Journal of
Arak University of Medical Sciences

August & September 2021. Vol 24. Issue 3

Research Paper

Observing the Anti-oxidant and Anti-inflammatory Effect of Nigella Sativa Combined With Silybum Marianum Extracts on the Acute Peritonitis Mouse Model

Maryam Bahrami[1], Ali Ghazavi[1,2,3], Ali Ganji[1,4], *Ghasem Mosayebi[1,2,4]

1. Department of Immunology & Microbiology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
2. Department of Microbiology and Immunology, Traditional and Complementary Medicine Research Center (TCMRC), School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
3. Department of Microbiology and Immunology, Molecular and Medicine Research Center, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
4. Department of Microbiology and Immunology, Infectious Diseases Research Center (IDRC), School of Medicine Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation: Bahrami M, Ghazavi A, Ganji A, Mosayebi Gh. [Observing the Anti-oxidant and Anti-inflammatory Effect of Nigella Sativa Combined With Silybum Marianum Extracts on the Acute Peritonitis Mouse Model (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences(JAMS). 2021; 24(3):372-385. https://doi.org/10.32598/JAMS.24.3.6154.1

https://doi.org/10.32598/JAMS.24.3.6154.1

CC BY NC

Article Info:
Received: 28 Apr 2020
Accepted: 17 Apr 2021
Available Online: 01 Aug 2021

Key words:
Silybum marianum, Nigella sativa, Inflammation, Peritonitis, Antioxidant

ABSTRACT

Background and Aim In addition to free radicals such as Nitric Oxide (NO), inflammation is one of the most important pathophysiological causes of peritonitis. Over thousands of years, Nigella Sativa (NS) and Silybum Marianum (SM) are two plants known for their anti-oxidant and anti-inflammatory properties. However, the effect of its compound is unclear. Thus, in this study, we evaluated the anti-inflammatory effect of NS and SM extracts and their combination on inflammatory diseases like thioglycollate peritoneal.

Methods & Materials Alcoholic extracts of SM and NS were obtained by the soxhlet method. Male Balb/C mice were divided into 5 groups and gavage orally for 14 days with SM, NS, the mixture of extracts of these two, DMSO 30% as the control group, and dexamethasone as the positive control group. The safety profile and acute toxicity in mice were assessed. On day 10, acute peritonitis was induced by thioglycollate 3%. Finally, the total anti-oxidant power and NO concentration were measured by FRAP and Griess method, respectively, in the serum of treated mice.

Ethical Considerations All experimental process was performed following the guidelines according to the Animal Ethics Committee of Arak University of Medical Sciences (IR.ARAKMU.REC.1397.359).

Results Acute toxicity test showed no significant changes in weight and physical appearance of the mice. However, the extract and their mixture decreased NO level significantly (P=0.000) in serum. Also, the mixture significantly increased total anti-oxidant power (P=0.015).

Conclusion Results showed that the SM and NS extract mixture demonstrated anti-inflammatory activity, inhibiting inflammatory mediators such as NO and increasing anti-oxidant power, thus supporting its therapeutic potential in slowing down inflammatory processes in inflammation disorders.

Extended Abstract

1. Introduction

In addition to inflammation, free radicals like Nitric Oxide (NO) are the most important pathophysiological cause of inflammatory diseases such as peritonitis [1]. Free radicals cause extensive damage to the body's macromolecules, which are neutralized by the anti-oxidant system [2]. So, researchers started an investigation for new anti-inflammatory and anti-oxidant

* *Corresponding Author:*
Ghasem Mosayebi, PhD.
Address: Department of Immunology & Microbiology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
Tel: +98 (86) 34173502
E-mail: ghasemmosayebi@arakmu.ac.ir

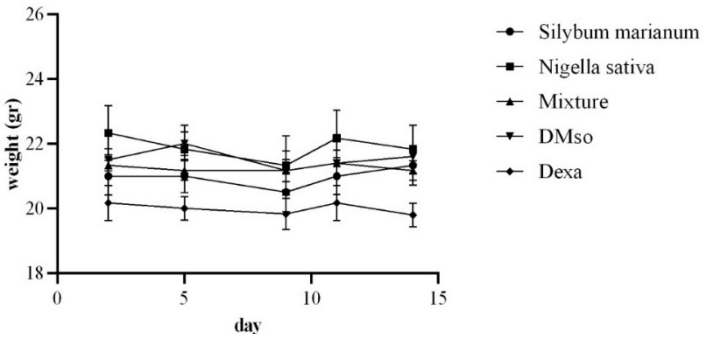


Figure 1. Acute toxicity

Journal of Arak University of Medical Sciences

drugs due to the need for effective drugs with fewer side effects than chemical drugs [3].

Over thousands of years, many natural products have been used to treat various diseases, regardless of their antagonistic and synergistic effects [4]. Nigella Sativa (NS) and Silybum Marianum (SM) are promising herbal medicine in Asia used for their anti-inflammatory properties [5]. Other studies have shown that SM has anti-inflammatory and anti-oxidant properties and is not even toxic in large quantities [6-10]; however, the effect of its compound is unclear. Thus, in this study, we evaluated the anti-inflammatory effect of Nigella sativa and Silybum Marianum extracts and their combination of inflammatory diseases like thioglycollate peritoneal inflammation.

