View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Golestan University of Medical Sciences Repository

Original Article

Study the Effect of Echinacea Purpurea Extract on Cellular Delayed Type Hypersensitivity and Splenocyte Proliferation in BALB/c Mice

S.M. Hashemi, M.Sc.[1], S. Soudi, M.Sc.[1], A. Ghaemi, M.Sc.[2, 3], H. Soleimanjahi, Ph.D.[2*], Z.M. Hassan, Ph.D.[1]

1. Immunology Department, School of Medical Sciences,Tarbiat Modares University
2. Virology Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University
3. Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan

• ***Corresponding Address: P.O.Box: 14115-331, Virology Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University***
Email: Soleim_h@modares.ac.ir

Abstract

Received: 5/May/2007, Accepted: 2/Dec/2007

Objective: Purple cone flower plant (Echinacea purpurea) is one of the most important Herbal products in many countries. Up to now a lot of experiments demonstrated the controversial effects of this herb on immune system . In this research we study the in vivo and in vitro effect of Iranian E.purpurea extract on cellular immunity.

Materials and Methods: At first we determined the lethal dose of E.purpurea extract after intraperitoneal injection in BALB/c mice. Then we made five groups of mice and treat them by four times intraperitoneal injection of 1 ml extract at different doses (0, 0.4, 2, 10 and 50 mg/ml) during two weeks. Splenocyte proliferation response to extract was assessed by MTT method. Delayed-Type Hypersensitivity (DTH) response was evaluated by priming mice with 1×10^8 Sheep Red Blood Cell (SRBC) injected subcutaneously in the back on day 7after treatment.

Results: As a result no significant variation in weight and spleen index of test groups to control was observed. Splenocyte proliferation and DTH response of test groups to control increased significantly ($p<0.05$).

Conclusion: However these data confirmed the results of previous studies, in addition presented the first results about significant increase in DTH response that could not be seen before. Scince the main reason of this difference refers to active compounds of herb extract, comparing effective component of this extract with that of E.purpurea cultivated in other geographical condition will consider as the next studies.

Keywords: Echinacea Purpurea, Splenocyte Proliferation, Delayed Type

Yakhteh Medical Journal, Vol 9, No 4, Winter 2008, Pages: 254-261

بررسی اثر عصاره گیاه سرخارگل (Echinacea Purpurea) بر ازدیاد حساسیت تاخیری و پاسخ تکثیری سلول‌های طحال در موش BALB/c

سیدمحمود هاشمی .M.Sc[1]، سارا صعودی .M.Sc[1]، امیر قائمی .M.Sc[2,3]، حوریه سلیمان‌جاهی .Ph.D[2]*، زهیر محمدحسن .Ph.D[1]

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی شناسی
۲. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ویروس شناسی
۳. دانشگاه علوم پزشکی گلستان، دانشکده پزشکی

• آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ویروس شناسی
پست الکترونیک: Email:soleim_h@modares.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۶/۲/۱۵، پذیرش مقاله: ۸۶/۹/۱۱

* **هدف:** بررسی اثر عصاره سرخارگل ایران بر پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری

* **مواد و روش‌ها:** به این منظور ابتدا اثر کشندگی مقادیر مختلف عصاره پس از تزریق داخل صفاقی در موش BALB/c تعیین شد. سپس گروه‌های ده‌تایی از موش‌ها به مدت دو هفته و هر هفته دو بار با تزریق داخل صفاقی مقادیر ۵۰، ۱۰ ، ۲ و ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره در حجم یک میلی‌لیتر تیمار شدند. سنجش پاسخ تکثیری (پرولیفراسیون) سلول‌های طحال نسبت به عصاره در محیط کشت به روش MTT انجام شد. همچنین پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری (Delayed-Type Hypersensitivity: DTH) نسبت به گلبول قرمز گوسفند (Sheep Red Blood Cell :SRBC) ارزیابی شد.

* **یافته‌ها:** بر اساس نتایج به دست آمده تغییر معنی‌داری در وزن و اندیکس طحال موش‌های مورد مطالعه مشاهده نشد. پاسخ پرولیفراسیون سلول‌های طحال به عصاره در گروه‌های آزمایش در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری ($p<0/05$) افزایش داشت. همچنین پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری در تمام گروه‌های آزمایش به طور معنی‌داری ($p<0/05$) افزایش نشان می‌داد.

* **نتیجه‌گیری:** بر اساس این یافته‌ها، مشاهده شد عصاره سرخارگل ایران سبب افزایش تکثیر سلول‌های طحال در *in vivo* و *in vitro* می‌شود، همچنین پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری را به شدت برمی‌انگیزد. پیشتر گزارشی درباره افزایش معنی‌دار پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری ارائه نشده بود. به نظر می‌رسد ترکیبات موثره این گیاه عامل اصلی بروز تفاوت باشد، از این رو بررسی تفاوت این ترکیبات با انواع غیربومی آن مفید خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: سرخارگل، پرولیفراسیون سلولی، ازدیاد حساسیت تاخیری، تزریق داخل صفاقی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال نهم، شماره ٤، زمستان ۸۶، صفحات: ۲۶۱-۲۵٤

