دانشور پزشکی

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وسوم-شماره ۱۲۲
اردیبهشت ۱۳۹۵

دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۲۸
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۵/۰۱/۲۴
پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۳۱

بررسی اثر عصارهٔ آبی و اتانولی بابونهٔ شیرازی (*Matricaria chamomile*) بر فعالیت حیاتی ماکروفاژها و لنفوسیت‌های موش BALB/c

نویسندگان: هلیا حاتمی[۱]، طوبی غضنفری[۲*]، طیبه رجبیان[۳]، راضیه دیلمقانیان[٤]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ایمونولوژی، دانشکدهٔ پزشکی شاهد، تهران، ایران
۲. استاد، دکترای ایمنی‌شناسی، مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۳. دانشیار، دکترای فیزیولوژی گیاهی، مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
٤. کارشناس ارشد آمار زیستی، مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: طوبی غضنفری E-mail: tghazanfari@yahoo.com

چکیده

مقدمه و هدف: بابونهٔ شیرازی (*Matricaria chamomile*) سال‌هاست که برای درمان زخم‌ها، التهابات گوارشی، فارنژیت، دردهای روماتوئید و نازایی مورد توجه است؛ اما تاکنون مطالعه‌ای جهت بررسی اثر عصارهٔ آن، بر روی فعالیت حیاتی سلول‌های ایمنی، در شرایط *in vivo* انجام نگرفته است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر عصاره‌های آبی و اتانولی *M. chamomile* بر فعالیت حیاتی ماکروفاژها و لنفوسیت‌های موش BALB/c بود.

مواد و روش‌ها: مطالعه بر روی ۱۱۰ سر موش صورت گرفت. چهار گروه پنج‌تایی از موش‌ها به‌طور صفاقی، با دوزهای mg/kg ۱۰۰-۲۵ و پنج گروه به‌طور خوراکی، با دوزهای mg/kg ۱۰۰۰-۱۰۰ عصاره‌های اتانولی، به‌مدت پانزده روز تیمار شدند. گروه‌های تیماری مشابهی برای بررسی اثر عصاره‌های آبی مورد استفاده قرار گرفتند. به گروه کنترل، سالین تجویز شد. روز شانزدهم، موش‌ها کشته و ماکروفاژهای صفاق و لنفوسیت‌های طحال آن‌ها جدا شدند.

نتایج: فعالیت حیاتی ماکروفاژها در دوز mg/kg ۷۵ و ۱۰۰ عصارهٔ اتانولی تزریقی و mg/kg ۷۵۰ و ۵۰۰ و ۱۰۰۰ عصارهٔ اتانولی خوراکی کاهش و به ترتیب، در دوزهای mg/kg ۵۰ و ۱۰۰۰ عصارهٔ آبی تزریقی و خوراکی افزایش یافت. فعالیت حیاتی لنفوسیت‌ها در دوزهای mg.kg ۱۰۰ و ۷۵۰ عصارهٔ اتانولی خوراکی کاهش و دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰ و mg/kg ۱۰۰۰ آبی خوراکی افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: عصاره‌های اتانولی *M. chamomile* در شرایط *in vivo* برخلاف عصاره‌های آبی به‌طور مؤثری، باعث کاهش فعالیت حیاتی ماکروفاژ و لنفوسیت شدند که این اثر کاهشی عصاره‌های اتانولی گیاه می‌تواند به دلیل اثر ضدالتهابی آن‌ها باشد؛ اما عصاره‌های آبی سیستم ایمنی را تقویت می‌کند.

واژگان کلیدی: بابونهٔ شیرازی، ماکروفاژ، لنفوسیت، فعالیت حیاتی

مقدمه

بابونهٔ شیرازی (*Matricaria chamomile*) گیاهی علفی، یک‌ساله و بومی جنوب ایران می باشد. این گیاه متعلق به خانوادهٔ کاسنی (Asteraceae) یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی شناخته‌شده می‌باشد. *M. chamomile* دارای مجموعه گل‌های (گلچه) مخروطی‌شکل با گل‌های سفید کناری و گل‌های زرد میانی و تعداد زیادی گل‌های سفید و زرد جداشده و نیز برگ‌هایی به بلندی ۵۰ تا ۹۰ سانتی‌متر می باشد (۲،۱). این گیاه در طب سنتی، به شکل‌های مختلفی ازجمله کپسول و چای مورد استفاده قرار می گیرد (۲،۱). در طب سنتی ایران، اثرات متنوعی ازجمله اثرات مدر، معرق، مقوی معده، ضدنفخ، اشتهاآور، هاضم، ضدصفرا و قاعده‌آور برای بابونه ذکر شده است. همچنین در طب سنتی، بابونه به‌عنوان مفتح و محلل بدون جذب، تقویت مغز، اعصاب، قوهٔ باه و در بیماری‌های مغزی مثل سردرد و نزلــه و در یرقان، درد سینه، کبد، احشا، مقعد، در درمان قولنج و خردکردن سنگ مثانه مورد استفاده قرار می‌گرفته است. در کتاب قانون ابن‌سینا اشاره شده است که گل‌های این گیاه در درمان تب ناشی از عفونت سودا یا بلغــم کــاربرد دارد. مضر طحال است که مصلح آن کرفس است. همچنین روغن بابونه لــرز و خستگی و کوفتگی را از بین می‌برد و برای دردهای رحمی و تشنج نیز مفید است (۲). مهم‌ترین ترکیبات بابونه را فلاونوئیدهایی چون لوتئولین (luteolin)، پاتولتین (patuletin)، کوئرستین (quercetin)، اپی‌ژنین (apigenin) و سزکوئی‌ترپن الکلی بیزابولول (bisabolol) تشکیل می‌دهند (۳-۵). مطالعات مختلف اثرات ضدالتهابی، ضددرد، ضداسپاسم و آنتی‌اکسیدان را برای فلاونوئیدهای بابونه نشان داده‌اند. همچنین در مطالعات مختلف، *M. chamomile* به‌عنوان یک گیاه مؤثر در درمان انواع التهابات، زخم‌ها، سوختگی‌ها، بیماری‌های پوستی، بیماری‌های التهابی گوارشی، سرماخوردگی، برونشیت، صرع، فشارخون، نورالژی، دیسمنوره، اگزما، اسهال، دردها، اسپاسم، سرطان، دیابت، ناباروری و دردهای آرتریت روماتوئید مورد بررسی قرار گرفته است (۷،٦).