2. Materials and Methods

Dried SM was extracted in a Soxhlet system using n-hexane and methanol as solvent. Also, NS seeds were extracted with 95% ethanol. Then, they were filtered, and the solvent was removed in a rotary evaporator [11, 12]. The safety profile of extracted was performed on spleen lymphocytes and acute toxicity assay according to the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) guidelines using the MTT assay.

Experiments were performed using male Balb/C mice (18-22 gr). The control group received DMSO 30% and PBS as a vehicle [13]. The positive control group gave dexamethasone 0.15 mg/kg intraperitoneal [14]. The SM and NS group were gavaged orally for 14 days. According to a previous study with 2000 mg/kg [15, 16], the mixture group gavage by the SM+NS extracts was equally observed through the study [17].

To induce the peritonitis model, on day 10 of treatment, a 1 ml sterile solution of thioglycollate medium (3% w/v in PBS) was injected intraperitoneally [18]. Finally, 12-14 hours after the last treatment, the mice were killed, and blood was collected from the heart to measure the total anti-oxidant power and NO concentration.

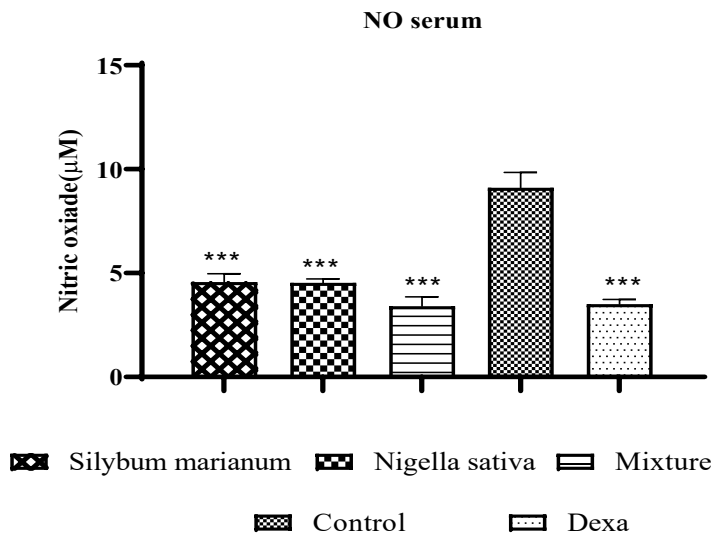


Figure 2. Nitric oxide concentration

Journal of Arak University of Medical Sciences

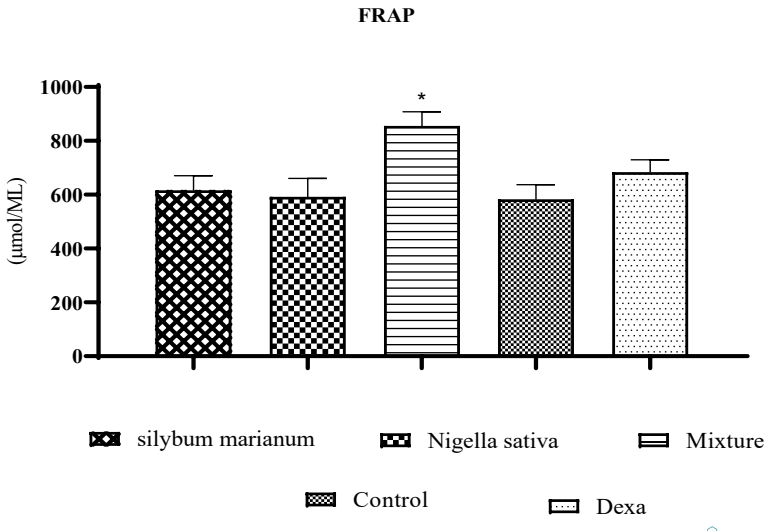


Figure 3. Anti-oxidant power

The FRAP method was based on that of Benzie and Strain [19]. Briefly, FRAP reagent (included: 300 mmol/L acetate buffer, 10 mmol/L TPTZ/HCL solution, and 20 mmol/L ferric chlorides) was added to 100 µl of diluted serum. After incubation, time absorbance was measured directly at 620 nm. The NO was measured by the Griess reaction [20]. Briefly, 100 µl diluted serum of treated mice was incubated with 100 µL of Griess reagent; finally, nitrite levels were measured at 620 nm after incubation (Figure 1, 2 & 3).

3. Results

Ethanolic Extract of NS (NEE) and Methanolic extract of SM (SME) exhibited no cytotoxic effects on spleen lymphocytes. Also, the acute toxicity test showed no significant changes in weight and physical appearance of the mice. These extract and their mixture decrease NO level significantly (P=0.000) in the treated group compared to the control group. Also, the mixture group increased significantly total anti-oxidant power (P=0.015) compared to the control and each extract individually.

However, the anti-inflammatory effect of NEE and SME was shown in previous studies [21]. No changes in the weight of treated mice, with a mentioned dosage of extracts and no apparent toxicity on splenic lymphocytes, were seen. So results reveal the non-toxic nature of extract at the tested dosage consistent and, the inhibitory effects were not due to toxicity and cell killing [22, 23]. In parallel with our study, the SME and the NEE had no acute and chronic toxicity on laboratory animals, even higher doses [24, 25].

