

اثر ترمیمی گیاه کلپوره (*Teucrium polium* L.) بر کولیت ناشی از استیک اسید در موش بزرگ آزمایشگاهی

نادر تنیده^{۱*}، هدایت اله لشکری پور^۲، سجاد دانشی^{۳*}، سیده لیلی اسدی یوسف آباد^۴، امید کوهی حسین آبادی^۵، مسعود حسین زاده^۶، اکرم جمشید زاده^۲، سلیمان محمدی سامانی^۲، محمود امیدی^۷

^۱ گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران، ^۲ مرکز تحقیقات فناوری سلول های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران، ^۳ مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران، ^۴ کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران، ^۵ مرکز حیوانات آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران، ^۶ گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران، ^۷ گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۶/۵/۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: بیماری التهابی روده (IBD)، به صورت حالت مزمن در روده با علل ناشناخته شامل عوامل مختلف ایمنی، ژنتیکی و محیطی می باشد. امروزه در سراسر دنیا، بسیاری از ترکیب های گیاهی و تولیدی به عنوان فرآورده های ضدالتهاب استفاده می شود. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر ضدالتهابی عصاره آبی گیاه کلپوره *Teucrium polium* L. بر کولیت در موش بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۱۳۵ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر، با دامنه وزنی 20 ± 220 گرم و سن ۱۲-۱۰ هفته، به طور تصادفی به ۹ گروه مساوی تقسیم شدند. گروه کنترل سالم بدون القا کولیت، نرمال سالیین دریافت کردند، گروه کنترل منفی که کولیت با اسید استیک ۳ درصد القا و هیچ درمانی دریافت نشد، گروه ژل پایه که کولیت القا و ژل پایه را به صورت انما دریافت نمودند، دو گروه کنترل مثبت دریافت کننده آساکول (۱۰ کیلو گرم بر میلی گرم) به روش انما و مزالامین (۱۰ کیلو گرم بر میلی گرم) به روش خوراکی در نظر گرفته شد، هم چنین فرم خوراکی عصاره آبی در دو گروه با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ کیلو گرم بر میلی گرم و فرم ژل به صورت انما در دو گروه به صورت ۱۰ و ۲۰ درصد پس از القا کولیت در نظر گرفته شد. در پایان مطالعه، اندازه گیری شاخص آنتی اکسیدانی مالون دی آلدئید (MDA) و ارزیابی هیستوپاتولوژی بافت کولون انجام گرفت. داده های جمع آوری شده با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و من ویتنی یو تست تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: ژل انمای ۲۰ و ۱۰ درصد باعث ترمیم آسیب های پاتولوژی در سطح میکروسکوپی بافت کولون و کاهش مالون دی آلدئید گردید ($P < 0.01$). ژل ۲۰ درصد در مقایسه با گروه کنترل منفی اختلاف معنی داری را از لحاظ MDA نشان داد ($P < 0.01$). فرم خوراکی مسالازین و انمای آساکول به عنوان گروه های کنترل مثبت با یکدیگر و هم چنین فرم های خوراکی و انمای کلپوره تفاوت معنی داری را از نظر MDA نشان ندادند ($P < 0.01$). اگرچه فرم ژل انما در مقایسه با فرم عصاره آبی خوراکی گیاه، تفاوت معنی داری را نشان نداد، ولی فرم انما در کنترل التهاب اثر بهتری را نشان داد.

نتیجه گیری: گیاه کلپوره اثرات قابل ملاحظه ای بر روند التیام کولیت ایجاد شده در موش بزرگ سفید آزمایشگاهی نر دارد. با توجه به خواص ضد التهابی، آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی گیاه کلپوره، می توان گفت این گیاه در ترمیم زخم های روده ای مؤثر می باشد.

واژه های کلیدی: بیماری التهابی روده، *Teucrium polium* L.، موش بزرگ آزمایشگاهی نر، کولیت، گیاه کلپوره

*نویسنده مسئول: سیده لیلی اسدی یوسف آباد، یزد، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

Email: asadi_427@yahoo.com

مقدمه

بیماری‌های التهابی مزمن روده (IBD) مجموعه‌ای از بیماری‌های مزمن التهابی روده با علل نامعلوم است و شامل حالت‌هایی است که با تمایل برای فعالیت مزمن و یا عود کننده ایمونولوژیک و التهابی در دستگاه گوارش مشخص می‌شود (۱). دو فرم اصلی این بیماری عبارتند از کولیت زخمی (UC) و بیماری کرون (۲). این دو فرم اصلی در خصوصیات بالینی و اپیدمیولوژیک زیادی مشترک می‌باشند، به طوری که در بیشتر موارد نمی‌توان آن دو را بر اساس وضعیت بالینی از هم تشخیص داد (۳). کولیت زخمی، بیماری رکتوم و نواحی فوقانی‌تر کولون است و التهاب معمولاً سطحی و محدود به مخاط، ولی پیوسته است. اسهال، خونریزی از رکتوم، دفع بلغم و درد کرامپ شکمی نشانه‌های اصلی UC هستند (۴).

اساس درمان بیماری IBD خفیف تا متوسط، سولفاسالازین و سایر ترکیب‌های آمینوسالیسیلیک اسید می‌باشد (۵). وسعت و شدت بیماری قبل از شروع درمان باید مشخص شود. در بیماری خفیف تا متوسط درمان می‌تواند به صورت سرپایی صورت گیرد، ولی بیماران با تب شدید، ضربان قلب بالا، کم خونی، افزایش تعداد گلبول‌های سفید و درد شکم باید بستری شوند (۶). درمان‌های دارویی شامل داروهای ضد اسهال، داروهای ضد التهابی، آنتی‌بیوتیک‌ها و سرکوب کننده‌های سیستم ایمنی می‌باشد (۷).

