

مطالعه تاثیر عصاره آبی_ الکی زعفران بر تغییرات لنفوسیت در مایع لاواژ موش صحرایی مبتلا به آسم

سمیه وثوقی^{۱*}، علی نعمتی^۲، حیدر آقا بابا^۳، سکینه وثوقی^۴

^۱ کارشناس ارشد علوم جانوری، دانشگاه پیام نور، واحد بشرویه، خراسان جنوبی، ایران

^۲ عضو هیات علمی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد

^۳ عضو هیات علمی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارسنجان

^۴ کارشناس مهندسی تکنولوژی تولیدات گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گناباد

* نویسنده مسئول: دانشگاه پیام نور، واحد بشرویه، خراسان جنوبی

پست الکترونیک: S_vosooghi23@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: آسم یک بیماری التهابی مزمن مجاری تنفسی است که با انفیلتراسیون سلول های *Mast cell* و ائوزینوفیل و لنفوسیت و به دنبال آن ادم مجاری هوایی شناخته می شود. تحقیقات اخیر بر نقش درمانی مواد آنتی اکسیدان در آسم دلالت دارد. زعفران بدلیل خاصیت آنتی اکسیدانی می تواند از افزایش رادیکال آزاد جلوگیری و در رفع عوارض بیماری موثر باشد.

مواد و روش کار: پژوهش حاضر یک مطالعه تجربی بود. برای بررسی تاثیر عصاره زعفران بر تغییرات سلول های لنفوسیت، ۴۰ سر موش صحرایی به ۵ گروه کنترل، آسمی و آسمی دریافت کننده عصاره با دوزهای ۲۰۰ mg/kg و ۱۰۰ و ۵۰ تقسیم شدند و مورد آزمایش قرار گرفتند. موش های صحرایی جهت ابتلا به آسم اوالبومین تزریقی و استنشاقی و گروه کنترل به صورت مشابه محلول سالین دریافت کردند. گروه تحت درمان همزمان با القاء آسم عصاره را دریافت نمودند. در این تحقیق تعداد سلول های لنفوسیت در مایع لاواژ هر پنج گروه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها: نتایج بدست آمده حاکی از افزایش معنادار لنفوسیت در مایع لاواژ نمونه های گروه آسمی نسبت به کنترل و همچنین کاهش معنادار این سلول ها در مایع لاواژ گروه های تیمار شده با دوزهای سه گانه عصاره زعفران نسبت به گروه آسمی در حد $P < 0.05$ بود.

نتیجه گیری: عصاره زعفران بر روی گلبول های سفید و بخصوص لنفوسیت ها به خاطر آزاد کردن میانجی های التهابی که موجب انقباض مجاری تنفسی می گردند موثر است.

واژه های کلیدی: آسم، سیستم ایمنی، عصاره آبی - الکی زعفران، لنفوسیت، مایع لاواژ

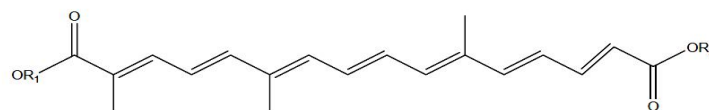
مقدمه

براساس آخرین و کاملترین تعریف، آسم یک بیماری التهابی مزمن مجاری تنفسی است که واکنش های التهابی، واسطه ای برای نفوذ انواع سلول های مؤثر مانند مونوسیت ها، ماست سل ها، نوتروفیل ها، لنفوسیت های T و غیره به درون

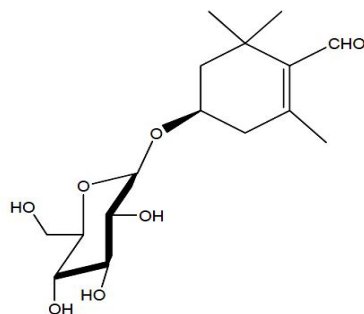
مجاری هوایی می شود، در افراد مستعد، این التهاب منجر به حملات مکرر خس خس، تنگی نفس، گرفتگی قفسه سینه و سرفه بخصوص در شب و اوائل صبح می شود [۱]. با اینکه آسم معالجه کامل نمی شود، اما بیشتر مبتلایان می توانند آن را با پیروی از دستور متخصصان و مصرف داروهای مناسب و موثر تجویز شده، کنترل کنند. آسم اغلب از دوران