4. Discussion and Conclusion

It seems that the significant increase in anti-oxidant power of the combination group against each of these extracts and the control group indicates the synergistic effect of all flavonoids in the anti-oxidant capacity of the extract [26, 27]. In confirmation, NS oil and its fractions (neutral lipids, glycolipids, and phospholipids) showed anti-oxidant activity related to their entire content [28]. In parallel, the anti-oxidant power of NS oil and SM seeds oil were reported equally [27].

Shahin et al. Showed that NS extract has more anti-oxidant effect than SM [29]. This difference can be due to the different solvents used in the extraction and confirming the role of alcoholic solvents in anti-oxidant power. According to our data, each mentioned extract and their combination has significantly decreased NO production release.

Similarly, a study showed suppression of NO production by aqueous extract of NS in stimulated peritoneal macrophages [23]. The reduction of NO production in the inflammatory model of rheumatoid arthritis in mice can confirm our results [30]. Another study showed that the extract of SM and silibinin (one of its main ingredients) reduced the NO production by blocking p38, MAPK, or NF-κB signaling pathways in RAW 264.7 cells and peritoneal macrophages, which have been in line with its anti-inflammatory effects [31].

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

All experimental process was performed following the guidelines according to the Animal Ethics Committee of

Arak University of Medical Sciences (Code: IR.ARAKMU.REC.1397.359).

Funding

This article is taken from a research project with the code 3196 and it was funded by the Vice Chancellor for Research and Technology of Arak University of Medical Sciences.

Authors' contributions

All authors met the writing standards based on the International Committee of the Journal of Medical Journalists (ICMJE).

Conflicts of interest

The authors declared no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Deputy for Research and Technology of Arak University of Medical Sciences for their valuable support.

This Page Intentionally Left Blank

مقاله پژوهشی

مقایسه اثر توام آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی عصاره‌های الکلی خارمریم و سیاه‌دانه در مدل موشی پریتونیت حاد

مریم بهرامی[۱]، علی قضاوی[۱،۲،۳]، علی گنجی[۴،۱]، *قاسم مسیبی[۱،۲،۴]

۱. گروه ایمنی‌شناسی و میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی اراک، اراک، ایران.
۲. گروه ایمنی‌شناسی و میکروب‌شناسی، مرکز تحقیقات طب سنتی و مکمل، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی اراک، اراک، ایران.
۳. گروه ایمنی‌شناسی و میکروب شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی اراک، اراک، ایران.
۴. گروه ایمنی‌شناسی و میکروب‌شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی اراک، اراک، ایران.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۰۹ اردیبهشت ۱۳۹۹
تاریخ پذیرش: ۲۸ فروردین ۱۴۰۰
تاریخ انتشار: ۱۰ مرداد ۱۴۰۰

چکیده

زمینه و هدف علاوه بر رادیکال‌های آزاد مانند نیتریک اکساید، التهاب یکی از مهم‌ترین علل پاتوفیزیولوژیک پریتونیت (التهاب صفاق) است. خارمریم و سیاه‌دانه دو گیاه با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی شناخته شده‌اند. هدف از این پژوهش بررسی اثر تجویز توأم این دو عصاره گیاهی در القای اثرات آنتی‌اکسیدانی و کاهش شدت التهاب در مدل موشی پریتونیت حاد است.

مواد و روش‌ها پس از تهیه عصاره الکلی خارمریم و سیاه‌دانه به روش سوکسله، میزان سمیت حاد (Acute Toxicity) بررسی شد. سپس موش‌ها Balb/C به پنج گروه تقسیم شدند و دُز مناسب هریک از عصاره‌های خارمریم، سیاه‌دانه، ترکیب عصاره‌های مذکور، DMSO ۳۰ درصد به منزله گروه کنترل و دگزامتازون به منزله گروه کنترل مثبت به مدت ۱۴ روز داده شد. در روز دهم دریافت، پریتونیت حاد با تزریق داخل صفاقی تایوگلیکولات در موش‌ها القا شد. در آخر، قدرت آنتی‌اکسیدانی توتال هریک از عصاره‌ها در سرم موش‌های تیمارشده، با تست FRAP و غلظت نیتریک اکساید به روش گریس سنجیده شد.

ملاحظات اخلاقی این مطالعه با شناسه IR.ARAKMU.REC.1397.359 در کمیته پژوهشی دانشگاه علوم‌پزشکی اراک به ثبت رسیده است.

یافته‌ها در بررسی سمیت حاد تغییری در ظاهر فیزیکی موش‌ها و علائم بیماری دیده نشد، تغییرات وزن معنی‌دار نبود. استفاده توأم عصاره خارمریم و سیاه‌دانه باعث افزایش معنی‌دار قدرت آنتی‌اکسیدانی توتال شد (P=۰/۰۱۵). این ترکیب همچنین باعث کاهش معنی‌دار سطح نیتریک اکساید سرمی نسبت به گروه کنترل شد (P=۰/۰۰۰).

نتیجه‌گیری ترکیب این دو عصاره اثرات ضدالتهابی خود را با مکانیسم افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی و کاهش نیتریک اکساید اعمال می‌کند.