با پیشرفت علم داروهای گیاهی، کولیت زخمی هم به وسیله انواع داروهای گیاهی مورد آزمایش قرار

گرفته است و اثر بخشی گیاهان دارویی مانند جینکو، قارچ صدفی و گل همیشه بهار در این بیماری مورد ارزیابی قرار گرفته است (۸). در مطالعه تجربی که به وسیله مانا صاحب و همکاران با استفاده از عصاره گیاه خنجرری روی کولیت زخمی موش بزرگ آزمایشگاهی انجام شد، کاهش میلوپروکسیداز و التهاب گزارش شد (۹). هم‌چنین تنیده و همکاران با بررسی اثر فرم‌های خوراکی و انما عصاره گل همیشه بهار بر کولیت زخمی در موش بزرگ آزمایشگاهی، گزارش کردند که این گیاه باعث کاهش سطح مالون دی‌آلدهید و جلوگیری از التهاب گردید (۱۰).

گیاه کلپوره، گیاهی است علفی، پایا، پرشاخه، به ارتفاع ۱۰ تا ۳۵ سانتی‌متر و دارای ظاهر سفید پنبه‌ای که معمولاً در نواحی بایر، سواحل سنگلاخی و ماسه‌زارهای نواحی اروپا، منطقه مدیترانه، شمال آفریقا و جنوب غربی آسیا من جمله ایران می‌روید (۱۱).

در مطالعه‌ای ترکیب‌های فرار به دست آمده از گیاه کلپوره را شناسایی کردند که α -کادینول، ۳-بتا هیدروکسی - آلفا مورولن، آلفا پینن، بتا پینن ترکیب‌های اصلی آن بودند (۱۲). در تحقیق دیگری که روی اسانس گیاه کلپوره جمع‌آوری شده از روستایی در کرمان انجام شد، ترکیب‌های آلفا پینن، لینالول، کاریوفیلن اکسید، بتا پینن و بتا کاریوفیلن را به عنوان ترکیب‌های اصلی گیاه شناسایی کردند (۱۱). حضور استرول و فلاونوئیدهایی مثل بتاسیتوسترول،

روش بررسی

در این مطالعه، تعداد ۱۲۵ سر موش بزرگ سفید آزمایشگاهی نر نژاد اسپراگ دولی با دامنه وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم و سن ۷ هفته از مرکز حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز خریداری شد. موش‌های بزرگ سفید آزمایشگاهی نر در اتاق پرورش تحت کنترل سازگار با محیط زیست (درجه حرارت 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد، رطوبت 50 ± 5 و ۱۲ ساعت چرخه روشنایی و تاریکی) نگهداری شدند. آن‌ها با غذای استاندارد آزمایشگاهی و آب تغذیه می‌شدند. حیوانات در قفس‌های جداگانه به مدت یک هفته قبل از شروع آزمایش نگهداری شده تا با شرایط سازگاری یابند. فعالیت‌های عملی این پایان‌نامه در مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز و بر اساس پروتکل‌های اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه با رعایت ملاحظات اخلاقی انجام شد.

گیاه کلپوره از شهرستان دهدشت واقع در استان کهگیلویه و بویراحمد جمع‌آوری گردید و به وسیله کارشناس گیاه‌شناسی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شیراز مورد بررسی قرار گرفت. سپس گیاه از نظر نژاد و گونه با هرباریوم رسمی تطابق یافت و مورد تأیید واقع شد و در دانشکده داخل هرباریوم با شماره PM-144 نگهداری شد.

اندام‌های هوایی گیاه در سایه و دور از نور مستقیم، خشک گردید. سپس مقدار ۱۰۰ گرم از پودر گیاه با ۵۰۰ سی‌سی اتانول ۷۰ درصد به مدت ۷۲

استیگمستترول، کامپستترول، براسی کاسترول و کلروستترول، گلوکز، فروکتوز و رامنوز در اسانس این گیاه نیز گزارش شده است (۱۳). آنالیز شیمیایی گیاه کلپوره مشخص کرد که حاوی ترکیب‌های فلاونوئیدها، ایریدوئیدها و سیرسیلیول می‌باشد (۱۴). در مطالعه‌ای که الکوایزی و همکاران با استفاده از عصاره گیاه کلپوره برای درمان مسمومیت کبد و کلیه انجام دادند، هیچ‌گونه تغییرات مضرری به لحاظ بیوشیمیایی و خونی مشاهده نکردند (۱۵). انصاری و همکاران نشان دادند که عصاره گیاه کلپوره منجر به تسریع در بهبودی زخم سوختگی درجه دو در موش می‌گردد (۱۶). هم‌چنین محمدی و همکاران گزارش کردند که گیاه کلپوره با داشتن ترکیب‌های فلاونوئیدی دارای اثرات معنی‌داری به لحاظ کاهش سطح سرمی مالون دی‌آلدئید و افزایش بازسازی بافت پوششی بر ترمیم زخم سوختگی در موش بزرگ آزمایشگاهی می‌باشد (۱۷). سویندیک و همکاران نشان دادند که عصاره گیاه کلپوره دارای اثرات ضد میکروبی علیه اش‌ریشیا کلای، استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد (۱۸).

با توجه به این که در مورد اثر فرم ژل موضعی به روش انما و مقایسه آن با فرم خوراکی در کولیت القا شده، تاکنون مطالعه‌ای صورت نگرفته است، هدف از این مطالعه بررسی اثر ضدالتهابی گیاه کلپوره *Teucrium polium L.* بر کولیت زخمی ناشی از استیک اسید در موش بزرگ سفید آزمایشگاهی نر بود.