مقدمه

گیاه سرخارگل(Echinacea purpurea) صدها سال به عنوان گیاه دارویی در درمان سرماخوردگی، برونشیت و عفونت‌های دستگاه تنفس فوقانی و برخی التهاب‌ها استفاده می‌شد(۱، ۲) .با توجه به این مسئله محققان به بررسی تاثیر این گیاه و ترکیبات موجود در ریشه و سایر قسمت‌های گیاه بر سیستم ایمنی و عفونت‌های مختلف پرداخته‌اند (۵-۳).در مطالعات مختلف، ترکیبات موثره گیاه تخلیص و شناسایی شده‌اند که شامل سیکوریک اسید (Cichorc Acid)، پلی‌ساکاریدها و آلکیل‌آمیدها است (۶). با توجه به تنوع ترکیبات موثره در ریشه و سایر قسمت‌های گیاه، و همچنین تفاوت در منطقه جغرافیایی کشت گیاه و مسیر تجویز عصاره، نتایج تحقیقات ممکن است در بعضی موارد با هم متفاوت باشد (۲، ۷). در مطالعاتی که تاکنون انجام شده نشان داده شده است که پلی‌ساکاریدهای تخلیص شده از گیاه سرخارگل دارای خاصیت تحریک کنندگی سلول‌های ایمنی است. به طوری که باعث افزایش قدرت فاگوسیتوز، کموتاکسی و انفجار تنفسی در ماکروفاژ (۸، ۹) و همچنین نوتروفیل می‌شوند (۱۰). در مطالعات نشان داده شده است که عصاره این گیاه باعث افزایش تولید فاکتور نکروز دهنده تومور (Tumor Necrosis Factor: TNF)، اینترلوکین یک (IL-1) و اینترلوکین شش (IL-6) توسط ماکروفاژهای صفاقی می‌شود (۱۱).

تزریق ترکیبات موجود در عصاره به موش‌هایی که سیستم ایمنی آنها سرکوب شده، مقاومت موش‌ها را به عفونت‌هایی از جمله لیستریا منوسیتوژنز و کاندیدا آلبیکانس افزایش داده است (۱۲). همچنین افزایش درصد حیات (viability) سلول‌های ایمنی در اثر ترکیبات موجود در عصاره این گیاه نیز نشان داده شده است (۱۳) و در مطالعه دیگر عصاره سرخارگل باعث افزایش قدرت کشندگی سلول‌های کشنده طبیعی (Natural Killer Cell: NK) علیه سلول‌های آلوده به ویروس هرپس شده است (۱۴). همچنین گزارش شده است که ترکیبات موجود در گیاه سرخارگل بر روی برخی از سلول‌های ایمنی ازجمله لنفوسیت‌های B خاصیت تحریک‌کنندگی ندارد (۲).

در مطالعه انجام شده توسط رزلر (۱۵) تکثیر لنفوسیت‌های T به میزان کم افزایش پیدا کرده بود، اما میزان تولید اینترلوکین ۲(IL-2) و اینترفرون گاما (Gamma Interferon: IFN-γ) توسط لنفوسیت‌های T افزایش نشان نمی‌داد. همچنین در پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری که لنفوسیت‌های T عامل آن هستند، بعد از تیمار موش با عصاره

گیاه سرخارگل علیرغم افزایش نسبی تکثیر لنفوسیت‌های T تغییری مشاهده نشده بود (۲).

با توجه به این مسئله به بررسی بیشتر در مورد اثر عصاره گیاه سرخارگل ایران بر پاسخ تکثیری سلول‌های طحال و پاسخ پوستی ازدیاد حساسیت تاخیری در موش در این مطالعه پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره

عصاره الکلی خام (crude) پیکر رویشی گیاه سرخارگل (ریشه) ایران که دارای ظاهر قهوه‌ای تیره، pH=۵/۷، چگالی ۱/۰۷ درجه الکلی ۰ و مقدار ۱۰۰عدد باکتری در هر گرم است از شرکت گیاهان دارویی زردبند (Batch No: EPCO4-L002-82) خریداری شد (الکل موجود در عصاره پس ازتهیه در اثر تبخیر حذف شده است) (۱۶). به منظور استریل کردن، عصاره با استفاده از فیلترسرنگی با غشا ۰/۲۲ میکرومتری فیلتر و پس از تهیه رقت، وزن خشک آن تعیین شد. بدین منظورحجم‌های متفاوت از عصاره روی کاغذ آلومینیومی که وزن آن تا پنج رقم اعشار معلوم شده بود، ریخته شد. سپس به مدت سه ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا کاملا خشک شود. پس از خشک شدن مجددا کاغذ آلومینیومی وزن شد و اختلاف آن با وزن کاغذ آلومینیومی خالی به عنوان وزن خشک عصاره اندازه گرفته شد. میانگین اعداد به دست آمده به عنوان وزن خشک عصاره برابر ۲۵۰ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر گزارش شد.

حیوانات

موش‌های ماده BALB/c، ۸-۶ هفته‌ای از انستیتوپاستور ایران خریداری و به گروه‌های ده‌تایی تقسیم شدند. هر گروه در قفس جداگانه در شرایط استاندارد از نظر دما نور و آب و غذا قرار گرفتند. به گروهی از این موش‌ها که برای تعیین دوز کشنده به کار رفتند یک میلی‌لیتر از مقادیر مختلفی عصاره تازه (از ۰/۴ تا ۲۵۰ میلی‌گرم در میلی لیتر) به روش داخل صفاقی تزریق شد و سپس این موش‌ها از نظر رفتار، سلامت فیزیکی و میزان مرگ‌ومیر تا ۳ ماه بعد بررسی شدند.