کلیدواژه‌ها:
خارمریم، سیاه‌دانه، پریتونیت، التهاب، آنتی‌اکسیدان

مقدمه

التهاب نقش کلیدی در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌ها از جمله پریتونیت را ایفا می‌کند. در این میان رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن جایگاه ویژه‌ای در مدیریت التهاب دارند [۱]. رادیکال‌های آزاد به علت وجود الکترون تک، دائماً در بدن در حال گردش هستند و آسیب‌های فراوانی را به ماکروملکول‌های بدن جانداران مانند DNA، پروتئین‌ها، لیپیدها و کربوهیدرات‌ها وارد می‌کنند. در بدن سیستم‌های خاصی برای مقابله با آسیب‌های حاصل از رادیکال‌های آزاد وجود دارد که به نام سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی معروف‌اند. زمانی که نبود تعادل در میزان تولید رادیکال‌های آزاد و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی پیش آید، این حالت را استرس اکسیداتیو گویند. مهم‌ترین و فراوان‌ترین رادیکال‌ها، رادیکال‌های آزاد اکسیژن به‌ویژه رادیکال سوپراکسید (O_2^-) و رادیکال هیدروکسیل (HO) هستند. در بین رادیکال‌های آزاد نیتروژن نیز، نیتریک اکساید (NO) از بقیه مهم‌تر است [۲].

پریتونیت عبارت است از تورم لایه سروزی که کف حفره شکم و احشا را مفروش می‌کند. حفره صفاق استریل و سترون است و هنگامی که عفونت (در اثر عواملی مانند سوراخ شدن روده و یا آپاندیس و یا کلون در اثر دیورتیکولیت) از محیط اطراف به آن وارد شود ایجاد پریتونیت می‌کند. همچنین، چنانچه مواد شیمیایی تحریک‌کننده مانند اسید معده و یا صفرا از طریق

* نویسنده مسئول:
دکتر قاسم مسیبی
نشانی: اراک، دانشگاه علوم‌پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی‌شناسی.
تلفن: ۳۴۱۷۳۵۰۲ (۸۶) ۹۸+
پست الکترونیکی: ghasemmosayebi@arakmu.ac.ir

سوراخ شدن زخم معده، دوازدهه یا صفرا از طریق پارگی کبد به آن راه یابد، ایجاد تورم در صفاق می‌کنند. عفونت‌های داخل صفاقی قبل از اواخر دهه دوم قرن بیستم تا بیش از ۹۰ درصد مرگ‌ومیرها را سبب می‌شد و پس از آن با متداول شدن عمل جراحی به کمتر از ۴۰ درصد تقلیل یافت. درمان پریتونیت‌ها با در نظر گرفتن علت ایجادکننده، کمی متفاوت است اما همیشه درمان بر سه اصل اساسی استوار است که عبارت‌اند از: تصحیح علت به‌وجودآورنده پریتونیت، استفاده از آنتی‌بیوتیک و درمان‌های نگهدارنده و کمک‌کننده برای محدود کردن عوارض آن. از آنجایی که مهم‌ترین علل پاتوفیزیولوژیک پریتونیت التهاب است [۳]، استفاده از گیاهانی که باعث جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد می‌شوند، به منزله گزینه‌ای برای درمان کمکی دارویی در این بیماری مطرح است [۴].

گیاهان دارویی ویژگی‌هایی از قبیل در دسترس بودن، سمیت کمتر، هزینه کمتر و همچنین عوارض جانبی کمتر را دارند و می‌توانند همراه و هم جهت با طب کلاسیک برای کاهش علائم و کاهش الام بیماران مزمن استفاده شود. در ایران به علت تنوع آب‌وهوایی و شرایط جغرافیایی، انواع متعدد گیاهان رشد می‌کنند. این گیاهان عمدتاً به طور جداگانه یا در ترکیب با یکدیگر استفاده می‌شوند [۵].

گیاه سیاه‌دانه از خانواده آلاله[1] است و در ایران به‌ویژه در اراک و اصفهان به فراوانی می‌روید. دانه بخش دارویی این گیاه را تشکیل می‌دهد و حاوی ۳۰ تا ۴۰ درصد روغن و ۰/۵ تا ۱/۵ درصد اسانس است. ماده مؤثر در سیاه‌دانه را تیموکینون تشکیل می‌دهد که هم در اسانس و هم در روغن وجود دارد. فعالیت بیولوژیکی سیاه‌دانه عمدتاً به ترکیب اصلی بخش روغنی آن مربوط می‌شود که عمده آن تیموکینون (۳۰ تا ۴۸ درصد) است. نقش این ماده با اثرات آنتی‌اکسیدان و ضدالتهابی، در درمان بیماری‌های التهابی و خودایمنی، از جمله دیابت، آرتریت و آسم نشان داده شده است [۶].

خارمریم با نام علمی Silybum marianum، گیاهی یک یا دو ساله از خانواده کاسنی‌هاست. میوه این گیاه به شکل فندقه است. میوه‌های فندقه‌ای گیاه بخش دارویی آن را تشکیل می‌دهد. ترکیبات مؤثر اصلی میوه خارمریم از گروه فلاوونولیگنان‌ها با نام سیلیمارین است و این گیاه حداقل ۱ درصد سیلیمارین دارد. سیلیمارین به مخلوطی از فلاوونولیگنان‌ها اطلاق می‌شود که شامل: سیلی بین، سیلی کریستین و سیلی دیانین است؛ قسمت عمده این مخلوط را سیلی بین تشکیل می‌دهد. در مطالعات اخیر اثرات درمانی این گیاه در بهبود کبد چرب، سیروز کبدی، دیابت، پوکی استخوان و سرطان نشان داده شده است [۷-۹]. از محاسن فراورده‌های این گیاه سمیت نبودن آن است. همچنین در طب ایرانی به منزله یک ضدالتهاب وآنتی‌اکسیدان کاربرد داشته و در درمان بیماری‌هایی التهابی مؤثر بوده است [۱۰، ۱۱]. با توجه به اثر آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی این گیاهان و اینکه قدرت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی ترکیب این دو عصاره بر مدل پریتونیت بررسی نشده است، ما بر آن شدیم تا درباره اثر ترکیب این دو گیاه را پژوهش کنیم.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاهان

ابتدا گیاهان خارمریم و سیاه‌دانه از مراکز معتبر تهیه شد و پس از تأیید متخصص مربوطه، خارمریم با شماره هرباریوم HVN-IM-SMI3967 و سیاه‌دانه با شماره هرباریوم HVN-IM-NS13968 به ثبت رسیدند.

عصاره‌گیری

پس از تهیه گیاهان خارمریم و سیاه‌دانه از مراکز معتبر، عصاره متانولی خارمریم به روش سوکسله (Soxhlet; Heidolph, Ger-many) تهیه شد. قسمت فندقه گیاه با آسیاب به صورت کامل پودر شد و ۳۰ گرم از پودر حاصل درون قیف در سوکسله با ۷۵ میلی‌لیتر ان هگزان (Merck, Germany) به مدت ۶ ساعت روغن‌گیری شد و سپس پودر فاقد چربی به مدت ۵ ساعت با ۷۵ میلی‌لیتر متانول خالص در سوکسله عصاره‌گیری شد. عصاره به‌دست‌آمده با استفاده از قیف بوخنر در سه مرحله فیلتر شد و در انتها با استفاده از تبخیرکننده دوار (Rotary evapora-tor; Heidolph, Germany) در دمای ۳۵ درجه به مدت ۵۰ دقیقه تغلیظ و در فور ۴۰ درجه خشک شد [۱۲]. برای عصاره‌گیری سیاه‌دانه نیز دانه‌ها با آسیاب به صورت کامل پودر شدند و عصاره‌گیری به روش شناخته‌شده سوکسله انجام شد. برای این منظور ۶۰ گرم پودر دانه با ۳۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد عصاره‌گیری شد. عصاره به‌دست‌آمده با استفاده از قیف بوخنر در سه مرحله فیلتر شد و در انتها با استفاده از تبخیرکننده دوار در دمای ۶۰ درجه به مدت ۴۰ دقیقه تغلیظ و در فور ۳۷ درجه خشک شد [۱۳]. سپس پودرهای به‌دست‌آمده در DMSO[2] (حلال) با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر به شکل استوک تهیه و در منهای ۷۰ درجه نگهداری شد.

تیمار حیوان آزمایشگاهی با عصاره‌ها

در این پروژه ۳۰ سر موش نر نژاد Balb/C با وزن حدود ۲۰ گرم و سن ۸ هفته از انیستو پاستور تهیه شد و قبل از انجام هر آزمایش برای تطبیق شرایط محیطی موش‌ها به مدت یک هفته در آزمایشگاه پرورش حیوانات نگهداری شدند.

1. Ranunculacae

2. Dimethyl sulfoxide

تست سمیت حاد (Acute toxicity)

طبق دستورالعمل OECD[3] برای سنجش سمیت حاد، موش‌ها به پنج گروه شش‌تایی تقسیم شده و هر گروه در یک قفس نگهداری شد. عصاره‌ها نیز در DMSO حل شدند؛ DMSO ماده سمی و توکسیک است، به همین دلیل عصاره‌ها در ۳۰ درصد از DMSO حل شدند که بر طبق مطالعات قبلی این مقدار از دی متیل سولفوکساید اثر سمی ندارد [۱۴]. گروه اول موش‌ها برای کنترل (گروه شم) روزانه ۲۰ میکرولیتر به صورت گاواژ (برای حذف اثر استرس گاواژها) DMSO ۳۰ درصد دریافت کردند. به گروه دوم (گروه کنترل مثبت) طبق مطالعات قبلی ۰/۱۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم دگزامتازون به صورت داخل صفاقی تزریق شد [۱۵]. گروه سوم و چهارم نیز بر اساس مطالعات قبلی با دُز ۲۰۰۰ mg/kg با عصاره‌های خارمریم و سیاه‌دانه گاواژ شدند [۱۶، ۱۷]. برای گروه پنجم نیز با ترکیب دو عصاره به نسبت ۱/۱ به مدت ۱۴ روز گاواژ صورت گرفت. همچنین روزانه (به مدت ۱۴ روز) از نظر مرگ‌ومیر، تغییرات وزن، الگوی رفتاری، علائم بیماری (لرزش، تشنج، اسهال و رخوت)، ظاهر فیزیکی، تغییر در تنفس و صدای تنفس پایش شدند. وزن موش‌ها سه بار در هفته تا پایان مطالعه اندازه‌گیری شد [۱۸].

القای پریتونیت حاد در مدل موشی

تیمار با عصاره‌ها در این مطالعه به مدت ۱۴ روز انجام شد که برای القای پریتونیت، روز دهم، چهار روز قبل از اتمام مراحل درمان، دریافت عصاره‌ها (۱ میلی‌لیتر تایوگلیکولات ۳ درصد؛ Sigma, USA؛ ۳ گرم پودر تایوگلیکولات + ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) به صورت داخل صفاقی تزریق شد؛ تزریق تایوگلیکولات برای جمع شدن ماکروفاژها در داخل صفاق و ایجاد پریتونیت انجام شد [۱۹].