در طب سنتی ایران و بسیاری از کشورهای دیگر از جمله چین و یونان به خواص زیادی از زعفران (عمدتاً کلاله) اشاره شده، که در دوزهای پائین می تواند اثرات آرام بخشی، نشاط آوری، ضد اسپاسم، فرونشاندن ورم ها، مسکن سرفه، تقویت بینایی، رفع بی خوابی با منشاء عصبی، تسکین سرفه (در آسم، سیاه سرفه و التهاب های ریه) باشد [۱۰]. بنابراین با توجه به خاصیت ضد التهابی و آنتی اکسیدانی زعفران که در طب سنتی به آن تاکید شده و بر اساس جستجوهای جامع صورت گرفته تا زمان طراحی این تحقیق، هیچ پژوهشی درباره بررسی تاثیر عصاره کامل آبی - الکلی زعفران بر تغییرات درصد لنفوسیت های مایع لاواژ موش های صحرایی نژاد ویستار مبتلا به آسم یافت نشده، لذا انجام این پژوهش ضروری به نظر می رسید تا در کاهش اثرات جانبی مخرب داروهای سنتزی از طریق جایگزینی داروهای گیاهی در افراد مبتلا به آسم مورد استفاده قرار گیرد.

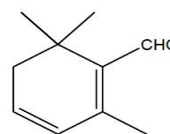
خردسالی شروع شده و ممکن است تا پایان زندگی ادامه پیدا کند. البته اگر آسم درمان و تحت کنترل قرار نگیرد، می تواند سبب ضایعات گسترده ای در مجاری تنفسی شود. هنوز علت آسم به روشنی معلوم نیست ولی مشخصاً شیوع این بیماری در افراد آلرژیک بیشتر است [۲]. اتوزینوفیل ها، نوتروفیل ها، لنفوسیت های T و پلاکت ها، سلول های التهابی هستند که می توانند با ترشح چند ماده میانجی در افزایش پاسخ دهی مجاری تنفسی نقش داشته باشند و این مواد میانجی عبارتند از: پروستاگلاندین $F2\alpha$ ، پروستاگلاندین I_2 ، لکوترین C4 و B4، پروستاگلاندین D2، برادی کینین و ماده P [۳-۵]. پاسخ التهابی در آسم با پاسخ دهی بیش از اندازه مجرای هوا، تولید زیاد موکوس و تصفیه (نفوذ) موکوس ریوی به همراه سلول های $CD4^+$ T- cells، بسیار در ارتباط است [۶]. تحقیقات اخیر بر نقش درمانی مواد آنتی اکسیدان در بیماری آسم دلالت دارد [۱]. عصاره زعفران به دلیل وجود سه ترکیب مهم کروستین و مشتقات آن، پیکروکروستین و سافرانال (تصویر ۱) در کلاله خود خاصیت آنتی اکسیدانی دارد و می تواند از افزایش رادیکال های آزاد جلوگیری کند [۸،۹].



Crocin-1 ($R^1 = R^2 = \text{gentiobiosyl-}$) 1
 Crocin-2 ($R^1 = \text{gentiobiosyl-}$, $R^2 = \text{glucosyl-}$) 2
 Crocin-3 ($R^1 = R^2 = \text{glucosyl-}$) 3
 Crocin-4 ($R^1 = \text{gentiobiosyl-}$, $R^2 = \text{H}$) 4
 Crocin-5 ($R^1 = \text{glucosyl-}$, $R^2 = \text{H}$) 5
 Crocetin ($R^1 = R^2 = \text{H}$) 6



Picrocrocin 7



Safranal 8

شکل ۱: ساختمان شیمیایی ترکیبات اصلی کلاله زعفران.

