): 210-29.
9.Huang N, Singh N, Yoon K, Loiacono CM, Kohut ML, Birt DF. The immuno-regulatory impact of orally-administered hypericum perforatum extract on balb/c mice inoculated with h1n1 influenza a virus. PLoS One 2013; 8: e76491.
10.Oliveira AI, Pinho C, Sarmento B, Dias AC. Neuroprotective activity of Hypericum perforatum and its major components. Front Plant Sci 2016; 7: 1004.
11.Ben-Eliezer D, Yechiam E. Hypericum perforatum as a cognitive enhancer in rodents: A meta-analysis. Sci Rep 2016; 6: 35700.
12.Ni J, Moulin P, Gianello P, Feron O, Balligand JL, Devuyst O. Mice that lack endothelial nitric oxide synthase are protected against functional and structural modifications induced by acute peritonitis. J Am Soc Nephrol 2003; 14: 3205–16.
13.Ni J, Verbavatz JM, Rippe A. Aquaporin-1 plays an essential role in water permeability and ultrafiltration during peritoneal dialysis. Kidney Int 2006; 69: 1518–25.
14.Rosengren BI, Rippe A, Rippe C, Venturoli D, Sward K, Rippe B. Transvascular protein transport in mice lacking endothelial caveolae. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006; 291: H1371–7.
15.Abtahi Froushani SM, Esmaili gouvarchin Galee H, Khamisabadi M, Lotfallahzade B. Immunomudulatory effects of hydroalcoholic extract of Hypericum perforatum. Avicenna J Phytomed 2015; 5(1): 62-8.
16.Shahmoradi M, Khezri SH, Abtahi Froushani SM. The Effects of Nicotine on the Stimulation of the Cholinergic System and Immune Responses Changes in Animal Models of Multiple Sclerosis. rmaghane-danesh 2016; 21 (3): 212-224.
17.Jesuthasan AS, Uluwaduge DI.Ethnobotanics used in folk medicine of Tamil culture in Sri Lanka: a scientific review. J Integr Med 2017; 15(1): 19-26.
18.Kraus B, Wolff H, Elstner EF, Heilmann J. Hyperforin is a modulator of inducible nitric oxide synthase and phagocytosis in microglia and macrophages. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2010; 381(6): 541-53.
19.Albert D, Zündorf I, Dingermann T, Müller WE, Steinhilber D, Werz O. Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. Biochem Pharmacol 2002 15; 64(12): 1767-75.
20.Esmaili Gouvarchin galeh H, Delirezh N, Abtahi Froushani SM, Afzale Ahangaran N. Calcitriol modulates the effects of the supernatants of bone marrow–derived mesenchymal stem cells on neutrophil functions. Turk J Biol 2014; 38: 365-370.
21. Mansouri Motlagh B, Afzale Ahangaran N, Abtahi Froushani SM. Calcitriol modulates the effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on macrophage functions. Iran J Basic Med Sci 2015; 18: 672-6.
22.Ghosian Moghaddam MH, Roghani M, Maleki M. Effect of Hypericum perforatum Aqueous Extracts on Serum Lipids, Aminotransferases, and Lipid Peroxidation in Hyperlipidemic Rats. Res Cardiovasc Med 2016; 5(2): e31326.

23.Saddiqe Z, Maimoona A, Abbas G, Naeem I, Shahzad M. Pharmacological screening of Hypericum androsaemum extracts for antioxidant, anti-lipid peroxidation, antiglycation and cytotoxicity activity. Pak J Pharm Sci 2016; 29(2): 397-405.
24.Canning S, Waterman M, Orsi N, Ayres J, Simpson N, Dye L. The efficacy of Hypericum perforatum (St John's wort) for the treatment of premenstrual syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. CNS Drugs 2010; 24(3): 207-25.
25.Mahmoudi M, Javanmardi A, Semnani K , Saeedi M. The anti-inflamatory ,anti nociceptive, acute toxicity and determination of hypercine on Hypericum perforatum .Journal of Babol University of Medical Seinnce 2016; 8(4): 7-14.
26.Huang N, Rizshsky L, Hauck CC, Nikolau BJ, Murphy PA, Birt DF.The inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage inflammation by 4 compounds in Hypericum perforatum extract is partially dependent on the activation of SOCS3. Phytochemistry 2012; 76: 106-16.
27.Huang N, Rizshsky L, Hauck C, Nikolau BJ, Murphy PA, Birt DF. Identification of anti-inflammatory constituents in Hypericum perforatum and Hypericum gentianoides extracts using RAW 264.7 mouse macrophages. Phytochemistry 2011; 72(16): 2015-23.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

The effects of hydro- alcoholic extract of Hypericum perforatum on cell migration and inflammatory mediators production in acute peritonitis induced by Zymosan in NMRI mice

Ghasemi SH, Abtahi Froushani SM [*], Ownagh A

Department of Microbiology, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran.

Received: 26 Oct 2016 Accepted: 13 Feb 2017

Abstract

Background and aim: Zymosan-induced peritonitis model can use to study the recruitment of monocytes and neutrophils into the peritoneal cavity and to study the effects of existing and novel anti-inflammatory drugs. This study was conducted to evaluate the effects of hydroalcoholic extract of Hypericum Perforatum on acute peritonitis induced by Zymosan in NMRI mice.

Methods: Fifty male NMRI mice were randomly allocated in 10 equal gropes and treated with 0 ,100, 200 or 400 mg/kg of hydroalcoholic extract of H. Perforatum and or 10mg/kg diclofenac 1 hours before the induction of peritonitis. To induce peritonitis, each mouse intraperitoneally received 10 µg of zymosan in 0.4 ml of saline. After 48 h, the peritoneal cavity was lavaged by 5 ml of cold PBS and the isolated cells were used to evaluate cell differential count, nitric oxide production and severity of respiratory burst. Statistical dada tests were analyzed using the Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney and Bonferroni adjustment.

Results: The data showed that the nitric oxide and respiratory burst which was produced from exudate cells by peritoneal lavage in mice that received H. Perforatum at doses of 200 and 400 mg/kg or diclofenac compared to mice received normal saline were reduced. Total cell number in peritoneal cavity significantly decreased in all treatment group. However, no significant difference was observed between treatment groups with Hypericum perforatum extract. Using diclofenac or hydroalcoholic extract of H. Perforatum caused a significant decrease in the levels of TNF-α, IL-1 and IL-6. Diclofenac caused more profound reduction in the levels of TNF-α, IL-1 compared to extract. Nevertheless, the level of IL-6 was indicated a significant decrease in mice with peritonitis received hydroalcoholic extract especially in dose 400 mg/kg compared to mice with peritonitis received diclofenac.

Conclusion: In total it seems that the hydroalcholic extract of H. Perforatum may be a suitable as natural source to control inflammation caused by acute peritonitis.

Keywords: Peritonitis, Zymosan, Hypericum perforatum

[*]**Corresponding author: Abtahi Froushani SM,** Department of Microbiology, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia , Iran
Email: meysamabtahi@hotmail.com

Please cite this article as follows:
Ghasemi SH, Abtahi Froushani SM, Ownagh A. The effects of hydro- alcoholic extract of Hypericum perforatum on cell migration and inflammatory mediators production in acute peritonitis induced by Zymosan in NMRI mice. Armaghane-danesh 2017; 21 (10): 1041-1055.