کشتن موش‌ها و خون‌گیری از قلب

۱۲ تا ۲۴ ساعت پس از آخرین گاواژ، موش‌ها با محلول کتامین زایلازین (Sigma, USA) بیهوش شدند، خون‌گیری از حیوانات به روش مستقیم از قلب انجام پذیرفت و برای جداسازی سرم، خون گرفته‌شده به مدت ۵ دقیقه در ۲۰۰۰ g سانتریفیوژ شد.

بررسی سمیت عصاره‌های مذکور بر لنفوسیت‌های طحالی موش‌ها

در این راستا، پس از خارج کردن طحال در شرایط استریل از موش سالم، سلول‌های طحالی به روش مکانیکی با استفاده از فیلتر (Mesh) با قطر ۰/۷ میکرومتر (SPL, South Korea) استخراج شده و با استفاده از فایکول، لایه حاوی بافی کوت و لنفوسیت‌ها به دقت از گلبول‌های قرمز جدا شد. سپس لنفوسیت‌ها شمارش شده و به تعداد ۱۰۰ هزار سلول در چاهک پلیت کشت ۹۶ خانه برای بررسی سمیت عصاره‌ها با تست MTT کشت داده شد. سلول‌ها با غلظت‌های مشخص عصاره‌ها، هریک به صورت جداگانه و توأم مجاور شدند؛ پس از ۴ ساعت انکوباسیون چاهک‌های مشخص‌شده، با LPS[4] به مقدار ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر حساس شده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون نهایی دی متیل سولفوکساید اضافه شد. بعد از انکوباسیون در تاریکی جذب نوری با استفاده از دستگاه الایزا ریدر مورد سنجش قرار گرفت.

سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم با روش FRAP

FRAP[5] روشی برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی است. دراین روش Fe^{3+} در اثر خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه به Fe^{2+} تبدیل و به رنگ آبی مشاهده می‌شود. این روش بر اساس توانایی سرم در احیای یون‌های Fe^{3+} (فریک) به Fe^{2+} (فرو) در حضور ماده‌ای به نام 6TPTZ استوار است. TPTZ-Fe^{2+} کمپلکس آبی رنگی با ماکزیمم جذب ۵۹۳ نانومتر است که میزان قدرت احیاکنندگی سرم از طریق افزایش غلظت کمپلکس فوق اندازه‌گیری می‌شود [۲۰]. در این پژوهش ابتدا محلول‌های استاندارد یون آهن تهیه شد و با محلول کار FRAP که شامل محلول تری پیریدیل تریازین، کلرو آهن و بافر استات است، مخلوط شد و طبق روش استاندارد جذب آن‌ها با استفاده از دستگاه الایزاریدر مدل Stat Fax ساخت کشور آلمان خوانش شد و در نهایت منحنی استاندارد مربوط به آن رسم شد. در ادامه طبق دستورالعمل استاندارد، هریک از نمونه‌ها با محلول کار FRAP مخلوط و جذب آن در ۵۹۳ نانومتر خوانش شد. با تعیین جذب نمونه‌ها و با استفاده از منحنی استاندارد، ظرفیت کلی آنتی‌اکسیدانی سرمی خون بر مبنای غلظت یون فرو بر حسب میکرومول در لیتر مشخص شد.

اندازه‌گیری غلظت نیتریک اکسید در سرم به روش Griess

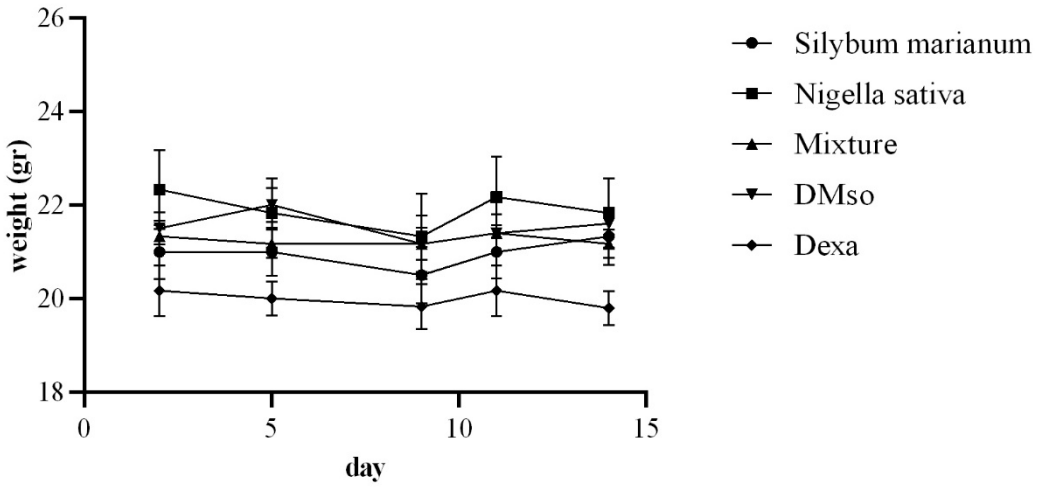
نیتریک اکسید (NO) یکی از عوامل مهم فیزیولوژیک و مؤثر در برخی سیستم‌های بیولوژیک از جمله سیستم ایمنی است و از این جهت سنجش غلظت آن در بافت‌ها و مایعات بیولوژیک ارزشمند قلمداد می‌شود. یکی از روش‌های سنجش NO، اندازه‌گیری غلظت نیتریت است که اساس این روش بر واکنش diazotization استوار شده است. در این روش نیتریت موجود در نمونه با سولفانیل آمید واکنش داده و در حضور N-1- نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلراید (NED) در شرایط اسیدی فسفریک اسید باعث ایجاد ترکیب به رنگ ارغوانی می‌شود [۲۱]. سنجش نیتریک اکساید توسط واکنش گریس به روش میکروپلیتی انجام شد. برای اندازه‌گیری غلظت نیتریت و نیترات (NOx) تام، در یک میکروپلیت الایزا ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر محلول NED به ۱۰۰ میکرولیتر سرم افزوده شد و پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در تاریکی ۱۰۰ میکرولیتر سولفانامید اضافه و مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از انجام واکنش و تشکیل رنگ، جذب نوری حاصل از تشکیل ماده رنگی در ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانشگر الایزا (Stat Fax) قرائت شد و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت نمونه‌ها محاسبه شد.