روش کار

در این پژوهش که از نوع مقایسه ای و بین لنفوسیت های مایع لاواژ نمونه های گروه کنترل، مبتلا به آسم و تیمار شده با سه دوز عصاره زعفران انجام شد، چون این سلول ها به طور عمده و مستقیم در ارتباط با سیستم ایمنی عمل می کنند در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد نمونه در هر گروه ۸ سر موش صحرانی نژاد ویستار با وزن تقریبی ۱۵۰-۱۴۵ گرم انتخاب شدند. نمونه های مورد آزمایش حدودا ۴۵ تا ۵۰ روزه بودند. آنها در اتاق حیوانات با دمای ۲۳-۲۱ درجه سانتیگراد و چرخه طبیعی روشنایی _ تاریکی (۱۲ ساعت روز و ۱۲ ساعت شب) نگهداری شده و آب و غذای کافی در اختیار داشتند. موش های صحرانی جهت مبتلا شدن به آسم اوالبومین را در اولین و هشتمین روز به صورت تزریق داخل صفاقی (۲ میلی گرم پودر اوالبومین + ۱۰۰ میلی گرم پودر هیدروکسید آلومینیوم $[Al(OH_3)]$ + ۱ میلی لیتر محلول PBS) و از روز چهاردهم تا روز ۳۲ به صورت استنشاقی دریافت نمودند. بدین صورت که روزانه مقدار ۰/۵ گرم پودر اوالبومین در ۲۵ میلی لیتر محلول PBS حل شد این محلول به کمک نبولایزر و دستگاه آئروسول بصورت بخار در آمده و به اتاقک استنشاق حاوی نمونه منتقل شد. در طول مدت ۳۲ روز نمونه های گروه کنترل به جای محلول اوالبومین، سالین را دریافت می کردند و در نمونه های گروه تحت درمان نیز همزمان با القاء آسم تجربی عصاره زعفران را در مدت سی و دو روز هفته ای دو نوبت به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت نمودند. بعد از بیهوش کردن نمونه با ماده کلرال هیدراته و بازکردن ناحیه قفسه سینه تا قسمت آرواره پائین، از ابتدای نای برش داده می شود و با کشیدن آرام نای و به دنبال آن ریه ها، دستگاه داخلی تنفس کاملا از بدن نمونه خارج می شود. سطح خارجی را با مقدار بسیار کمی آب شستشو داده و به مقدار ۲ میلی لیتر محلول PBS را با لوله موئینه و به کمک سرنگ به داخل ریه ها تزریق کرده، آرام ماساژ داده می شود تا سلول ها برای مهاجرت به محلول PBS تحریک شوند. بعد از سه دقیقه مایع تزریقی با مکش سرنگ استخراج می شود این مراحل ۵ سری انجام شد. لازم به تذکر است مقدار برداشت مایع داخلی از ریه ها به مقدار ۲ میلی لیتر از محلول PBS تزریقی است.

در نهایت تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و بر اساس آنالیز واریانس یک طرفه صورت گرفته و تعداد لنفوسیت ها (L) مایع لاواژ، در گروه های کنترل، آسمی، و آسمی دریافت کننده عصاره زعفران با دوزهای ۲۰۰ mg/kg و ۱۰۰، ۵۰ با یکدیگر مقایسه گردید و نمودار با نرم افزار Excel رسم شد.