جراحی و همکاران (۱۳۸۷) اثبات کرده‌اند که مصرف موضعی عصارهٔ هیدروالکلی بابونه سبب تسریع بهبودی زخم سوختگی در موش‌های صحرایی می‌شود (۸). احمدی‌نژاد و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که عصارهٔ آبی بابونه، در درمان کولیت مؤثر است و شاخص‌های التهابی و زخمی کولیت را در موش صحرایی نر به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد (۹). در سال‌های اخیر، توجه زیادی به جداسازی ترکیبات مختلف *M. chamomile*، به‌ویژه فلاونوئیدهایی همچون اپی‌ژنین و کوئرستین معطوف شده و گزارش‌های فراوانی در این خصوص وجود دارد. اپی‌ژنین یکی از ترکیباتی است که در برخی میوه‌ها و سبزیجات مانند جعفری یافت می شود (۱۰).

Verbeek و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که تجویز دوز ۱۰ mg اپی‌ژنین، تکثیر سلول‌های T را ٤۰ تا ٦۰درصد و تولید IFN-γ را کاهش می‌دهد و همچنین شروع علائم EAE را به تعویق می‌اندازد (۱۱). Lee و همکاران (۲۰۱۰) اثر روغن *M.chamomile* را در تغییر پاسخ‌ها به سمت TH2 در موش‌های BALB/c مبتلا به درماتیت آتوپیک نشان دادند (۱۲).

Drummond و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که تجویز اپی‌ژنین به‌صورت *in vitro* موجب کاهش TNFα (در غلظت ۱۰μM) و همچنین IL6 و IL1β در ماکروفاژهای THP1 شده است (۱۳). Miguel و همکاران (۲۰۱۵) اثبات کردند که تیمار *in vitro* ماکروفاژهای جداشده از مغز استخوان موش‌های C57Bl/6 با اپی‌ژنین جداسازی‌شده از *M. chamomile* موجب کاهش سطح TNFα شده و بر روی فعالیت حیاتی آن‌ها بی‌تأثیر است (۳).

مرور منابع نشان می دهد که دررابطه‌با اثر عصاره‌های *M. chamomile* به‌صورت *in vivo* بر فعالیت حیاتی ماکروفاژ و لنفوسیت‌های موش BALB/c مطالعه‌ای انجام نشد. در مطالعهٔ حاضر، به بررسی اثر عصاره‌های آبی و

اتانولی *M. chamomile* بر فعالیت حیاتی ماکروفاژ و لنفوسیت‌های موش BALB/c به روش MTT (mitochondrial activity assay) پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ عصارهٔ آبی

گل‌های بابونه از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. برای تهیهٔ عصارهٔ آبی، ابتدا ۱۰ گرم پودر گل بابونه وزن شد و در 100 ml آب مقطر و به مدت ٤٨ ساعت به‌روش خیساندن عصاره‌گیری شد. پس از ٤٨ ساعت، عصاره توسط کاغذ صافی و تحت شرایط خلأ صاف شد و سپس برای کاهش حجم حلال، عصارهٔ صاف‌شده در دستگاه روتاری، تحت خلأ و در دمای ٤٠°C قرار داده شد و پس از آن، برای تبخیر کامل حلال و تهیهٔ پودر، عصارهٔ حاصل به پتری‌دیش شیشه‌ای منتقل و در آون ٣٠°C قرار گرفت. عصارهٔ پودرشده در دمای ٤°C تا زمان مصرف نگهداری شد. در زمان استفاده، مقدار مشخصی از عصاره، در حجم معینی سالین حل شد و بر اساس وزن بدن حیوان، به‌صورت تزریقی و خوراکی استفاده شد.

تهیهٔ عصارهٔ اتانولی

تهیهٔ عصارهٔ اتانولی نیز مطابق روش عصاره‌گیری آبی انجام شد با این تفاوت که از 100ml اتانول ۷۰درصد به‌عنوان حلال استفاده گردید.

تهیهٔ حیوانات

۱۱۰ سر موش نر با سن شش تا هشت هفته خالص و یکسان ازنظر ژنتیکی که در شرایط دما و رطوبت کنترل‌شده و محیط فاقد پاتوژن نگهداری می‌شدند، از انیستیتو پاستور ایران تهیه شدند. موش‌ها به ۲۲ گروه پنج‌تایی تقسیم شدند و تمام گروه‌های موردمطالعه به‌مدت پانزده روز عصارهٔ بابونه را دریافت کردند.

برای گروه دریافت‌کنندهٔ عصارهٔ آبی به‌صورت تزریقی، ۲۵ سر موش به پنج گروه پنج‌تایی تقسیم شدند. به چهار گروه عصارهٔ آبی در دوزهای ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ mg/kg به‌صورت صفاقی تزریق شد و گروه پنجم به‌عنوان کنترل فقط سالین را به‌صورت تزریقی دریافت کرد.

همچنین در گروه دریافت‌کننده، عصارهٔ اتانولی به‌صورت تزریقی نیز ۲۵ سر موش به پنج گروه پنج‌تایی تقسیم شدند. به چهار گروه پنج‌تایی عصارهٔ اتانولی در دوزهای ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ mg/kg به‌صورت صفاقی تزریق شد و گروه پنجم به‌عنوان کنترل فقط سالین را به‌صورت تزریقی دریافت کرد.

برای گروه دریافت‌کنندهٔ عصارهٔ آبی به‌صورت خوراکی ۳۰ سر موش به شش گروه پنج‌تایی تقسیم شدند. به پنج گروه عصارهٔ آبی در دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۰۰ mg/kg به‌صورت خوراکی داده شد و گروه ششم به‌عنوان کنترل فقط سالین را به‌صورت خوراکی دریافت کردند.

همچنین در گروه دریافت‌کنندهٔ عصارهٔ اتانولی خوراکی نیز ۳۰ سر موش به شش گروه پنج‌تایی تقسیم شدند. به پنج گروه عصارهٔ اتانولی در دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۰۰ mg/kg به‌صورت خوراکی داده شد و گروه ششم به‌عنوان کنترل فقط سالین را به‌صورت خوراکی دریافت کردند. جدول ۱ معرف تعداد موش‌ها و گروه‌ها می‌باشد.