ساعت در دستگاه پرکولاتور قرار داده شد. محلول حاصل که حاوی حلال الکلی و ماده استخراجی تام بود، به دستگاه روتاری انتقال داده شد تا حلال از آن جدا و کاملاً غلیظ گردد. در ادامه به کمک دسیکاتور متصل به پمپ خلاء حلال‌های اضافی جدا و عصاره کاملاً خشک گردید. مقدار ماده خشک حاصل از ۱۰۰ گرم عصاره هیدروالکلی گیاه کلپوره به روش پرکولاسیون ۳۶/۲ گرم بود.

جهت ساخت ژل پایه، ابتدا ۲ گرم از پودر کربوکسی متیل سلولز با مقدار کمی آب دیونیزه مخلوط گردید. سپس به وسیله همزن توربینی به هم زده و هم‌زمان به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد، و ژل‌های حاوی عصاره در دو غلظت ۱۰ و ۲۰ درصد تهیه گردید.

اندام‌های هوایی گیاه در سایه و دور از نور مستقیم خشک شد. پودر به دست آمده از اندام هوایی خشک شده گیاه با آب جوشیده به نسبت ۱ به ۱۲ در داخل بشر مخلوط شد. پس از بستن سر بشر با ورقه آلومینیومی به مدت یک ساعت، روی بن ماری با حرارت کمتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. مخلوط حاصل به مدت ۴۸ ساعت در درجه حرارت اتاق نگهداری شد. پس از دو روز محتویات درون بشر ابتدا با پارچه تنظیف، بعد به وسیله کاغذ صافی کاملاً صاف گردید. تفاله‌های به دست آمده یک بار دیگر با همان نسبت آب جوشیده، مخلوط گردید و مراحل قبلی روی آن انجام گرفت. محلول به دست آمده به وسیله روتاری تغلیظ گردید. بعد از آن که

عصاره حالت نیمه جامد به خود گرفت از بالن دستگاه روتاری خارج و پس از نگهداری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت به درون دستگاه Freeze-Dryer منتقل شد تا آب باقی مانده در عصاره کاملاً خارج شود. با گذشت مدت زمان ۷۲ ساعت عصاره به صورت پودر خشک به دست آمد. با رقیق کردن عصاره خشک، عصاره‌های خوراکی مورد نظر تهیه شد.

موش‌های صحرایی به صورت تصادفی در ۹ گروه ۱۵ تایی گروه‌بندی گردید. همه گروه‌ها، به جز گروه اول، به مدت ۲۴ ساعت در شرایط ناشتا قرار داده شد. سپس جهت ایجاد کولیت زخمی، یک میلی‌لیتر استیک اسید ۳ درصد به صورت رکتالی استفاده شد (۱۹). بیست و چهار ساعت پس از تجویز رکتالی استیک اسید، درمان شروع گردید.

گروه‌بندی حیوانات به صورت زیر انجام گرفت. گروه اول که بدون القای بیماری، روزانه ۱ سی‌سی نرمال سالین به صورت خوراکی دریافت می‌کردند. گروه‌های دوم و سوم، نیز روزانه به ترتیب یک سی‌سی اسید استیک ۳ درصد و یک سی‌سی ژل پایه به صورت رکتال دریافت کردند. در گروه‌های چهارم و پنجم، روزانه به ترتیب ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم آساکول، به ترتیب به صورت رکتال و خوراکی تجویز شد. در گروه‌های ششم و هفتم نیز روزانه به ترتیب ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره، گاوژ شد. همچنین گروه‌های هشتم و نهم به

صورت رکتال، ۱ سی سی ژل به ترتیب ۱۰ و ۲۰ درصد دریافت نمودند.

برای دادن دارو به صورت خوراکی از نیدل گاواژ استفاده شد و برای رکتال ابتدا موش‌های صحرایی را با دی‌اتیل‌اتر بی‌هوش کرده سپس نیدل مخصوص انما را از راه رکتوم حدود ۸ سانتی‌متر فرو برده و ۱ سی سی دارو به موش‌های بزرگ سفید آزمایشگاهی تزریق کرده و چند ثانیه موش‌های بزرگ سفید آزمایشگاهی را وارونه کرده تا داروی تزریق شده را پس ندهد.

موش‌های بزرگ سفید آزمایشگاهی در این آزمایش به مدت ۷ روز تحت درمان قرار گرفتند. بیست و چهار ساعت پس از آخرین دوز (روز نهم)، همه حیوانات به وسیله اتر، کشته شدند. سپس شکم باز و کولون انتهایی آنها جدا گردید. پس از قرار دادن درون فرمالین ۱۰ درصد به منظور تثبیت شدن، انجام مراحل آماده‌سازی و تهیه بلوک‌های پارافینی، مقاطعی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و به روش هماتوکسیلین - ائوزین رنگ‌آمیزی گردید. سپس جهت توصیف پارامترهای هیستوپاتولوژی از روش‌های کیم و همکاران، زی و همکاران استفاده گردید (۲۱ و ۲۰).