3. Organization for Economic Co-operation and Development

4. Lipopolysaccharides

5. Ferric ion reducing antioxidant power

6. Triphenyl tetrazolium



تصویر ۱. تغییرات وزنی موش‌ها در دوره مطالعه

یافته‌ها

بررسی و مقایسه میانگین وزنی در موش‌های درمان‌شده با عصاره‌ها

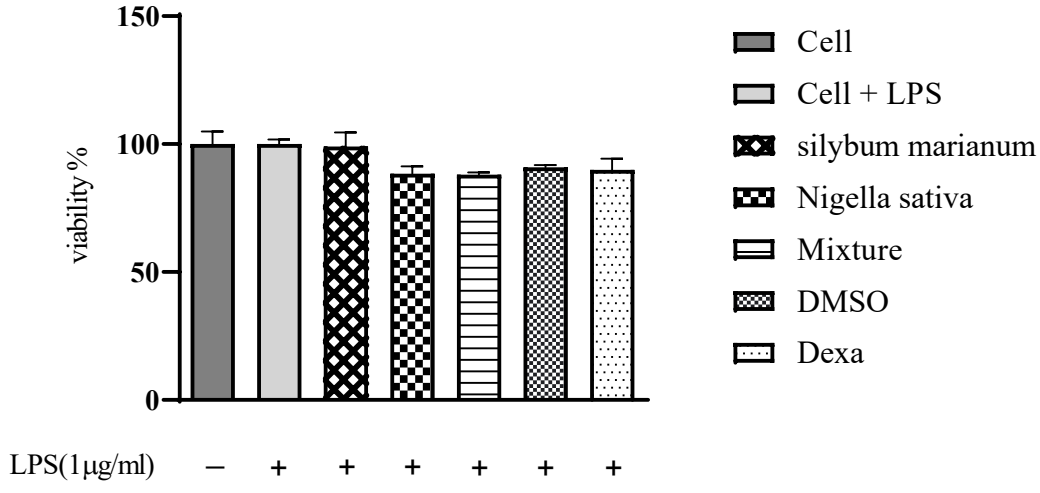
همان‌طور که در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است، تغییر معناداری در وزن موش‌ها در دوره مطالعه بین گروه‌های درمانی و کنترل مشاهده نشده است. همچنین، هیچ‌گونه تغییر رفتار و یا نشانه کلینیکال مسمومیت مانند کاهش آب و غذا و مشکلات گوارشی در موش‌های در معرض درمان با هریک از عصاره‌های مذکور در طول ۱۴ روز نشان داده نشد.

بررسی اثر سمیت عصاره‌ها بر سلول‌های طحالی موش

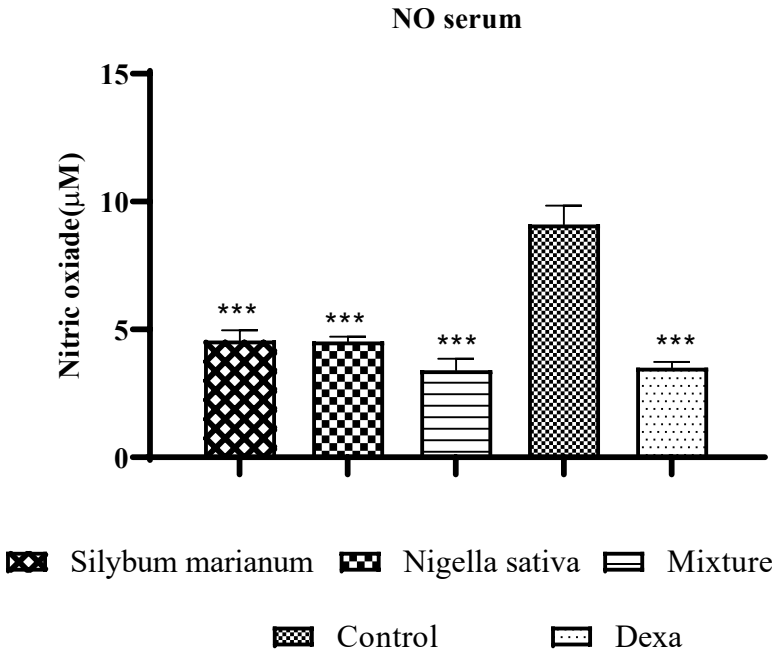
برای بررسی سمیت عصاره‌های مذکور نیز درصد حیات سلولی در لنفوسیت‌های طحالی بررسی شد. همان طور که در تصویر شماره ۲ مشخص است، هیچ‌گونه کاهش معنادار در درصد حیات سلول‌های لنفوسیتی مشاهده نمی‌شود.