جدول ۱. پروتوکل درمانی شامل تعداد موش‌ها در هر گروه، دوزهای مصرفی و روش مصرف.

روش تجویز / نوع عصاره	تزریقی		خوراکی	
	دوز mg/kg	تعداد موش	دوز mg/kg	تعداد موش
اتانولی	(کنترل)۰	۵	(کنترل) ۰	۵
	۲۵	۵	۱۰۰	۵
	۵۰	۵	۲۵۰	۵
	۷۵	۵	۵۰۰	۵
	۱۰۰	۵	۷۵۰	۵
			۱۰۰۰	۵
آبی	(کنترل) ۰	۵	(کنترل) ۰	۵
	۲۵	۵	۱۰۰	۵
	۵۰	۵	۲۵۰	۵
	۷۵	۵	۵۰۰	۵
	۱۰۰	۵	۷۵۰	۵
			۱۰۰۰	۵

بیهوش‌کردن حیوانات

۲٤ ساعت پس از آخرین تزریق دارو، موش‌ها با استفاده از پنبهٔ آغشته به دی‌اتیل اتر بیهوش شدند؛ سپس تحت شرایط استریل با بازکردن پوست آن‌ها بدون آسیب‌زدن به پردهٔ صفاقی و با لاواژ سرم فیزیولوژیک سرد از صفاق، سلول‌های صفاقی جمع‌آوری شدند.

جداسازی ماکروفاژها

پس از فیکس‌کردن موش‌ها، ۱۰۰ml سرم فیزیولوژی سرد به صفاق هریک از آن‌ها تحت شرایط استریل تزریق و سپس جمع‌آوری شد. لوله‌های حاوی ماکروفاژ با دور ۱۵۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سانتریفیوژ شدند. پس از این مدت، مایع رویی دور ریخته و به هر لوله ۲ml RPMI-1640 (GIBCO, BI1031) اضافه شد. پس از ورتکس کامل، لوله‌ها برای بار دوم، در سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه قرار داده شدند. پس از دورریختن سوپ رویی، به هر لوله ۲ml RPMI حاوی ۱۰درصد FBS (Sigma,F2442) اضافه شد. پس از این مرحله، سلول‌ها توسط لام نئوبار شمارش و برای کشت آماده شدند.

لوله‌های حاوی ماکروفاژها در تمام مراحل کار، سرد نگه داشته شدند تا از چسبیدن ماکروفاژها به دیوارهٔ لوله جلوگیری شود.

جداسازی سلول‌های طحال

پس از جداسازی ماکروفاژهای صفاقی موش‌ها، طحال آن‌ها نیز جهت جداسازی سلول‌های طحال که عمدتاً لنفوسیت هستند، برداشته شد. جداسازی سلول‌های طحال، در ۲/۵ ml محیط RPMI-1640 انجام شد. لوله‌های حاوی سلول‌های طحال در سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه قرار داده شد. پس از این مدت، مایع رویی دور ریخته شد و جهت لیز RBCها به لوله‌ها ۲ml لیزینگ بافر اضافه گردید. پس از مدت ۲ دقیقه، جهت خنثی‌نمودن لیزینگ بافر هم حجم آن FBS به لوله‌ها اضافه شد. سپس لوله‌ها دور ۱۵۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سانتریفیوژ شدند. پس از دورریختن مایع رویی، به هر لوله ۲ ml RPMI حاوی ۱۰درصد FBS اضافه گردید. پس از این مرحله، سلول‌ها توسط لام نئوبار شمارش و برای کشت آماده شدند.

کشت ماکروفاژها

ماکروفاژها پس از شمارش، به تعداد ۲×۱۰^{۵} در هر چاهک، در پلیت ۹٦ خانه با سه تکرار برای هر موش کشت داده شدند. حجم چاهک‌ها با RPMI حاوی ۱۰درصد FBS به ۲٤۵µl رسانده شد و به هر چاهک اضافه گردید و پلیت‌ها به‌مدت ۱٦ ساعت در انکوباتور ۳۷ºC قرار داده شدند.

کشت سلول‌های طحال

لنفوسیت‌ها پس از شمارش به تعداد ۲×۱۰^{۵} در هر چاهک، با سه تکرار برای هر موش کشت داده شد و حجم چاهک‌ها با RPMI حاوی ۱۰درصد FBS به 245 µl رسانده شد و ConA به عنوان میتوژن لنفوسیت در غلظت نهایی 12.5 µg/ml به هر چاهک اضافه گردید. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C قرار داده شدند.

روش انجام تست MTT

برای بررسی تکثیر و فعالیت حیاتی لنفوسیت‌ها و ماکروفاژهای صفاقی از روش MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) استفاده شد. در این روش رنگ زرد (تترازولیوم) MTT با فعالیت میتوکندری احیا شده و کریستال‌های بنفش ایجاد می‌شود.

تست MTT ماکروفاژها پس از ۱۶ ساعت و برای لنفوسیت پس از ۷۲ ساعت کشت انجام گرفت. غلظت ۵mg/ml MTT (M2128, Sigma) در آب مقطر تهیه و فیلتر شد و تا زمان استفاده در ۲۰- °C نگهداری شد. سپس به هر چاهک ۲۰µl محلول MTT افزوده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ٤ ساعت، در انکوباتور ۳۷ °C قرار داده شدند. بعد از این مدت، پلیت‌ها خارج و مایع رویی تخلیه شد؛ سپس برای حل‌شدن کریستال‌های بنفش‌رنگ، به هر چاهک 100µl ایزوپروپانول اسیدی اضافه شد و درنهایت جذب نوری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٤۹۲ نانومتر خوانده شد.