هم‌چنین به منظور اندازه‌گیری میزان جذب مالون دی آلدئید (MDA)، ۲۰۰ میلی‌گرم از بافت کولون برداشته و به نسبت ۱ به ۵ بافر فسفات (PBS) به آن اضافه گردید و مخلوط بافت و PBS با دستگاه هموژنایزر همگن شد. ۴۰۰ میکرولیتر از قسمت رویی محلول همگن با سمپلر برداشته و درون میکروتیوپ ریخته شد. سپس

۸۰۰ میکرولیتر از تری کلرو استیک اسید (TCA) ۲۸ درصد به میکروتیوپ اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۳ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، ۶۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته و درون لوله آزمایش ریخته شد. به محلول درون لوله ۱۵۰ میکرولیتر تیوباربیتوریک اسید (TBA) ۱ درصد اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. پس از سرد شدن، ۴ میلی‌لیتر آن - بوتانول هم‌زمان با مخلوط کردن، به محتویات درون لوله با دستگاه همزن به لوله آزمایش اضافه شد تا باهم مخلوط شود. جذب فاز بوتانولی در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. برای استاندارد از تترا اتوکسی پروپان (TEP) استفاده شد. غلظت مالون دی آلدئید از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{غلظت MDA} \times \frac{\text{جذب نمونه}}{\text{جذب استاندارد}} = \text{غلظت استاندارد (V/V)}$$

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون آماری SPSS و در صورت نرمالیتیه بودن داده‌ها پس از آزمون کولموگروف اسمیرنوف از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه، کروس کاروالیس تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

در گروه کنترل، بافت پوششی سالم و همه لایه‌های بافت کولون وجود داشت. در حالی که در گروه پراستیک اسید، بافت پوششی از بین رفته و ساختار بافت موکوسی به هم ریخته است، ولی در گروه‌های ژل انما (۱۰ و ۲۰ درصد)، بافت پوششی

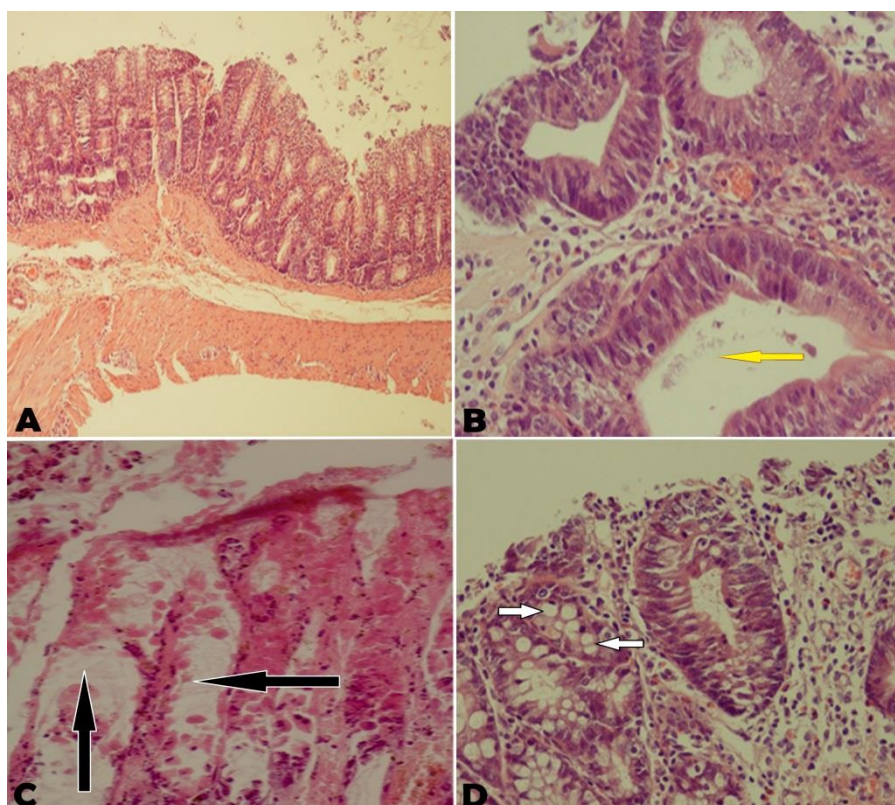
بازسازی شده، کولون ترمیم و غدد موکوسی به خوبی تشکیل شده است. یعنی بافت ضمن خود ترمیمی، توانسته به فعالیت گوارشی طبیعی نیز کمک کند(شکل ۱).

بر اساس جدول ۱ تجویز اسید استیک به طور معنی‌داری باعث ایجاد آسیب‌های هیستوپاتولوژی (تخریب مخاط، نکروز، زخم، از هم گسستگی کریپت‌ها، آبه کریپت‌ها، التهاب کریپت‌ها) در سطح میکروسکوپی شده است ($p < 0.05$). در حالی که در گروه‌های دریافت کننده ژل انما ۲۰ و ۱۰ درصد،

ترمیم آسیب‌های بافتی به دنبال تجویز اسیداستیک ۲ درصد صورت گرفت ($p < 0.05$).

با توجه به نمودار ۱، تجویز اسیداستیک ۲ درصد می‌توانست به طور معنی‌داری باعث افزایش میزان مالون دی آلدهید (MDA) گردد.

ژل ۲۰ و ۱۰ درصد کلپوره به طور معنی‌داری باعث کاهش MDA گردید. در گروه کنترل منفی، مقدار MDA به طور قابل توجهی افزایش یافت که ناشی از تخریب اکسیداتیو بافت کولون بود.



شکل ۱: مقطع هیستوپاتولوژی گروه کنترل (A) با بافت پوششی سالم بوده (بزرگنمایی ۴۰X)، گروه ژل انما ۱۰ درصد (B) که بافت پوششی به خوبی شکل گرفته (فلش زرد رنگ) (بزرگنمایی ۱۰۰X)، گروه اسید استیک ۲ درصد (C) که بافت پوششی تخریب شده (فلش سیاه رنگ) (بزرگنمایی ۱۰۰X)، گروه ژل انما ۲۰ درصد (D) که ضمن تشکیل و بازسازی بافت پوششی، سلول‌های موکوسی هم مشاهده می‌شوند (فلش سفید رنگ) (بزرگنمایی ۱۰۰X). (رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین).