پس از تعیین دوز کشنده به منظور انجام سایر بررسی‌ها به گروه دیگری از این موش‌ها (گروه‌های آزمایش) یک میلی‌لیتر از رقت های مختلف عصاره که واجد ۵۰ و ۱۰ و ۲ و ۰/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود تزریق شد. عمل تزریق به ترتیب معادل ۱/۶، ۰/۳، ۰/۰۶ و ۰/۰۱ گرم در هرکیلوگرم وزن بدن حیوان و به صورت داخل صفاقی به مدت دو هفته و هر هفته دو بار، انجام شد. گروه کنترل به همین روش PBS دریافت می‌کرد.

وزن موش، اندیکس طحال و ارتشاح سلول

برای تعیین وزن، موش‌ها قبل و بعد از تیمار با ترازوی حساس وزن شدند. برای تعیین اندیکس طحال، پس از خارج کردن طحال از بدن موش و تعیین وزن آن از فرمول زیر استفاده شد.

وزن بدن/۱۰۰× وزن طحال= اندیکس وزن طحال

برای تعیین وضعیت ارتشاح سلولی در طحال، ابتدا بافت طحال در فرمالین ۱۰درصد تثبیت شد و پس از مراحل آب‌گیری و پارافینه کردن، بافت‌ها به ضخامت ۵ میکرومتر برش داده و با استفاده از رنگ هماتوکسیلن- ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. با استفاده از میکروسکوپ نوری بافت طحال از نظر ارتشاح سلول در پالپ سفید و تکثیر سلول بررسی شد. در هر گروه ده موش مورد بررسی قرار گرفت.

اثر عصاره بر درصد حیات سلول‌های طحال در محیط کشت

ابتدا طحال موش‌ها به منظور جدا شدن سلول‌ها هموژن و سپس به مدت ۵ دقیقه در rpm۱۷۰۰ سانتریفیوژ شدند و به باقی‌مانده سلولی ۵ میلی‌لیتر محلول NH_4Cl برای لیز RBC اضافه شد. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، حجم آن با محیط کشت RPMI به ۱۴ میلی‌لیتر رسید و به مدت ۵ دقیقه در rpm۱۷۰۰ سانتریفیوژ شد. باقی‌مانده سلولی، در RPMI حاوی ۵درصد سرم جنین گاو (FBS) حل و پس از تعیین درصد سلول‌های زنده به میزان ۲×۱۰^۶ سلول در هر میلی‌لیتر رقیق شد. سپس میزان ۱۰۰ میکرولیتر از آن در هر چاهک پلیت ۹۶تایی کشت داده شد. این سلول‌ها در انکوباتور واجد ۵ درصد co_2 و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از مقادیر مختلف عصاره (۲۵۰ و ۵۰ و ۱۰ و ۲ و ۰/۴ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر) به صورت سه‌تایی به چاهک‌ها اضافه شد. پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، درصد حیات سلول‌های طحال با روش تریپان‌بلو و MTT تعیین شد.

پاسخ تکثیری سلول‌های طحال پس از تیمار داخل صفاقی

پس از پایان دوره تیمار، سلول‌های طحال گروه‌های آزمایش در مجاور دو دوز عصاره ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفت. پس از پایان مدت انکوباسیون، سلول‌ها از هر چاهک در میکروتیوب‌های استریل جمع‌آوری و با RPMI واجد ۵ درصد FBS دو بار در rpm۱۷۰۰ به مدت ۵ دقیقه شسته شدند تا عصاره از محیط حذف شود و رنگ عصاره با رنگ حاصل از معرف MTT تداخل نکند. سپس باقیمانده سلولی با RPMI به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسانده و معرف MTT به آن اضافه شد.

سنجش MTT

پودر MTT ۳-(۴و ۵- دی‌متیل تیازولیل ۲-) ۲- و ۵- دی‌فنیل تترازولیوم به میزان ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در PBS حل و فیلتر شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون کشت طحال، میزان ۲۵ میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه شد و مدت ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. با خاتمه زمان انکوباسیون، همزمان با تشکیل کامل کریستال‌ها، محلول رویی به آرامی از هر چاهک دور ریخته شد و میزان ۱۰۰ میکرولیتر محلول دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) برای حل کردن کریستال‌ها اضافه شد. پس از حل کردن کریستال ها، جذب رنگ تولیدشده در طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر (Labsystems Multiskan MS) خوانده و سپس اندیکس تحریکی محاسبه شد (۱۷).

ازدیاد حساسیت تأخیری (DTH)

برای انجام این تست ابتدا موش‌ها به طور تصادفی به ۵ گروه ۵تایی تقسیم شدند. سپس مقادیر ۰/۴، ۲، ۱۰ و ۵۰میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره در حجم یک میلی‌لیتر به صورت داخل صفاقی به مدت ۲ هفته و هفته‌ای دوبار تزریق شد. به گروه کنترل به صورت داخل صفاقی PBS تزریق شد. پس از اتمام دوره تیمار تعداد

1×10^8 گلبول قرمز گوسفند (SRBC) از انستیتو رازی ایران خریدای و در حجم ۰/۱ میلی‌لیتر به صورت زیر جلدی به همه گروه‌ها تزریق شد. ۵ روز بعد مقدار 1×10^8 SRBC در ۰/۱ میلی‌لیتر به کف پای چپ هر موش و هم حجم آن PBS به کف پای راست بـه صـورت زیـر جلدی تـزریـق شـد. افـزایـش ضخامت پای موش‌ها پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از کولیس (Mauser Dial Caliper-Germany) اندازه‌گیری شد و درصد افزایش ضخامت ناشی از ازدیاد حساسیت تاخیری محاسبه گردید (۱۸، ۱۹).