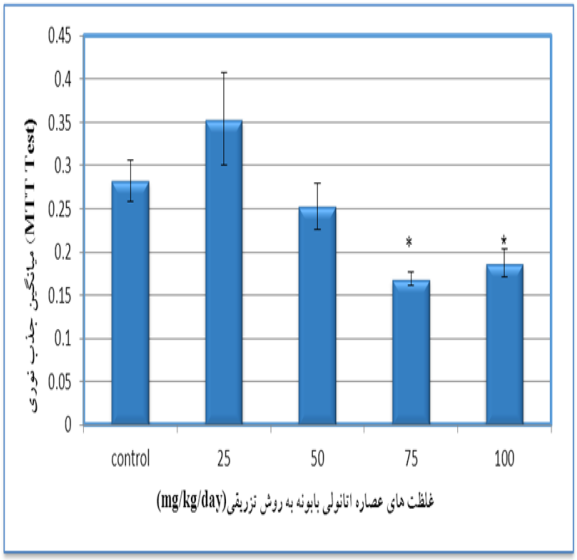
آنالیزهای آماری

جهت تجزیه‌وتحلیل آماری از برنامهٔ IBM SPSS 20 استفاده گردید. آنالیز تفاوت بین گروه‌های موردمطالعه، به‌وسیلهٔ آنالیز واریانس صورت گرفت و بر اساس نوع داده‌ها از آزمون‌های توکی و من‌ویتنی استفاده شد. نتایج در سطح $p \leq 0.05$ معنی‌دار گزارش شدند.

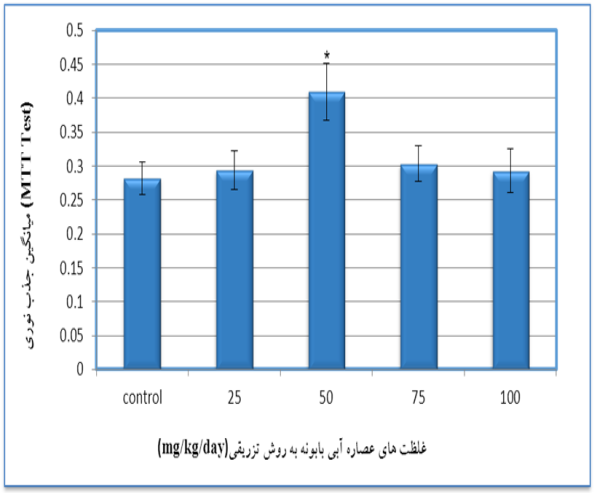
نتایج

تأثیر عصارهٔ آبی و اتانولی بابونه به‌صورت تزریقی بر فعالیت حیاتی ماکروفاژهای موش BALB/c

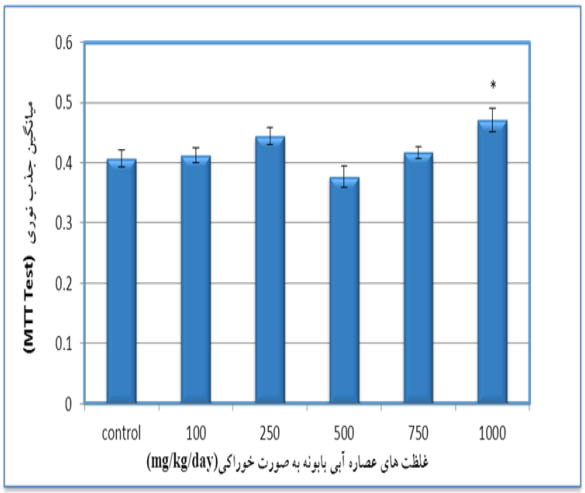
همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، عصارهٔ اتانولی بابونه به‌روش تزریقی، در دوزهای ۷۵mg/kg و ۱۰۰ mg/kg کاهش معنی‌داری ($p \leq 0.05$) را در فعالیت حیاتی ماکروفاژها در گروه‌های تیمارشده نسبت به گروه کنترل موجب شده است. اثر معنی‌داری در دوزهای دیگر عصاره مشاهده نشد. درحالی‌که عصارهٔ آبی بابونه به‌صورت تزریقی در ۵۰mg/kg به‌طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت حیاتی ماکروفاژها شد (شکل ۲).



شکل ۱. اثر عصارهٔ اتانولی بابونه به‌روش تزریقی بر ماکروفاژها در دوزهای متفاوت. علامت * نشان‌دهندهٔ معنی‌داربودن تغییر در آن دوز است. فعالیت حیاتی سنجش‌شده به‌روش MTT در دوزهای ۷۵ mg/kg و mg/kg ۱۰۰ به‌شکل معنی‌دار ($p \leq 0.05$) کاهش یافته است.



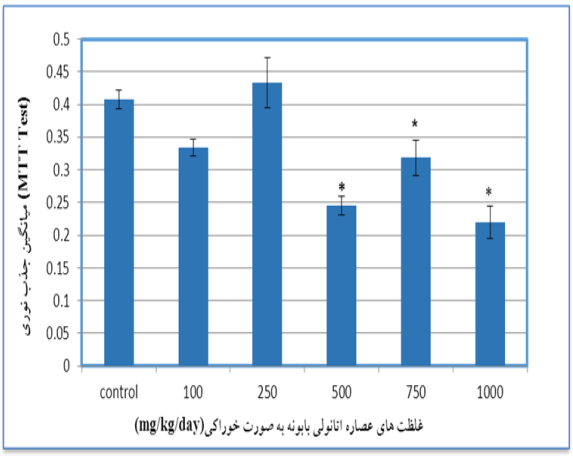
شکل ۲. اثر عصارهٔ آبی بابونه به‌روش تزریقی بر ماکروفاژها در دوزهای متفاوت. علامت * نشان‌دهندهٔ معنی‌داربودن تغییر در آن دوز است. فعالیت حیاتی سنجش‌شده به‌روش MTT در دوز ۵۰ mg/kg به‌شکل معنی‌دار ($p\leq0.05$) افزایش یافته است



شکل ٤. اثر عصارهٔ آبی بابونه به‌صورت خوراکی بر ماکروفاژها در دوزهای متفاوت. علامت * نشان‌دهندهٔ معنی‌داربودن تغییر در آن دوز است. فعالیت حیاتی سنجش‌شده به‌روش MTT در دوز ۱۰۰۰ mg/kg به‌شکل معنی‌دار ($p\leq0.05$) کاهش یافته است.

تأثیر عصارهٔ آبی و اتانولی بابونه به‌صورت خوراکی بر فعالیت حیاتی ماکروفاژهای موش BALB/c

عصارهٔ اتانولی به‌صورت خوراکی با تأثیر بر سلول‌های ماکروفاژ در دوزهای ۵۰۰ mg/kg و ۷۵۰ و ۱۰۰۰ mg/kg به‌طور معنی‌داری ($p\leq0.05$) باعث کاهش فعالیت حیاتی آن‌ها شد (شکل ۳).