جدول ۱: اثرات عصاره آبی گیاه کلپوره (انما و خوراکی) بر آسیب‌های هیستوپاتولوژی کولیت ناشی از استیک اسید ۳ درصد در موش بزرگ سفید آزمایشگاهی، نر

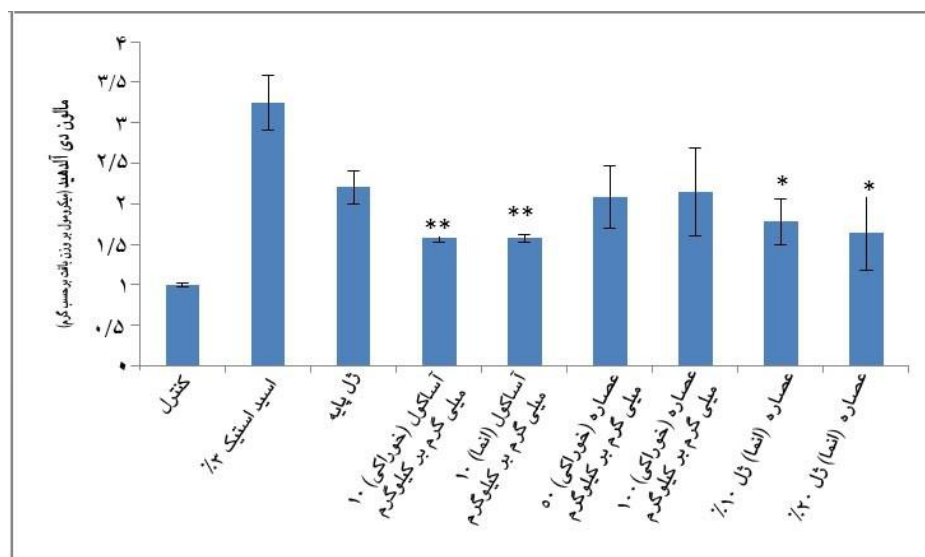
مشاهدات میکروسکوپی						گروه‌ها
تخریب مخاط	التهاب کریپت ها	آبسه کریپت ها	از هم گسستگی کریپت ها	زخم	نکروز	
۱/۸۳±۰/۴*	۱±۰/۳*	۱/۶۶±۰/۵۱*	۱/۳۳±۰/۸۱*	۱/۶۶±۰/۵۱*	۱±۰/۴۹*	کنترل سالم
۱/۸۷±۰/۶۴*	۱/۱۲±۰/۲۳*	۱/۲۵±۰/۵۸*	۱/۱۲±۰/۴۳*	۱/۲۵±۰/۵۸*	۱/۱۲±۰/۳۳*	کنترل منفی
۰/۱۶±۰/۰۳ ^a	۰/۱۶±۰/۰۱ ^a	۰/۱۶±۰/۰۲ ^a	±۰ ^a	۰/۱۶±۰/۰۲ ^a	۰/۱۶±۰/۰۳ ^a	ژل پایه
۰/۱۶±۰/۰۳ ^a	۰/۱۶±۰/۰۲ ^a	±۰ ^a	±۰ ^a	۰/۱۶±۰/۰۲	۰/۱۶±۰/۰۳ ^a	مزالامین خوراکی ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم
۰/۱۶±۰/۰۳ ^a	۰/۱۶±۰/۰۲ ^a	±۰ ^a	±۰ ^a	۰/۱۶±۰/۰۲	۰/۱۶±۰/۰۳ ^a	آساکول انما ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم
۰/۲۰±۰/۰۷ ^a	۱/۱۰±۰/۳۱	±۰ ^a	۰/۱۰±۰/۰۱ ^a	۰/۱۰±۰/۰۱ ^a	۰/۲۰±۰/۰۳ ^a	عصاره آبی خوراکی ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم
۰/۷۲±۰/۰۹	۱/۲۷±۰/۲	۰/۰۹±۰/۰۱ ^a	۰/۵۴±۰/۰۸ ^a	۰/۵۴±۰/۰۱ ^a	۰/۳۶±۰/۰۵ ^a	عصاره آبی خوراکی ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم
۰/۱۸±۰/۰۱ ^a	۰/۸۱±۰/۰۴	±۰ ^a	۰/۰۹±۰/۰۱ ^a	۰/۱۸±۰/۰۳ ^a	۰/۰۹±۰/۰۱ ^a	ژل انمای ۱۰ درصد
۰/۳۳±۰/۰۲ ^a	۰/۷۵±۰/۰۱	۰/۱۶±۰/۰۷ ^a	۰/۱۶±۰/۰۶ ^a	۰/۲۵±۰/۰۷ ^a	۰/۲۵±۰/۰۸ ^a	ژل انمای ۲۰ درصد

٠: بدون علایم ١: علایم خفیف ٢: علایم متوسط ٣: علایم شدید

*: تفاوت معنی دار با گروه کنترل با $p < 0.05$

a: تفاوت معنی دار با گروه اسیداستیک ۳٪ یا $p < 0.05$

نمودار ۱: مقایسه اثر آساکول (کنترل مثبت) با دوزهای مختلف عصاره کلپوره (به صورت انما و خوراکی) بر میزان مالون دی آلدهید (میانگین $\pm$ انحراف معیار)