آنالیز آماری

در این مطالعه جهت بررسی آماری از آزمون student't-test و نرم‌افزار SPSS استفاده شد وبا تعیین $p<0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری نتایج بدست آمده مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها

دوز کشنده در موش

در بین گروه‌های آزمایش، عصاره تنها در مقدار ۲۵۰ میلی‌گرم و مقادیر بالاتر، پس از تزریق داخل صفاقی برای موش‌ها سمی بود. همه موش‌های این گروه در فاصله ۵ تا ۱۰ دقیقه دچار ضعف در حرکت و عدم تعادل شدند و پس از ۳۰ دقیقه مردند. در دوز ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ضعف در حرکت و عدم تعادل به صورت موقت مشاهده و پس از یک ساعت کاملا برطرف شد. در دوزهای پایین‌تر هیچ عارضه‌ای مشاهده نشد.

اندیکس طحال و ارتشاح سلول

از آن‌جایی که طحال یکی از مهم‌ترین اعضای معرف عملکرد سیستم ایمنی است، وزن موش و اندیکس طحال در گروه‌های مختلف بررسی شد. بر اساس نتایج، عصاره، اثری بر تغییر وزن موش و اندیکس طحال نداشته است (جدول ۱). در بررسی ارتشاح سلولی، برش‌های عرضی طحال موش‌های تیمارشده با عصاره (۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با طحال موش‌هایی که به آنها عصاره تزریق نشده بود (کنترل)، از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلن-ائوزین، با استفاده از میکروسکوپ نوری استفاده شد. همان طور که در شکل 1B مشخص است تراکم سلولی نسبت به شکل 1A (کنترل) افزایش یافته و فولیکول‌های زیادی تشکیل شده است (شکل ۱).

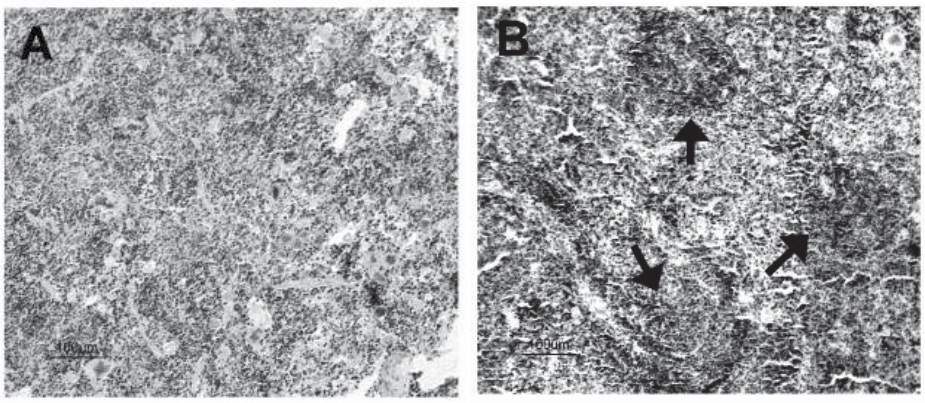
اثر عصاره بر درصد حیات سلول‌های طحال در محیط کشت

در بررسی درصد حیات به روش تریپان‌بلو نه‌تنها هیچ‌گونه اثر سایتوتوکسیک در دوزهای مختلف عصاره بر روی سلول‌های طحال موش پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مشاهده نشد، بلکه درصد حیات سلول‌ها با افزایش دوز عصاره نسبت به کنترل (سلول‌های طحال فاقد عصاره) تشدید شد. جدول۲، درصد حیات سلول‌های طحال را در مجاورت دوزهای مختلف عصاره در زمان‌های مختلف نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است با افزایش دوز عصاره از کاهش درصد حیات با گذشت زمان، کاسته می‌شود. بر اساس نتایج به دست آمده ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از انکوباسیون سلول‌های طحال در مجاور عصاره اختلاف معنی داری($p<0/05$) بین درصد حیات سلول‌های آزمایش با سلول‌های کنترل (بدون عصاره) مشاهده می شود.

جدول ۱: اثر مقادیر مختلف عصاره گیاه سرخار گل بر اندیکس طحال و تغییرات بافت شناسی آن

مقدار عصاره (میلی گرم در میلی لیتر)	اندیکس وزن طحال ± خطای استاندارد میانگین	بافت شناسی طحال
۰	۰/۴۳ ±۰/۰۵	طبیعی
۰/٤	۰/۴۹ ±۰/۰۳	فولیکول‌های بزرگ فعال شده و در حال میتوز
۲	۰/۵۵ ±۰/۰۵	فولیکول‌های بزرگ فعال شده و در حال میتوز
۱۰	۰/۴۴ ±/۰۰۴	فولیکول‌های بزرگ فعال شده و در حال میتوز
۵۰	۰/۵۰ ±۰/۰۱	فولیکول‌های بزرگ فعال شده و در حال میتوز

ده موش در هر گروه مورد بررسی قرار گرفت



شکل ۱: برش عرضی طحال موش طبیعی (A) برش عرضی طحال موشی که مقدار ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره دریافت کرده است. فلش‌ها حضور پالپ‌های سفید فعال را نشان می‌دهد (B).

در بررسی درصد حیات به روش MTT، پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، معرف MTT اضافه و پس از زمان لازم انکوباسیون، جذب چاهک‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر تعیین گردید و میزان تشدید حیات بر اساس فرمول اندیکس تحریکی به شرح زیر محاسبه شد (جدول ۳).