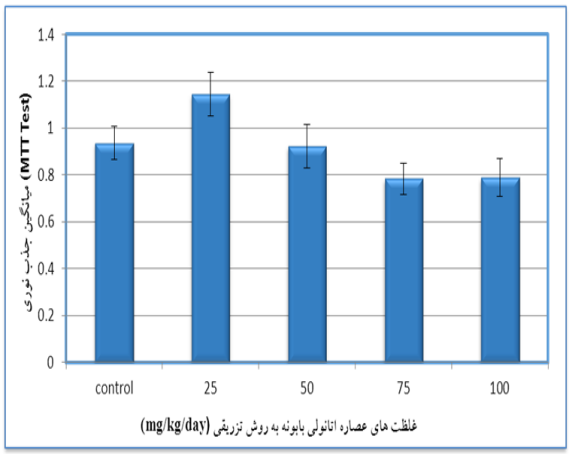


شکل ۳. اثر عصارهٔ اتانولی بابونه به‌صورت خوراکی بر ماکروفاژها در دوزهای متفاوت. علامت * نشان‌دهندهٔ معنی‌داربودن تغییر در آن دوز است. فعالیت حیاتی سنجش‌شده به‌روش MTT در دوزهای ۵۰۰ و ۷۵۰ و mg/kg ۱۰۰۰ به‌شکل معنی‌دار ($p\leq0.05$) کاهش یافته است.

عصارهٔ آبی تنها در دوز mg/kg ۱۰۰۰ و به‌صورت خوراکی به‌طور معنی‌داری ($p\leq0.05$) سبب افزایش فعالیت حیاتی ماکروفاژها شد (شکل ٤).

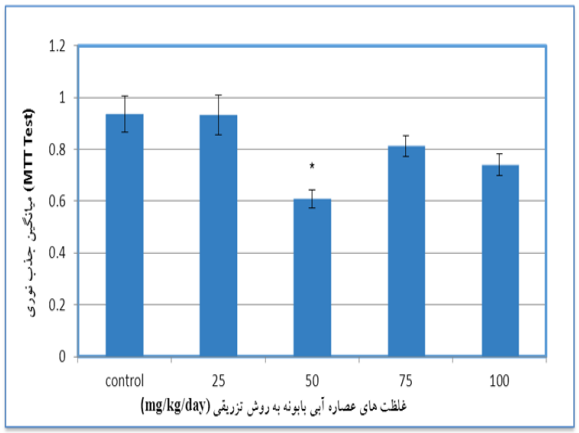
تأثیر عصارهٔ آبی و اتانولی بابونه به‌روش تزریقی بر فعالیت حیاتی لنفوسیت‌های موش BALB/c

عصارهٔ اتانولی به‌روش تزریقی با تأثیر بر سلول‌های لنفوسیت در هیچ‌یک از دوزها نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را بر روی فعالیت حیاتی لنفوسیت‌ها نشان نداد (شکل ۵).



شکل ۵. اثر عصارهٔ اتانولی بابونه به‌روش تزریقی بر لنفوسیت‌ها در دوزهای متفاوت. فعالیت حیاتی سنحش‌شده به‌روش MTT در هیچ‌کدام از دوزها تفاوت معنی‌داری نسبت به کنترل نشان نداده است.

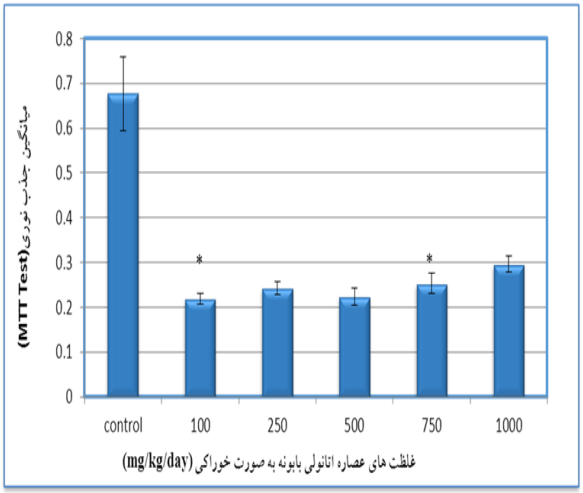
عصارهٔ آبی به‌روش تزریقی نیز تنها در دوز mg/kg ۵۰ به‌طور معنی‌داری ($p\leq0.05$) کاهش فعالیت حیاتی لنفوسیت‌ها را موجب شد (شکل ٦).



شکل ۶. اثر عصارهٔ آبی بابونه به‌روش تزریقی بر لنفوسیت‌ها در دوزهای متفاوت. فعالیت حیاتی سنجش‌شده به‌روش MTT در غلظت ۵۰ mg/kg نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری ($p\leq0.05$) داشته است.

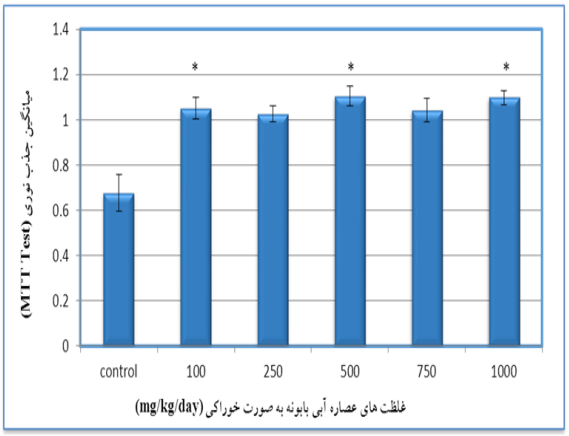
تأثیر عصارهٔ آبی و اتانولی بابونه به‌صورت خوراکی بر فعالیت حیاتی لنفوسیت‌های موش BALB/c

تجویز خوراکی عصارهٔ اتانولی با تأثیر بر سلول‌های لنفوسیت در دوزهای ۱۰۰ mg/kg و ۷۵۰ به‌طور معنی‌داری ($p\leq0.05$) باعث کاهش فعالیت حیاتی آن‌ها شد (شکل ۷).



شکل ۷. اثر عصارهٔ اتانولی بابونه به‌صورت خوراکی بر لنفوسیت‌ها در دوزهای متفاوت. فعالیت حیاتی سنجش‌شده به‌روش MTT در غلظت‌های ۱۰۰ mg/kg و ۷۵۰ mg/kg نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری ($p\leq0.05$) داشته است.