*اختلاف معنی دار در سطح $p < 0.05$ نسبت به گروه استیک اسید ۳ درصد

**اختلاف معنی دار در سطح $p < 0.01$ نسبت گروه استیک اسید ۳ درصد

بحث

می‌شود (۴). از روش‌های آزمایشگاهی ایجاد کولیت در

حیوانات آزمایشگاهی، استفاده از اسید سولفونیک،

کولیت زخمی، بیماری التهابی مزمن روده

است که باعث التهاب منتشر لایه مخاطی کولون

تری نیترو بنزن سولفونیک اسید (۲۲)، دکستران سولفات سدیم (۲۳) و اسید استیک (۲۴) می باشد. در مدل القایی کولیت به وسیله استیک اسید، موارد هیستوپاتولوژی زیادی مثل ادم مخاط، انتشار نوتروفیل ها در لایه های مخاطی و زخم های زیر مخاطی با کولیت در انسان مشترک است. مکانیسم استیک اسید در ایجاد التهاب شامل ورود فرم پروتونی اسید به درون بافت پوششی است که در زمان اسیدی شدن داخل سلولی به پروتون آزاد تفکیک شده و سبب آسیب های اپیتلیالی می شود (۲۵). در تولید واسطه های التهابی، آنزیم سیکلواکسیژناز نقش مؤثری دارد. یکی از مکانیسم های مهم داروهای که در درمان التهاب استفاده می شود، مهار این آنزیم است (۲۶).

پاسخ ایمنی آغازی با استیک اسید شامل فعالیت مسیر سیکلواکسیژناز و لیپواکسیژناز است (۲۷). طبق مطالعه های انجام شده، سطح فعالیت مالون دی آلدهید به طور قابل توجهی نسبت به گروه کنترل زیاد می شود. افزایش معنی داری در سطح مالون دی آلدهید در این مطالعه دلیلی بر ایجاد التهاب به وسیله استیک اسید ۳ درصد از طریق لیپید پراکسیداسیون و انتشار نوتروفیل ها می باشد (۲۸).

در اثبات یافته های مطالعه حاضر، تحقیق های انجام شده نشان داده که عصاره کلم به دلیل داشتن

ترکیب های فلاونوئیدی، تری ترپن ها و مشتقات فنولی توانسته آسیب های هیستوپاتولوژی ناشی از زخم های گوارشی ایجاد شده به وسیله استیل سالیسیلیک اسید را کاهش دهد و از انتشار التهاب جلوگیری نماید (۲۹). در پژوهش دیگری گزارش شد که عصاره زنجبیل به دلیل داشتن ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی باعث بهبود زخم، ترمیم بافت پوششی کولون و کاهش سطح مالون دی آلدهید در موش های دارای زخم کولون ایجاد شده به وسیله استیک اسید گردید (۳۰). هم چنین در یک مطالعه تجربی، کیم و همکاران نشان دادند که عصاره دانه مورینگا پرگرینا که دارای ترکیب های فلاونوئیدی و فنولی می باشد منجر به کاهش ترشحات التهابی و کم کردن آسیب های پاتولوژی در کولون زخمی به وسیله اسید گردید (۲۱).

طبق مطالعه های انجام شده گیاه کلپوره دارای ترکیب های استرول و فلاونوئیدهایی مثل بتاسیتوسترول، استیگمسترول و ترپنیدهایی از جمله هیدروکربن های بتا پینن، لیمونن، آلفا-فلاندرن، گاما و دلتا کادینن، الکل های لینالول، ترپن - ۴- اول - سدرول، سدرنول و گوایل می باشد. فلاونوئیدها، به عنوان آنتی اکسیدان از پراکسیده شدن لیپیدها به وسیله عوامل اکسیدکننده در میکروزوم، میتوکندری و لیپوزوم جلوگیری می نمایند. این فعالیت به توانایی فلاونوئیدها در شلاته کردن یون های فلزی، پاک سازی اکسیژن های غیر پیوندی، سوپراکسید آنیون ها،

رادیکال‌های پراکسیل، رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسی نیتريت‌ها برمی‌گردد. از این رو فلاونوئیدها جزء اجزای فعال تعدادی از گیاهان محسوب می‌شوند (۳۱). فلاونوئیدها به دسته‌ای از ترکیب‌های طبیعی اطلاق می‌شود که ساختارهای متنوع فنولی دارند. این ترکیب‌ها با مکانیسم‌های مختلف، مانع ایجاد و گسترش فرآیندهای التهابی می‌شود (۳۲).

باتوجه به این یافته‌ها می‌توان گفت که یکی از مکانیسم‌های این عصاره در کاهش التهاب ناشی از استیک اسید، خاصیت خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد است. در فرآیند التهاب رادیکال‌های آزاد تولید می‌شود و مطالعه‌های انجام شده اثرات ضد التهابی گیاه را به دلیل حضور ترکیب‌های فلاونوئیدها، استرول و ترکیب‌های ترپنی به گیاه نسبت داده‌اند (۳۳).

طبق نتایج به دست آمده از نمودار ۱، اسید استیک رکتالی باعث افزایش معنی‌دار MDA می‌شود. همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، ژل‌های ۱۰ و ۲۰ درصد به میزان قابل توجهی میزان MDA را کاهش داده است. دوزهای عصاره خوراکی ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ترتیب ۴۵/۸ درصد و ۴۴/۱ درصد و ژل‌های ۱۰ و ۲۰ درصد انما نیز به ترتیب ۵۹ و ۶۵ درصد میزان MDA افزایش یافته به وسیله اسید استیک را کاهش داده است. پس طبق نتایج به دست آمده می‌توان گفت ژل ۱۰ و ۲۰ درصد

اثر بهتری روی میزان MDA و التهاب ایجاد شده به وسیله استیک اسید ۳ درصد دارد.