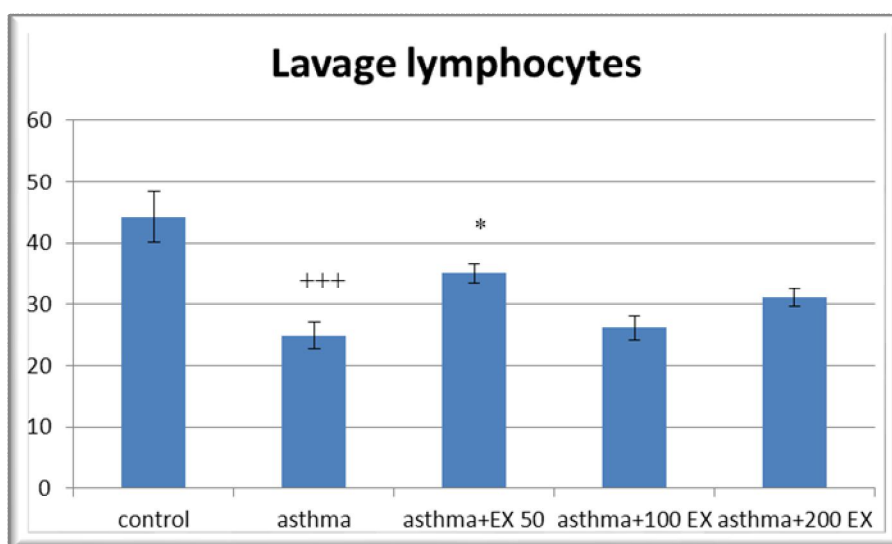
یافته ها

میانگین تعداد لنفوسیت در ۲ میلی لیتر مایع لاواژ برداشت شده، در گروه کنترل برابر با $4/23 \pm 44/25$ و در گروه آسمی $2/23 \pm 24/87$ بود که در این رابطه اختلاف معناداری بین دو گروه در حد ($p \leq 0/001$) مشاهده شد. تعداد لنفوسیت در نمونه های تحت درمان با دوز mg/kg ۵۰ عصاره زعفران برابر با $1/54 \pm 35/12$ است که در مقایسه با گروه آسمی اختلاف معنادار $p < 0/05$ داشت. این تعداد در نمونه های تحت درمان با دوز mg/kg ۱۰۰ عصاره زعفران برابر با $1/93 \pm 26/25$ بود که اختلاف معنادار با گروه آسمی داشت. تعداد لنفوسیت نمونه های تحت درمان با دوز mg/kg ۲۰۰ عصاره زعفران برابر با $1/38 \pm 31/12$ بود که در مقایسه با گروه آسمی اختلاف معنا داری نداشت (نمودار ۱).

بحث

با توجه به اثرات متعدد زعفران که ناشی از خواص ترکیبات ویژه آن می باشد و اظهارات پولون در سال ۲۰۰۸ مبنی بر شمارش کلی گلبول های سفید به ویژه، گرانولوسیت های نوتروفیلی و لنفوسیت ها در مایع لاواژ در تمام گروه های حساس شده به طور معنا داری افزایش پیدا کرده است [۱۱]، همچنین در تحقیقی که سی ریائنگ^۲ و همکارانش انجام دادند، ۴۸ ساعت بعد از آخرین آلودگی، سلول های مایع لاواژ شمارش شدند و مشاهده شد که اوالبومین باعث جریان معنادار گلبول های سفید به درون مایع لاواژ می شوند. در مطالعاتی که Paula و Portela در سال ۲۰۰۱ با ایجاد حساسیت با اوالبومین بر روی موش صحرانی نر نژاد ویستار انجام دادند افزایش لنفوسیت ها در مایع لاواژ بررسی شد و در نهایت نتیجه

1 -Pauluhn
2 -Sei-Ryang



نمودار ۱: مقایسه میانگین $\pm$ خطای معیار لنفوسیت مایع لاواژ در گروه های کنترل، آسمی و تیمار شده با عصاره زعفران
⁺⁺⁺ معرف معنی داری اختلاف بین گروه کنترل و آسمی در حد $p \leq 0.001$ می باشد.
^{*} معرف معنی داری اختلاف بین گروه آسمی و تحت درمان در حد $p < 0.05$ می باشد.

که لنفوسیت های مجاری هوایی بعد از آلودگی با آنتی ژن از ریه به مغز استخوان مهاجرت می کنند [۱۲].

نتیجه گیری

با توجه به اینکه آسم یک بیماری التهابی است بنابراین افزایش تعداد گلبول های سفید بخصوص سلول های لنفوسیت که به طور عمده و مستقیم در ارتباط با سیستم ایمنی عمل می کنند در مایع لاواژ جهت مبارزه با التهاب ضروری است و انتظار می رود عصاره زعفران بدلیل خاصیت ضد التهابی خود تعداد این سلول ها را کاهش دهد.

گیری شد که سلول های لنفوسیت T در موکوس مجاری هوایی فعال می شوند و این نتیجه هماهنگ با نتایج بدست آمده و منعکس شده در نمودار مندرج در این مقاله با بیان افزایش معنادار تعداد لنفوسیت ها در نمونه های گروه آسمی نسبت به نمونه های گروه کنترل و نمونه های گروه تیمار شده با عصاره دوز ۵۰ mg/kg نسبت به گروه آسمی است. در تحقیقی دیگر دیلمی اصل و همکاران در سال ۱۳۸۵ بر روی تغییرات شاخص های خونی در خلال ایجاد التهاب تجربی و عفونت بر روی موش صحرایی آزمایشاتی انجام دادند، میزان لنفوسیت موش صحرایی نر آلوده شده و موش صحرایی کنترل در زمان های ابتدا و انتهای آلودگی اختلاف معناداری دیده نشد اما در هفته های ۲ و ۳ و ۴ این اختلاف معنادار بود. در پژوهش دیگری که توسط بوچنر و بوس^۱ در سال ۲۰۰۵ بر روی موش صحرایی Brown Norway که توسط اوالبومین OVA حساس شده بودند مشاهده شد