تجویز خوراکی عصارهٔ آبی نیز در دوزهای mg/kg ۱۰۰ و mg/kg ۵۰۰ و mg/kg ۱۰۰۰ به‌طور معنی‌داری ($p\leq0.05$) افزایش فعالیت حیاتی لنفوسیت‌ها را موجب شد (شکل ۸).



شکل ۸. اثر عصارهٔ آبی بابونه به‌صورت خوراکی بر لنفوسیت‌ها در دوزهای متفاوت. فعالیت حیاتی سنجش‌شده به‌روش MTT در غلظت‌های ۱۰۰ mg/kg و ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نسبت به کنترل افزایش معنی‌داری ($p\leq0.05$) داشته است.

بحث و نتیجه‌گیری

بابونه گیاهی دارویی با قدمت بسیار طولانی و مصارف متعدد در طب سنتی است که امروزه به دلیل وجود ترکیباتی چون فلاونوئیدها و سزکوئی‌ترپن‌ها به‌عنوان یک داروی ضدالتهاب مورد توجه قرار گرفته است (۷،٦-١٤). مطالعهٔ حاضر با هدف تعیین اثر عصاره‌های آبی و اتانولی این گیاه، بر فعالیت حیاتی سلول‌های ماکروفاژ و لنفوسیت موش BALB/c در شرایط *in vivo* در دوزهای متفاوت و به دو شکل تزریقی و خوراکی صورت گرفت.

نتایج این پژوهش نشان داد که عصارهٔ اتانولی گل بابونه به‌روش تزریقی در غلظت‌های mg/kg ۷۵ و mg/kg۱۰۰ و به‌صورت تجویز خوراکی در غلظت‌های mg/kg ۵۰۰ و ۷۵۰ و mg/kg۱۰۰۰ موجب کاهش فعالیت حیاتی ماکروفاژها شد و عصارهٔ آبی گیاه به‌صورت تزریقی در غلظت mg/kg ۵۰ موجب افزایش فعالیت حیاتی و در حالت خوراکی در غلظت mg/kg ۱۰۰۰ باعث افزایش فعالیت حیاتی ماکروفاژها شد.

در مطالعه‌ای که توسط Drummond و همکاران (۲۰۱۳) صورت گرفت، اثر پلی فنل‌های مشتق از عصارهٔ آبی بابونه ازجمله اپی‌ژنین و کوئرستین بر مهار بیومارکرهای التهابی در ماکروفاژ THP1 به‌صورت

in vitro بررسی شد (۱۳). آن‌ها گزارش کردند که اپی‌ژنین و کوئرستین در غلظت ۲۵μM موجب کاهش فعالیت حیاتی در ردهٔ سلولی ماکروفاژهای انسانی THP_1 می‌شوند. نتایج تحقیق حاضر درمورد اثر عصارهٔ اتانولی با نتایج مطالعه اخیر همخوانی داشت؛ اما با نتایج MTT حاصل از اثر عصارهٔ آبی آن‌ها تفاوت نشان داد. به‌نظر می‌رسد، این تفاوت به دلیل تفاوت در شرایط انجام آزمایش و همچنین نوع سلول موردآزمایش و همچنین به دلیل نوع داروی تجویزشده باشد؛ همچنین نتایج مطالعهٔ حاضر با نتایج مطالعاتی که اثر ترکیبات مؤثر بابونه را به‌صورت جداگانه بر روی ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها بررسی کرده‌اند نیز همخوانی دارد. به‌طور مثال، Wang و همکاران (۲۰۱۵) اثر وابسته به دوز و زمان مصرف اپی‌ژنین را بر کاهش حیات ماکروفاژهای موش گزارش کرده‌اند (۱۵). در مطالعه‌ای دیگر که توسط Liao و همکاران (۲۰۱٤) بر روی ماکروفاژهای ANA-1 به‌صورت *in vitro* انجام گرفت، کاهش فعالیت حیاتی این ماکروفاژها توسط اپی‌ژنین به‌صورت وابسته به دوز و زمان گزارش شده است (۱٦). نتایج MTT ماکروفاژ مطالعهٔ حاضر با نتایج گزارش‌های فوق همخوانی دارد. نتایج مطالعهٔ حاضر درمورد اثر عصارهٔ اتانولی بابونه با نتایج Shinfh و همکاران در سال (۲۰۱۲) که کاهش فعالیت حیاتی ردهٔ سلولی ماکروفاژهای RAW را در اثر مصرف اپی‌ژنین گزارش داده‌اند، همخوانی دارد (۱۷). از طرف دیگر، نتایج این پژوهش نشان داد که تجویز خوراکی عصارهٔ آبی بابونه در دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰ و mg/kg ۱۰۰۰ و تجویز خوراکی عصارهٔ اتانولی در دوزهای ۱۰۰ و mg/kg ۷۵۰ موجب افزایش فعالیت حیاتی لنفوسیت‌ها شده است. Verbeek و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه‌ای، اثر تجویز خوراکی فلاونوئیدهایی مانند اپی‌ژنین و لوتئولین را بر بهبود موش‌های EAE بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که فلاونوئیدهای مورداستفاده، تکثیر سلول‌های T را ٤۰ تا ٦۰درصد و همچنین تولید IFN-γ را کاهش دادند و همچنین شروع علائم EAE را به تعویق انداختند (۱۱).