مطالعه‌های پاتولوژیک نشان داده‌اند در گروهی که فقط استیک اسید دریافت کرده‌اند، بافت کولون دچار التهاب، آبرسه مخاط، تخریب مخاط، زخم و نکروز می‌شود. در گروه‌هایی که ژل ۱۰ و ۲۰ درصد به صورت انما دریافت کردند کاهش معنی‌داری در میزان التهاب و سایر فاکتورهای التهابی شده است، ولی در عصاره‌های خوراکی این کاهش معنی‌دار نبوده است. پس طبق این شواهد می‌توان گفت ژل ۱۰ و ۲۰ درصد التهاب را کاهش داده است و مؤثرتر بودند هرچند که پاسخ وابسته به دوز مشاهده نگردید. با توجه به محدودیت‌های موجود برای این مطالعه، برای تحقیق‌های آینده می‌توان از روش استریولوژی، بیان ژن و گیاهان دارویی متخلف از این خانواده استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

ترکیب‌های فلاونوئیدی، استرولی و ترپنوئیدی موجود در عصاره گیاه کلپوره دارای اثر آنتی‌اکسیدانتی و ضدالتهابی هستند و با مکانیسم مهار MDA منجر به کاهش اکسیداسیون و تشکیل رادیکال‌های آزاد شده و بنابراین اثر جلوگیری کننده از ایجاد کولیت و احتمالاً کنترل کولیت دارد. هر چند ممکن است مکانیسم‌های دیگری در بروز این اثر

عصاره کلپوره دخیل باشد. همچنین در مقایسه روش خوراکی و فرم انما مشخص شده که فرم انمای عصاره تأثیر بیشتری نسبت به عصاره خوراکی داشته است.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان نامه دکترای عمومی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شیراز می باشد. بدین وسیله از حمایت مالی معاونت تحقیق و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شیراز و همچنین از مدیر محترم مرکز حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز دکتر واحدی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند، صمیمانه تشکر می نمایم.

REFERENCES

1. Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12(5): S3-S9.
2. Shorter R, Huizenga K, Spencer R, Guy S. Inflammatory bowel disease. *Am J Dig Dis* 1972; 17(8): 689-96.
3. Itzkowitz SH, Present DH. Consensus conference: colorectal cancer screening and surveillance in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11(3): 314-21.
4. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005; 353(23): 2462-76.
5. Bohonak A. IBD (isolation by distance): a program for analyses of isolation by distance. *J Hered* 2002; 93(2): 153-4.
6. Manichanh C, Borruel N, Casellas F, Guarner F. The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 9(10): 599-608.
7. Irvine EJ, Feagan B, Rochon J, Archambault A, Fedorak RN, Groll A, et al. Quality of life: a valid and reliable measure of therapeutic efficacy in the treatment of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1994; 106(2): 287-96.
8. Faubion WA, Loftus EV, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology* 2001; 121(2): 255-60.
9. Magalhaes SS, Alves L, Sebastiao M, Medronho B, Almeida ZL, Faria TQ, et al. Effect of ethyleneoxide groups of anionic surfactants on lipase activity. *Biotechnol Prog* 2016; 32(5): 1276-82.
10. Tanideh N, Jamshidzadeh A, Sepehrimanesh M, Hosseinzadeh M, Koohi-Hosseiniabadi O, Najibi A, et al. Healing acceleration of acetic acid-induced colitis by marigold (*Calendula officinalis*) in male rats. *Saudi J Gastroenterol* 2016; 22(1): 50-6.
11. Sharififar F, Dehghn-Nudeh G, Mirtajaldini M. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry* 2009; 112(4): 885-8.
12. Esmaeili MA, Yazdanparast R. Hypoglycaemic effect of *Teucrium polium*: studies with rat pancreatic islets. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 95(1): 27-30.
13. El-Shazly AM, Hussein KT. Chemical analysis and biological activities of the essential oil of *Teucrium leucocladum* Boiss. (Lamiaceae). *Biochem Syst Ecol* 2004; 32(7): 665-74.
14. Hassan M, Muhtadi F, Al-Badr A. GLC-mass spectrometry of *Teucrium polium* oil. *J Pharm Sci* 1979; 68(6): 800-1.
15. Al-Kubaisy K, Al-Essa LY, Al-Jamain H, Shawagfeh MT. Hematological and Biochemical Evaluation of "*Teucrium Polium*" in Albino Rats. *Br J Pharmacol* 2012; 3(3): 123-6.
16. Ansari R, Sahinfard N, Namjou A, Rafieian M, Shirzad H, Rafieian-Kopaei M. Ameliorative property of *Teucrium polium* on second degree burn. *Journal of HerbMed Pharmacol* 2013; 2(1): 9-11.
17. Jamshid M, Jafar N, Bahram M, Mehrzad JB, Tahereh V, Sharif TM. The healing effect of combined hydroalcoholic extract of *Teucrium polium* and the seed hull of *Quercus brantii* on burn wounds in rats. *Health Sci* 2016; 5(10): 232-7.
18. Sevindik E, Abacı ZT, Yamaner C, Ayvaz M. Determination of the chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Teucrium polium* and *Achillea millefolium* grown under North Anatolian ecological conditions. *Biotechnol Equip* 2016; 30(2): 375-80.
19. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95(2): 351-8.
20. Zeeshan JM, Procaccino F, Hoffmann P, Aukerman SL, McRoberts JA, Soltani S, et al. Keratinocyte growth factor ameliorates mucosal injury in an experimental model of colitis in rats. *Gastroenterology* 1996; 110(4): 1077-83.