میانگین جذب سلول های تیمار نشده در ۵۴۰ نانومتر/میانگین جذب سلول‌های تیمارشده در ۵۴۰ نانومتر= اندیکس تحریکی

بر اساس نتایج به دست آمده دوز ۱۰ میلی گرم پس از ۴۸ ساعت و دوز ۵۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم پس از ۲۴ ساعت افزایش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در اندیکس پرولیفراسیون سلول‌های طحال در مقایسه با گروه‌هایی که با ۰/۴ و ۲ میلی گرم در میلی‌لیتر عصاره تیمار شده بودند، نشان دادند. اثر تحریکی هر دوز از عصاره بر اندیکس پرولیفراسیون با گذشت زمان افزایش می‌یابد و این افزایش وابسته به دوز است. به گونه‌ای که در ۴۸ ساعت اندیکس تحریکی القا شده توسط دوز ۵۰ میلی‌گرم تقریبا دو برابر دوز ۱۰ میلی‌گرم و دوز ۲۵۰ میلی‌گرم نیز دو برابر ۵۰ میلی‌گرم می شود.

پاسخ تکثیری سلول‌های طحال پس از تیمار داخلی صفاقی

در این بررسی اندیکس پرولیفراسیون سلول‌های طحال موش‌های تیمار شده با عصاره نسبت به موش‌های کنترل تیمار شده با PBS) محاسبه شد. در بررسی پاسخ تکثیری حال نسبت به عصاره در گروه‌های تیمار شده در هر گروه در دوز ۱۰ میلی‌گرم نسبت به کنترل (بدون تیمار ثانوی با عصاره) افزایش معنی‌داری در اندیکس پرولیفراسیون در پاسخ به تحریک مجدد با عصاره مشاهده شد (جدول ۴).

جدول ۲: درصد حیات سلول‌های طحال در مجاور مقایر مختلف عصاره به روش تریپان بلو

مقدار عصاره (میلی گرم بر میلی لیتر) / زمان	۰	۰/۴	۲	۱۰	۵۰	۲۵۰
۲۴ ساعت	۶۳±۲[a]	۶۶/۵±۱/۵[a]	۷۱±۲/۰۸	۷۵±۲/۱	۹۶/۶ ±۱/۷	۱۰۰ ±۰
۴۸ ساعت	۲۰±۰	۲۰±۰	۲۹±۲/۱	۷۰/۶±۳*	۸۵/۳±۱/۶*	۹۶/۶±۰/۳
۷۲ ساعت	۰±۰	۵±۰/۳*	۲۰± ۰*	۶۲/۳±۲/۳*	۷۱±۲*	۹۷±۱/۵

* در هر زمان بین گروه هایی که با ستاره مشخص شده اند با گروه کنترل اختلاف معنی دار ($p<۰/۰۵$) وجود دارد .
[a] میانگین انحراف معیار (اعداد میانگین بررسی در ۳ موش و به صورت۳ بار تکرار می باشد).

جدول ۳: اندیکس تحریکی سلول‌های طحال به روش MTT

	مقدار عصاره (میلی گرم بر میلی لیتر)				
زمان	۰/۴	۲	۱۰	۵۰	۲۵۰
۲۴ ساعت	۱/۱ ±۰/۰۰۶[a]	۱/۱±۰/۰۵	۱/۳±۰/۰۶	۲/۶±۰/۰۹*	۳/۶±۰/۰۵*
۴۸ ساعت	۱/۲±۰/۰۰۷	۱/۴±۰/۲	۲/۶±۰/۰۵*	۵/۲±۰/۱۴*	۱۰/۲۵±۰/۶*
۷۲ ساعت	۱/۲±۰/۰۸	۱/۲۵±۰/۰۴	۲/۲±۰/۱۴*	۷/۴±۰/۱۹*	۱۳±۰/۵*

* در هر زمان بین گروه های ستاره دار با گروه کنترل که عصاره به آن تزریق نشده اختلاف معنی دار($p< ۰/۰۵$) وجود دارد
[a]میانگین انحراف معیار (اعداد میانگین ۳ بار تکرار می باشد).
میانگین جذب سلول های تیمار نشده در ۵۴۰ نانومتر/ میانگین جذب سلول‌های تیمارشده در ۵۴۰ نانومتر= اندیکس تحریکی

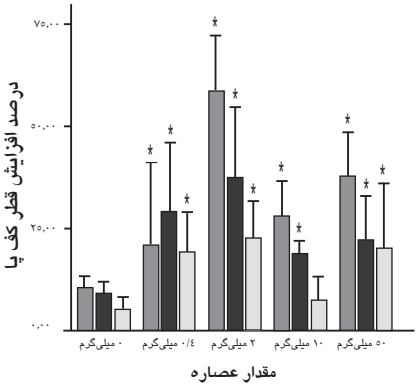
جدول ۴: میانگین پاسخ پرولیفراسیون سلول های طحال در موش های تیمار شده با عصاره نسبت به موش کنترل

	اندیکس تحریکی •خطای استاندارد میانگین			
تیمار	گروه ۱	گروه ۲	گروه ۳	گروه ٤
۵۰ میلی‌گرم	۱/۵۶ ±۰/۰۸	۱/۴۶ ± ۰/۱۳	۱/۶۶ ±۰/۰۳	۱/۳ ±۰/۰۵
۱۰ میلی‌گرم	۲/۳±۰/۰۴*	۲/۲۱±۰/۱۲*	۱/۸±۰/۱*	۱/۷۳ ± ۰/۲۴
۰ میلی‌گرم	۱/۵±۰/۰۵	۱/۳۲±۰/۰۷	۱/۱۴±۰/۰۰۳	۱/۵±۰/۰۵