نتایج مطالعهٔ حاضر درمورد اثر عصارهٔ اتانولی بابونه با نتایج این مطالعه همخوانی دارد. در مطالعه‌ای که توسط امیرغفران و همکاران (۲۰۰۰) صورت گرفت، اثر عصارهٔ اتانولی گیاهان دارویی چون *M. chamomilla*، *marianum, Calendula officinalis, Chichorium intybus, Silybum Dracocephalum koschyi* بر روی لنفوسیت‌های خون محیطی و تیموسیت‌های انسانی مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، اثر عصارهٔ این گیاهان بر پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های انسانی به PHA مطالعه شد و نتایج نشان داد که عصارهٔ بابونه هیچ‌گونه اثری بر لنفوسیت‌های خون محیطی و تیموسیت‌های انسانی در حضور میتوژن نداشته است؛ درحالی‌که عصارهٔ بابونه به‌تنهایی موجب افزایش تکثیر لنفوسیت‌ها شد. نتایج پژوهش حاضر درمورد اثر عصارهٔ آبی با نتایج این مطالعه همخوانی دارد؛ اما درمورد عصارهٔ اتانولی نتایج دو مطالعه تفاوت نشان دادند. احتمالاً این تفاوت می تواند به دلیل اختلاف در شرایط انجام آزمایش و نوع سلول موردآزمایش باشد (۱۸). Ogata و همکاران (۲۰۱۰) در ژاپن اثر بیزابولول اکساید (bisabololoxide A) استخراج‌شده از *M. chamomile* را بر روی آپوپتوز تیموسیت‌های موش رت با تکنیک فلوسایتومتری به‌صورت *in vitro* بررسی کردند (۱۹). نتایج آن‌ها حاکی‌از افزایش آپوپتوز و کاهش جمعیت تیموسیت‌ها در غلظت‌های ۳۰ تا μm ۱۰۰ بیزابولول اکساید بود. نتایج مطالعهٔ حاضر با نتایج فوق نیز همخوانی دارد.

مطالعات متعددی اثر ضدالتهابی بابونه را در مدل‌های مختلف نشان داده‌اند؛ ولی درمورد مکانیسم این اثر مطالعات کمتری انجام شده است. برای مثال در مطالعه‌ای اثر روغن بابونه بر روی ترمیم زخم برشی بر روی رت مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن نشان داد که عصارهٔ روغنی بابونه به‌طور معنی‌داری مساحت سطح زخم را در گروه درمان نسبت به گروه کنترل کاهش می‌دهد. محققین این نتیجه را به دلیل اثرات ضدالتهابی و ضدباکتریایی گیاه بابونه که در ترمیم زخم مدنظر است، مرتبط دانسته‌اند (۲۰).

در مطالعهٔ دیگری اثر ضددردی و ترمیم زخم عصارهٔ متانولی گل *M. chamomilla* در موش سوری و معدهٔ رت مورد بررسی قرار گرفت و باتوجه‌به نتایج به‌دست‌آمده، گزارش شد که عصارهٔ حاصل از روش پرکولاسیون با دوز

۲۰۰ mg/kg بیشترین اثر ضددردی را داشت. در این تحقیق بیان شد که اثر ضددردی عصارهٔ بابونه از طریق سیستم اپیوئیدی اعمال نمی‌شود و احتمالاً ناشی از تأثیر بر فرایندهای التهابی است؛ به بیان دیگر بابونه دارای خاصیت ضدالتهابی است (۲۱).

همچنین اثر کاهشی قابل‌توجه و وابسته به دوز عصارهٔ بابونه بر میانگین شدت درد در طول یک ساعت پس از تزریق زیرجلدی فرمالین نشان داده شده است. نتایج حاصل حاکی‌از آن بوده که عصارهٔ بابونه درد مزمن را بیشتر از حاد تحت‌تأثیر قرار می‌دهد. باتوجه‌به اینکه درد مزمن تا حد زیادی ناشی از فرایندهای التهابی است و به‌نظر می رسد که اثرات ضدالتهابی بابونه باعث چنین اثری شده است (۲۲).

Miguel و همکاران (۲۰۱۵) اثر ضدالتهابی اپی‌ژنین جداشده از *M. chamomile* را بر روی ماکروفاژهای جداشده از مغز استخوان موش‌های C57Bl/6 به‌صورت *in vitro* بررسی کردند. درنتیجه مقدار TNFα اندازه‌گیری‌شده به‌روش الایزا کاهش پیدا کرد و بر روی فعالیت حیاتی بی‌تأثیر بود (۳).

نتیجه‌گیری

درمجموع، این مطالعه نشان داد که عصارهٔ اتانولی *M. chamomilla* هم به‌روش تزریقی و هم خوراکی، موجب کاهش فعالیت حیاتی هم در لنفوسیت‌ها و هم در ماکروفاژها می شود؛ همچنین نتایج پژوهش حاکی‌از آن بود که عصارهٔ اتانولی *M. chamomilla* می‌تواند دارای اثرات ضدالتهابی باشد؛ به‌عبارت‌دیگر عصارهٔ این گیاه در کاهش التهاب و تضعیف سیستم ایمنی مؤثر است. این در حالی است که عصارهٔ آبی *M. chamomilla* هم به‌روش تزریقی و هم به‌صورت خوراکی، موجب افزایش فعالیت حیاتی ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها شد و نتایج حاکی‌از آن بود که عصارهٔ آبی برخلاف عصارهٔ اتانولی گیاه می‌تواند موجب افزایش التهاب و تقویت سیستم ایمنی شود.

باتوجه‌به مطالعات انجام‌شده درمورد اثرات ضدالتهابی بابونه در مدل‌های مختلف بیماری و کاربردهای این گیاه دارویی در طب سنتی، نتایج این مطالعه با تأیید اثر ضدالتهابی عصارهٔ اتانولی بابونه، باتوجه‌به کاهش فعالیت حیاتی ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها این اثر را به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های ضدالتهابی این گیاه مطرح می‌نماید.

بررسی سطح سایتوکاین‌ها و سایر مولکول‌های التهابی و همچنین وضعیت فعالیت سایر سلول‌های التهابی پیشنهاد می‌شود.

منابع

1. Tolouee M, Alinezhad S, Saberi R, Eslamifar A, Zad SJ, Jaimand K, et al. Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. International Journal Food Microbiology. 2010 May 15;139(3):127-33.
2. The chamomile in Islamic and Iranian traditional medicine context. 2. [Research]. 2013;4(1):79-85.
3. Miguel FG, Cavalheiro AH, Spinola NF, Ribeiro DL, Barcelos GR, Antunes LM, et al. Validation of a RP-HPLC-DAD Method for chamomile (*Matricaria recutita*) preparations and assessment of the marker, apigenin-7-glucoside, safety and anti-Inflammatory effect. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015;2015:828437.
4. Arzi A, Kesmati M, Alikhani M. Preventive effect of hydroalcoholic extract of *Matricaria Chamomilla* on Nicotine induced convulsions in mice. Journal of Babol University Of Medical Sciences. [Research]. 2004;6(2):12-7.
5. Mazandarani M, Hoseini F, Seifi A, Bayat H, Pourabouk M, Badaghabadi F, et al. Role of Histaminegic and calcium channels in the inhibitory effects of hydroalcoholic extract of *Matricaria recutita* L. on isolated rabbit jejunum. Physiology and Pharmacology. [Original Research]. 2011;15(3):361-70.
6. Mehmood MH, Munir S, Khalid UA, Asrar M, Gilani AH. Antidiarrhoeal, antisecretory and antispasmodic activities of *Matricaria chamomilla* are mediated predominantly through K(+)-

channels activation. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2015;15:75.