21. Kim Y, Wu AG, Jaja-Chimedza A, Graf BL, Waterman C, Verzi MP, et al. Isothiocyanate-enriched moringa seed extract alleviates ulcerative colitis symptoms in mice. *PloS one* 2017; 12(9): e0184709.
22. Tozaki H, Fujita T, Odoriba T, Terabe A, Suzuki T, Tanaka C, et al. Colon-specific delivery of R68070, a new thromboxane synthase inhibitor, using chitosan capsules: therapeutic effects against 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats. *Life Sci* 1999; 64(13): 1155-62.
23. Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* 1994; 107(6): 1643-52.
24. Thippeswamy BS, Mahendran S, Biradar MI, Raj P, Srivastava K, Badami S, et al. Protective effect of embelin against acetic acid induced ulcerative colitis in rats. *Eur J Pharmacol* 2011; 654(1): 100-5.
25. Al-Rejaie SS, Abuhashish HM, Al-Enazi MM, Al-Assaf AH, Parmar MY, Ahmed MM. Protective effect of naringenin on acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *World J Gastroenterol* 2013; 19(34): 5633-44.
26. Agoff SN, Brentnall TA, Crispin DA, Taylor SL, Raaka S, Haggitt RC, et al. The role of cyclooxygenase 2 in ulcerative colitis-associated neoplasia. *Am J Pathol* 2000; 157(3): 737-45.
27. Paiotti APR, Artigiani Neto R, Forones NM, Oshima CTF, Miszputen SJ, Franco M. Immunoexpression of cyclooxygenase-1 and-2 in ulcerative colitis. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40(7): 911-8.
28. Baskol G, Baskol M, Yurci A, Ozbakir O, Yucesoy M. Serum paraoxonase 1 activity and malondialdehyde levels in patients with ulcerative colitis. *Cell Biochem Funct* 2006; 24(3): 283-6.
29. Carvalho CAd, Fernandes KM, Matta SLP, Silva MBd, Oliveira LLd, Fonseca CC. Evaluation of antiulcerogenic activity of aqueous extract of *Brassica oleracea* var. capitata (cabbage) on Wistar rat gastric ulceration. *Arq Gastroenterol* 2011; 48(4): 276-82.
30. El-Abhar HS, Hammad LN, Gawad HSA. Modulating effect of ginger extract on rats with ulcerative colitis. *J Ethnopharmacol* 2008; 118(3): 367-72.
31. Cestari SH, Bastos JK, Di Stasi LC. Intestinal anti-inflammatory activity of *Baccharis dracunculifolia* in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011; 2011: 1-9.
32. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000; 52(4): 673-751.
33. Hasani P, Yasa N, Vosough-Ghanbari S, Mohammadirad A, Dehghan G, Abdollahi M. In vivo antioxidant potential of *Teucrium polium*, as compared to α -tocopherol. *Acta Pharm* 2007; 57(1): 123-9.

The Healing effect of *Teucrium polium* L. on Acetic Acid-Induced Colitis in Male Rat

Toneedeh N^{1,2}, Lashkarpour HA³, Daneshchi S^{1,2}, Asadi Yousefabad SL^{4*}, Koohi-Hossein Abadi O⁵,
Hosseinzadeh M⁶, Jamshid Zadeh A³, Mohammadi Samani S³, Omidi M⁷

¹Department of Pharmacology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, ²Stem Cell Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, ³Drug Science Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, ⁴ Student Research Committee, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services, Yazd, Iran, ⁵ Laboratory Centers, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, ⁶ Department of Pathology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, ⁷ Department of Pharmacology and Toxicology, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran

Received: 23 Jul 2017

Accepted: 7 Feb 2018

Abstract

Background & aim: Inflammatory bowel disease (IBD) as a chronic condition of the intestine with unknown etiology involving different agents like immune, genetic and environment. Today, many of herbal and synthetic compounds are being used as anti-inflammatory products around the world. The aim of this study was to investigate the anti-inflammatory effect of aquatic extraction of *Teucrium polium* L. plant on colitis in rat.

Methods: In this experimental study, a total of 135 male rats, weighing 200±20 g and 10 to 12 weeks old, were randomly divided into nine equal groups: healthy control group were given normal saline without ulcerative colitis (UC) induction, negative control group which UC was induced by 3% acetic acid with no treatment, basal gel group which were received basal gel via enema after UC induction, two groups as positive controls were taken Asacol (10 mg/kg/day) and Mesalamine (10 mg/kg/day) trans-rectally and orally, respectively. Also, oral form of aqueous extraction with doses of 50 and 100 mg/kg/day in two groups and enema form (gel 10% and 20%) of *Teucrium polium* L. in two groups were given. At the end of study, MDA measurement as antioxidant index and histopathological evaluation of colon tissue were performed. The collected data were analysed using one-way ANOVA and Mann-Whitney U test.

Results: Enema gels 10% and 20% lead to repair of damaged tissue of colon at the microscopic level and caused reduction in MDA level (p<0.01). Gels 20% compared with negative control showed significant difference in terms of MDA (p<0.01). Mesalamine and Asacol as positive controls, compared with each other and also oral and enema forms of *Teucrium polium* L. showed no significant difference in respect of MDA (p<0.01). Although, enema gel form compared with oral form of plant aquatic extraction showed no significant difference, but enema form had better effect in control of inflammation.

Conclusion: *Teucrium polium* L. has remarkable effects on healing processing of induced colitis in male rat. According to anti-inflammation, antioxidant and anti-microbial properties of *Teucrium polium* L., it can be mentioned that this plant is effective in healing of intestinal ulcers.

Key words: Inflammatory bowel disease, *Teucrium polium* L., male rat, colitis

Corresponding author: Asadi Yousefabad SL, Student Research Committee, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services, Yazd, Iran

Email: asadi_427@yahoo.com

Please cite this article as follows:

Toneedeh N, Lashkarpour HA, Daneshchi S, Asadi Yousefabad SL, Koohi-Hossein Abadi O, Hosseinzadeh M. The Healing effect of *Teucrium polium* L. on Acetic Acid-Induced Colitis in Male Rat. Armaghane-danesh 2018; 23 (1): 29-41.