گروه۱ (۵۰ میلی گرم) گروه۲ (۱۰ میلی گرم) گروه۳ (۲ میلی گرم) گروه۴ (۰/۴ میلی گرم) از عصاره را دریافت کرده اند. درهرگروه پنج موش با عصاره تیمار شده بود و هر بررسی در هر موش با ۳ بار تکرارانجام شد .در گروه هایی که با ستاره مشخص شده اند اختلاف معنی داری ($p<۰/۰۵$) در افزایش اندیکس تحریکی در حضور تیمار ثانویه عصاره نسبت به نبود آن وجود دارد.
میانگین جذب سلول‌های طحال‌درموش تیمارنشده در ۵۴۰ نانومتر/ میانگین جذب سلول‌های طحال درموش تیمارشده در ۵۴۰ نانومتر=اندیکس تحریکی

پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری

در بررسی ازدیاد حساسیت تأخیری (DTH)، افزایش معنی‌داری در گروه‌های تیمارشده با دوزهای مختلف عصاره (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ۵۰، ۰/۲، ۰/۴) نسبت به کنترل در دوز بهینه ۲میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد (ده موش در هر گروه). افزایش پاسخ DTH پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت در تمام گروه‌ها و پس از ۷۲ ساعت تنها در گروه‌های تیمارشده با دوزهای ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۲، ۰/۴ نسبت به کنترل اختلاف معنی‌دار ($p<0/05$) داشت (شکل ۲).



شکل ۲ : بررسی ازدیاد حساسیت تأخیری (DTH). در هر زمان بین گروه‌های ستاره دار با گروه کنترل که عصاره به آن تزریق نشده اختلف معنی دار($p<0/05$) وجود دارد. ده موش در هر گروه مورد بررسی قرار گرفت.

بحث

گیاه سرخارگل که در ابتدا گیاه بومی نواحی شمال آمریکا بوده است و از مدت‌ها پیش به عنوان گیاه دارویی به منظور درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرماخوردگی، عفونت‌های ویروسی و سرطان به کاربرده می شد، هم‌اکنون در بسیاری از کشورهای دنیا مصرف گسترده یافته است (۲۰). تحقیقات زیادی در زمینه اثر این گیاه دارویی در سیستم غیرزنده و زنده در کشورهای مختلف انجام شده تا مواد مؤثره و مکانیسم اثر این گیاه مشخص شود. بر این اساس امروزه سرخارگل را به عنوان گیاه محرک سیستم ایمنی مطرح می‌کنند. هرچند که ترکیبات مؤثره آن شناخته شده است، مکانیسم عمل و اثر متقابل آنها بر یکدیگر به درستی معلوم نیست (۱).

از سوی دیگر بررسی‌ها نشان می‌دهد که گونه‌های مختلف اکیناسه و بخش‌های مختلف گیاه آن (ریشه و قسمت‌های هوایی گیاه)، روش تهیه و آماده‌سازی عصاره‌های گیاهی و یا سایر فرآورده‌های، آن تأثیر متفاوتی در سیستم زنده بر جای می‌گذارند (۲). طی یک بررسی در سیستم غیرزنده نشان داده شد که در یک روش تهیه غیر استاندارد عصاره، ترشح سایتوکاین از ماکروفاژهای صفاقی موش افزایش یافته و افزایش درصد حیات و تکثیر سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی انسان تشدید می‌شود. در حالی که در یک روش استاندارد شده، فرآورده این گیاه از لحاظ ایمونولوژیک غیرفعال است ولی خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی نشان می‌دهد (۱۳).

به هر حال با توجه به مسائل گفته شده و عدم توافق عمومی بر سر روش استانداردی برای تهیه عصاره اکیناسه، به نظر می‌رسد کشورهایی که تصمیم به استفاده دارویی از این گیاه دارند باید بررسی‌های لازم را در زمینه گیاه موجود در کشور خود انجام دهند و پس از انجام کارآزمایی‌های مربوط، نسبت به روش تخلیص و تهیه فرآورده‌های مورد نیاز اقدام کنند. در این تحقیق، اثر عصاره گیاه سرخارگل ایران (تهیه شده از شرکت زردبند) بر پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری و پاسخ تکثیری سلول‌های طحال در موش BALB/c بررسی شد.

تاکنون تحقیقات انجام‌شده در حیوان آزمایشگاهی هیچ نشانی از خطر و سمیت اکیناسه ارائه نداده‌اند. بر اساس گزارش‌های موجود منگز، هیچ نوع اثر کشندگی در دوزهای خوراکی بیشتر از ۱۵گرم در کیلوگرم وزن بدن و در تزریق وریدی دوزهای بیش از ۵گرم در کیلوگرم در مورد رت یا موش مشاهده نشده است (۲۱). در این مطالعه پس از تزریق داخل صفاقی عصاره در دوز کمتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حتی با گذشت چند هفته هیچ نوع اثر کشندگی مشاهده نشد. اما دوز ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بالاتر باعث مرگ موش‌ها شد. بنابراین در این مطالعه دوزهای کمتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای بررسی‌های ایمونولوژی به کار رفتند.