7. Singh O, Khanam Z, Misra N, Srivastava MK. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. Pharmacognosy Reviews. 2011;5(9):82-95.

8. Morteza Jarrahi, Mitra Emami Abarghooee The effect of hydroalcoholic *Matricaria chamomilla* extract on cutaneous burn wound healing in albino Rats. Journal of Gorgan University of Medical Sciences. [Original Articles]. 2008;10. 6-22:(2)

9. Ahmadi Nejad S, Abbasnejad M, Derakhshanfar A, Esmaili Mehani S, Kohpeyma H. The Effect of Intracolonic *Matricaria recutita* L. aqueous extract on acetic acid–induced ulcerative colitis in adult male rats. Govaresh. 2014;19(1):31-8.

10. Thilakarathna S H, Vasantha Rupasinghe H P. flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. Nutrients. 2013; 5: 3367-3387

11. Verbeek R ,van Tol EA, van Noort JM. Oral flavonoids delay recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice. Biochemical Pharmacology. 2005; 15;70(2):220-8.

12. Lee SH, Heo Y, Kim YC. Effect of *German chamomile* oil application on alleviating atopic dermatitis-like immune alterations in mice. Journal of Veterinary Science. 2010 Mar;11(1):35-41.

13. Drummond EM, Harbourne N, Marete E, Martyn D, Jacquier J, O'Riordan D, et al. Inhibition of proinflammatory biomarkers in THP1 macrophages by polyphenols derived from chamomile ,meadowsweet and willow bark. Phytotherapy Research. 2013; 27(4):588-94.

14. Gibran NS, Heimbach DM. Current status of burn wound pathophysiology. Clinics in Plastic Surgery. 2000;27(1):11-22.

15. Zeng P, Liu B, Wang Q, Fan Q, Diao JX, Tang J, et al. Apigenin attenuates atherogenesis through inducing macrophage apoptosis via inhibition of AKT Ser473 phosphorylation and downregulation of plasminogen activator Inhibitor-2. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2015; 2015:379538.

16. Liao Y, Shen W, Kong G, Lv H, Tao W, Bo P. Apigenin induces the apoptosis and regulates MAPK signaling pathways in mouse macrophage ANA-1 cells. PLoS One. 2014;9(3):e92007.

17. Shin HJ, Lee SY, Kim JS, Lee S, Choi RJ, Chung HS, et al. Sesquiterpenes and other constituents from *Dendranthema zawadskii* var. *latilobum*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo). 2012;60(3):306-14.

18. Amirghofran Z, Azadbakht M, Karimi MH. Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. Journal of Ethnopharmacology. 2000;72(1-2):167-72.

19. Ogata I, Kawanai T, Hashimoto E, Nishimura Y , Oyama Y, Seo H. Bisabololoxide A, one of the main constituents in *German chamomile* extract, induces apoptosis in rat thymocytes. Archives of Toxicology. 2010;84(1):45-52.

20. Jarrahi M, Zahedi M, Taherian A, Miladi H, Safakhah H. Evaluation of Topical *Matricaria chamomilla* L. Oil extract activity on linear incisional wound healing in albino rats. Journal of Medicinal Plants. [Research]. 2009;4(29):94-9.

21. Heidari MR, Asadipour A, Ghayoor M. Evaluation of analgesic and ulcerogenic effect of Methanolic extract of *Matricaria Chamomilla* L. The Journal of Qazvin University of Medical Sciences. [Research]. 2002;5(4):15-23.

22. Vahidi A, Dashti M. A. Comparison between the analgesic effect of chamomile extract and morphine in Syrian mice. Journal of Ardabil University of Medical Sciences. 2007;7(4):409-17.

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University
23nd Year, No.122
April- May, 2016

Evaluation of aqueous and ethanolic extracts of Matricaria chamomile on viability of macrophages and lymphocytes in BALB/c mice

Helia Hatami, Toba Ghazanfari*, Tayebeh Radjabian, Razieh Dilmaghanian

Immunoregulation Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

*** Corresponding author e-mail: tghazanfari@yahoo.com**

Abstract

Background and Objective: Matricaria chamomilla L. (MC) has been used as an effective plant for wounds, gastrointestinal disorders, pharyngitis, rheumatic pain and infertility for years. Until now, an in vivo study showing its extract effect on immune cells viability has not been done. The aim of this study was to determine the in vivo effects of MC aqueous and ethanolic extracts on macrophages and lymphocytes viability in BALB/c mice by MTT assay.

Materials and Methods: The study was conducted on 110 mice. Four groups (each with 5 mice) were intraperitoneally injected with 25-100 mg/kg/day ethanolic extracts and five groups were orally treated with 100-1000 (mg/kg/day) ethanolic extract for 15 days. The same treatment groups were used for the aqueous extracts. On day 16, macrophages and lymphocytes were separated from the peritoneum and spleen of mice, respectively.

Results: The viability of macrophages decreased in the injected mice with 75 and 100 mg/kg, and in the orally treated groups with 500, 750 and 1000 mg/kg ethanolic extracts, but increased in the treated mice with 50 (injected) and 1000 (orally) aqueous extracts. The viability of lymphocytes also decreased in the orally treated groups with 100 and 750 mg/kg ethanolic extracts and increased in the orally group with 100, 500 and 1000 mg/kg aqueous extracts.

Conclusions: MC ethanolic extracts effectively reduced the in vivo viability of macrophages and lymphocytes as compared to the aqueous extract. This reduction could be due to the anti-inflammatory effect of the ethanolic extract; however the aqueous extract may be promoted the immune system.

Key words: Matricaria chamomile, Macrophage, Lymphocyt, Viability

Received: 17/02/2016
Last revised: 12/04/2016
Accepted: 19/04/2016