References

1. Adamko D, Odemuyiwa S.O, Moqbel R. The eosinophil as a therapeutic target in asthma: beginning of the end, or end of the beginning . *Current Opinion in Pharmacology*. 2003; 3: 227–232.
2. Reddel H, Ware S, Marks G, et al. Differences between asthma exacerbations and poor asthma control. *Lancet*. 1999; 353: 364–9.
3. Barnes PJ. New concepts in the pathogenesis of bronchial hyperresponsiveness and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1989; 83(6): 1013–1026.
4. Boskabady MH. Responsiveness of human bronchi to pharmacological agonist and antagonist. Phd. Thesis, Charing cross and wesminister Medical School; London Univ. 1992; 23–28, 144–146, 165–169.
5. Canning B.J. Overview of Animal Models of Asthma. *Current Protocols in Pharmacology*. 2002; 16: 5.25.1–5.25.15.
6. Ennis D.P, Cassidy J.P, Mahon B.P. Whole-cell pertussis vaccine protects against Bordetella pertussis exacerbation of allergic asthma. *Immunology Letters*. 2005; 97: 91–100.
7. Tuna, B.S, Murphy, B.J. Biochemicak analysis of L-Type calcium channels form skeletal and cardiac muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 1999; 68: 1482–8.
8. Assimopoulou AN, Sinakos Z and Papageorgiou. Radical scavenging activity of Crocus sativus L. extract and its bioactive constituents. *Phytother*. 2005; 19: 997 – 1000.
9. Sugiura, M, Shayoma, Y, Saito, H, Abe, K. Ethanol extract of crocus sativus L Antagonizes the inhibitory action of ethanol on hippocampal long term potentiation in vivo, *phytother*. 1995; 9: 100–104.
10. Verma Sk. Bordia A. Antioxidant property of Saffron in man. *Indian J med Sci*. 1998; 52(5): 205–207.
11. Pauluhn J. Brown Norway rat asthma model of diphenylmethane-4,40-diisocyanate (MDI): Impact of vehicle for topical induction. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. . 2008; 50: 144–154.
12. Bochner B.S, Busse W.W. Allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunnol*. 2005; 115: 953–959

Study of the effect of alcoholic extract of saffron on lymphocyte changes in lavage liquid in asthmatic rat

Vosoqi S¹*, Neamati A², Aqababa H³, Vosoqi S⁴

¹ M.Sc. graduated of animals sciences, invited professor, Payam-e-Nour University, Boshrouyeh branch, South Khorasan, Iran

² Faculty of biology group, basic sciences faculty, Islamic Azad University, Mashhad branch,

³ Faculty of biology group, basic sciences faculty, Islamic Azad University, Arsanjan branch,

⁴ Graduated of plant products technology engineering, Islamic Azad University, Gonabad branch.

*Correspondence Author:

Payam-e-Nour University,
Boshrouyeh branch, South
Khorasan, Iran

Email:

S_vosooghi23@yahoo.com

Abstract

Background & Objectives: Asthma is a chronic inflammatory disease of the respiratory tract which is diagnosed by eosinophils, lymphocytes and Mast cell infiltration and edema of airways. Recent studies indicate to the therapeutic role of anti-oxidant agents in asthma. Due to anti-oxidant properties of saffron, it may prevent from increased free radical generation and be effective in reducing asthma complications

Materials and Methods: This was an experimental study. In order to investigate the effect of saffron extract on lymphocyte cells changes, 40 rat wistar were classified into five groups, i.e. control, asthma and extract-receiving asthma with 200, 100 and 50 mg/kg doses, respectively. Experimental asthma was induced in animals by evalbomine (injection/inhalation). Control group was received saline solution. During the asthma induction, the treated group was received the extract for 32 days, 2 times per week. In this study, the number of lymphocyte cells in the lavage liquid of each of the five groups was analyzed.

Results: The results showed a significant increase in lymphocytes of the lavaged fluid of asthmatic animals in comparison to those of the control group and the number of lymphocyte also significantly reduced in the groups treated with triple doses of extract in comparison to those of asthmatic group ($P < 0.05$).

Conclusion: Saffron extract has effects on white blood cells, particularly lymphocytes, which cause contraction of the respiratory tract due to release of inflammatory mediators.

Keywords: asthma, immunity system, full saffron extract, lymphocyte, lavage liquid