افزایش درصد حیات و تکثیر سلول‌های ایمنی پیشتر در مورد فرآورده‌های این عصاره توسط محققان گزارش شده است. رینینگر و همکارانش افزایش درصد حیات سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی توسط عصاره اکیناسه را نشان داده و آن را وابسته به دوز، با دوز بهینه ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کرده‌اند (۱۳). سان و همکارانش نیز در موش‌هایی که روزانه به مدت دو هفته ۰/۴۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره ریشه‌ای E. purpurea را دریافت می‌کردند، افزایش معنی‌داری در تعداد مونوسیت‌ها و سلول‌های NK (نه لنفوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها) نسبت به گروه کنترل گزارش کرده‌اند (۳). در این مطالعه نیز در راستای بررسی اثر عصاره گیاه اکیناسه برمجموعه دیگری از سلول‌های ایمنی که در عضو لنفی طحال قرار گرفته‌اند، مشاهده شد عصاره، پس از تیمار داخل صفاقی به شدت افزایش درصد حیات و تکثیر سلول‌های طحال را در *in vitro* و *in vivo* افزایش می‌دهد. در بررسی *in vitro* این تکثیر به اندازه‌ای است که می‌توان گفت دوز ۲۵۰ میلی‌گرم پس از ۷۲ ساعت با ایجاد اندیکس تحریکی ۱۳ توانسته مانند یک میتوژن عمل کند.

در بررسی *in vivo* بر اساس شکل یک تراکم بالای سلولی در برش عرضی طحال در گروه تست نسبت به کنترل می‌تواند نشان دهنده میتوز فراوان و همچنین تجمع سلول‌های ایمنی مهاجر در پاسخ به تحریک با اکیناسه باشد. نتایج به دست آمده در پاسخ تکثیری سلول‌های طحال *in vivo* نشان می‌دهد که حضور یا عدم حضور عصاره در *in vitro*، اثری بر افزایش اندیکس تحریکی سلول های طحال موش‌هایی که عصاره را به طور داخل صفاقی دریافت کرده‌اند ندارد. این نتیجه به دلیل آن نیست که عصاره نتوانسته بر پرولیفراسیون سلول‌های طحال در *in vivo* اثر بگذارد بلکه نشان دهنده اثر بالای عصاره در*in vitro* است. به این ترتیب اثر تحریکی سلول‌هایی که قبلا در *in vivo* با عصاره تماس داشته‌اند با سلول‌هایی که در *in vivo* با عصاره تماس نداشته اند ، در حضور مجدد عصاره در*in vitro* به یکدیگر نزدیک است تا جایی که طبق جدول ۴ اندیکس تحریکی حاصل از نسبت جذب موش‌های تحریک شده به تحریک نشده در*in vivo*، به

۳ هم نمی‌رسد. با این وجود همین اثر تحریکی تجویز عصاره در *in vivo* است که باعث عدد اندیکس تحریکی ۲ و حدود آن می‌شود. این اثربه ویژه در گروهی که با دوز یادآور ۱۰ میلی‌گرم در *in vitro* مجاور شده است ، دیده می شود.

طی بررسی پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری (عبارت سنجش دیگری برای ارزیابی ایمنی سلولی حذف شده است)، افزایش معنی داری در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به کنترل در همه گروه‌ها و در زمان ۷۲ ساعت در همه گروه‌ها به جز گروه تیمارشده با مقدار ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. از آنجایی که این پاسخ احتمالا وابسته به سلول T است به نظر می‌رسد که عصاره توانسته با تأثیر بر جمعیت لنفوسیتی پاسخ DTH را برانگیزد. به منظور تعیین نقش سلول‌های T لازم است تا در بررسی‌های دیگر مطالعات بافت شناسی در محل پاسخ DTH صورت گیرد و با آزمون‌های تکمیلی فعال شدن لنفوسیت‌های T مشخص گردد. نتایج قبلی درباره اثر این گیاه بر پاسخ DTH و به طور کلی لنفوسیت‌های T بیشتر گویای اثر عصاره بر شاخه ایمنی غیراختصاصی و فعالیت‌های ایمونولوژیک ازجمله فاگوسیتوز است و نقش اکیناسه را در تقویت پاسخ‌های ایمنی سلولی از راه لنفوسیت‌ها ناچیز می‌داند. در یک بررسی در عین حال که افزایش کمی در تکثیر لنفوسیت‌های T پس از تیمار با اکیناسه گزارش شده است، نقش آن را در ازدیاد حساسیت تاخیری بی‌اثر دانسته است (۱۵). به این ترتیب به نظر می‌رسد که عصاره اکیناسه ایران به لحاظ نوع و درصد ترکیبات مؤثره متفاوت است که توانسته پاسخ DTH را القا کند. تزریق داخل صفاقی نیز می‌تواند دلیل دیگری برتفاوت القای پاسخ DTH در این بررسی باشد.

نتایج حاصل از بافت‌شناسی طحال که نمایانگر افزایش میتوز و تشکیل مراکز زایا در طحال است به خوبی یافته‌های حاصل از بررسی (DTH حذف شده است) پاسخ تکثیری سلول‌های طحال را تایید می‌کند. لازم به ذکر است که به منظور تحریک سیستم ایمنی و مشاهده پاسخ، سلول‌های سیستم ایمنی باید به دفعات و با فاصله با ماده محرک (خواه ترکیبات اکیناسه باشد خواه هر ماده مورد بررسی دیگر) مواجه شوند. به همین دلیل تزریق ۴ بار اکیناسه در مدت دو هفته انتخاب شد. در اینجا از اکیناسه به عنوان دارو استفاده نشده تا کاهش دوز یا ثابت بودن آن در بدن موش مهم باشد. چرا که در صورت تحریک سیستم ایمنی پاسخ‌های ایمنی و فعال شدن سلول‌ها به طور سلسله‌وار حتی درصورت کاهش محرک ادامه پیدا می‌کند. شاید با بررسی‌های بیشتر بتوان از خاصیت تحریک ایمنی اکیناسه به عنوان ادجوانت در کنار واکسن‌ها جهت تحریک غیر اختصاصی سیستم ایمنی استفاده کرد.

نتیجه گیری

عصاره اکیناسه حاضر همچون سایر فرآورده‌های اکیناسه واجد خواص محرک ایمنی است. یافته‌های حاصل ضمن تایید نتایج قبلی، اولین گزارش از افزایش محسوس پاسخ DTH است. از آنجایی که احتمالا سلول‌های T در پاسخ DTH شرکت دارند لازم است در مطالعات بعدی نقش عصاره در فعال شدن لنفوسیت‌های T به دقت بررسی شود. به منظور کاربردی کردن و استفاده بالینی از این گیاه دارویی، بررسی‌های دقیق و کامل‌تر ایمنی‌شناسی، تعیین نوع و درصد ترکیبات مؤثره این عصاره و مطالعات داروشناسی از جمله تعیین دز عصاره در بدن حیوان و روند حذف آن از بدن موش لازم به نظر می‌رسد.

References

1. Barrett B. Medicinal properties of Echinacea: a critical review. Phytomedicine. 2003; 10: 66-86
2. Percival S.S. Use of Echinacea in medicine. Biochem Pharmacol 2000; 15: 155-158
3. Sun LZ, Currier NL, Miller SC. The American coneflower: a prophylactic role involving nonspecific immunity. J Altern Complement Med 1999; 5: 437-446
4. Bauer R. Echinacea: biological effects and active principles. Phytomedicines of Europe: Chemistry and Biological Activity. Washington, DC. 1998
5. Bauer R, Foster S. Analysis of alkamides and caffeic acid derivatives from Echinacea simulata and E. paradoxa roots. Planta Med 1991; 57: 447-449
6. Goela V ,Changb C, Slamab JV, Bartonc R, Bauerd R, Gahlerb R, et al. Echinacea stimulates macrophage function in the lung and spleen of normal rats.Journal of Nutritional Biochemistry 2002; 13: 487-492
7. Cundell DR, Matrone MA, Ratajczak P, Pierce JD Jr. The effect of aerial parts of Echinacea on the circulating white cell levels and selected immune functions of the aging male Sprague-Dawley rat. Int Immunopharmacol. 2003; 3: 1041-1048
8. Stimpel H, Proksch A, Wagner H, Lohmann-Matthes ML. Macrophage activation and induction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharide fractions from the plant Echinacea purpurea. Infect Immun. 1984: 46: 845-849
9. Leuttig B, Steinmuller C, Gifford GE, Wagner H, Lohmann-Matthes ML. Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of Echinacea purpurea, J Natl Cancer Inst.1989: 81: 669–675
10. Wagner H, Jurcic K, Immunologic studies of plant combination preparations. In vitro and in vivo studies on the stimulation of phagocytosis, Arzneimittel Forschung. 1991; 41: 1072–1076
11. Burger RA, Torres AR, Warren RP, Caldwell VD, Hughes BG. Echinacea induced cytokine production by human macrophages. Int J Immunopharmacol. 1997; 19: 371-379
12. Steinmuller C, Roesler J, Grottrup E, Franke G, Wagner H, Lohmann-Matthes ML. Polysaccharides isolated from plant cell cultures of against systemic infections with Candida albicans and Listeria monocytogenes. Intl J Immunopharmacol.1993; 15: 605-614

13. Rininger JA, Kickner S, Chigurupati P, McLean A, Franck Z. Immunopharmacological activity of Echinacea preparations following simulated digestion on murine macrophages and human peripheral blood mononuclear cells. Leukoc Biol. 2000; 68: 503-510
14. See DM, Broumand N, Sahl L, Tilles JG. In vitro effects of Echinacea and ginseng on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients. Immunopharmacol.1997; 35: 229-235
15. Roesler A, Emmendorffer C, Steinmuller B, Luettig H, Wagner ML. Lohmann-Matthes. Application of purified polysaccharides from cell cultures of the plant Echinacea purpurea to test subjects mediates activation of the phagocyte system. Intl J Immunopharmacol. 1991; 13: 931-941
16. Omid Beygi R. Study of cultivation and adaptability of purple coneflower (Echinacea purpurea) in the north of Tehran. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 2002; 6: 231-240
17. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growh and survival. J Immunol Methods. 1986; 89: 271-277
18. Ebtekar M, Hassan ZM. Effect of immunomdulator pyrimethamine and cimetidine on immunosuppressed induced by mustard in mice. International Immunopharmacology .1993; 25: 423-430
19. Noori Sh, Naderib GA, Hassan ZM, Habibi Z, Bathaiea SZ, Hashemi SM. Immunosuppressive activity of a molecule isolated from Artemisia annua on DTH responses compared with cyclosporin A. International Immunopharmacology. 2004; 4: 1301-1306
20. Pepping J. Alternative therapies, Echinacea. Am J Health-Syst Pharm.1999: 56: 121-122
21. Mengs U, Clare CB, Poiley JA. Toxicity of Echinacea purpurea. Acute, subacute and genotoxicity studies. Arzneimittelforschung. 1991; 41: 1076-1081

View publication stats