بررسی تأثیر عصاره‌ها بر میزان نیتریک اکساید تولیدی در سرم موش‌های گاواژشده

میزان تولید نیتریت در سرم موش‌های گاواژشده با عصاره‌های خارمریم، سیاه‌دانه و ترکیب این دو عصاره بررسی شد. به طور شگفت‌انگیزی هریک از عصاره‌ها به‌تنهایی و در ترکیب با یکدیگر



تصویر ۲. تأثیر عصاره خارمریم، سیاه‌دانه وترکیب این دو عصاره بر درصد حیات لنفوسیت‌های طحالی، بررسی سمیت سلولی توسط تست MTT پس از ۲۴ ساعت مجاورسازی سلول‌ها در بودن و نبودن LPS داده‌ها در مقایسه با گروه کنترل



تصویر ۳. تأثیر عصاره‌های خارمریم، سیاه‌دانه و ترکیب این دو عصاره به یک نسبت در تولید نیتریت در سرم

موش‌های گاواژشده با هریک از عصاره‌ها به صورت تنها و در ترکیب با یکدیگر در مقایسه با گروه کنترل، *** P>۰/۰۰۱

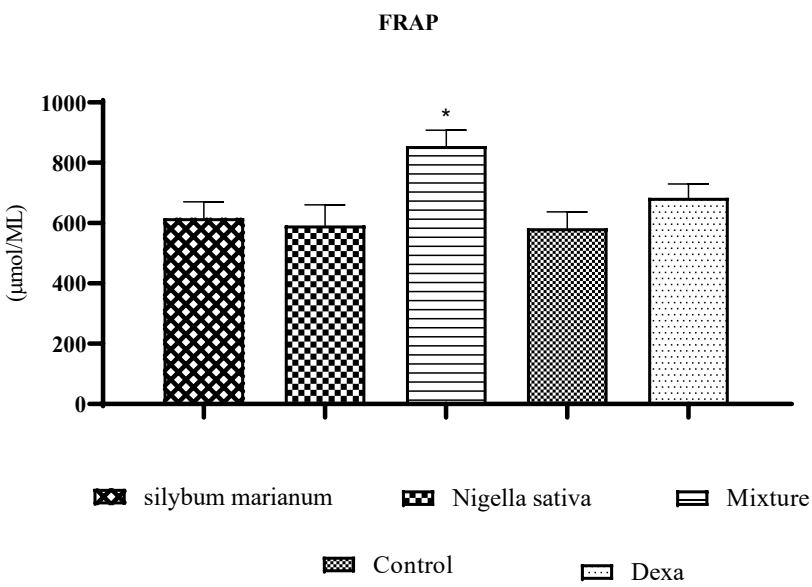
باعث کاهش معنادار سطح سرمی نیتریت در مقایسه با گروه کنترل شده است (تصویر شماره ۳).

مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی سرم بین گروه‌های درمانی

پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره خارمریم، سیاه‌دانه و ترکیب این دو عصاره در تست FRAP بررسی و مقایسه شد. همان طور که در تصویر شماره ۴ مشاهده می‌شود، افزایش معناداری در گروه توأم در مقایسه با کنترل، سیاه‌دانه و خارمریم مشاهده شد.

بحث

یافتن یک عامل تأثیرگذار مانند استفاده از عصاره‌های گیاهی که منجر به کاهش التهاب همراه با اثر آنتی‌اکسیدانی خود می‌شود،



تصویر ۴. قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره خارمریم، سیاه‌دانه و ترکیب عصاره‌ها به نسبت برابر در سطح سرم

افزایش معناداری در گروه توأم در مقایسه با کنترل، سیاه‌دانه و خارمریم مشاهده شد. * P>۰/۰۵

می‌تواند یک درمان مکمل و حمایتی مؤثر در بیماری‌های التهابی از جمله پریتونیت باشد. شواهد قبلی خاصیت ضدالتهابی و اثرات آنتی‌اکسیدانی هریک از عصاره‌های سیاه‌دانه و خارمریم را نشان دادند [۲۲]. در این مطالعه خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی ترکیب عصاره‌های سیاه‌دانه و خارمریم در مدل پریتونیت القاشده با تایوگلیکولات مطالعه شد.

عصاره‌های گیاهان سیاه‌دانه و خارمریم در غلظت ۵۰ تا ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، فاقد اثرات سمی بر لنفوسیت‌های طحالی در بودن و نبودن LPS بود. نتایج تست سمیت حاد نیز بی‌خطر بودن دُزهای تجویزشده برای موش‌ها را نشان داد. از این رو اثرات مهاری عصاره‌های مذکور بر التهاب به علت اثر توکسیک و در پی آن، کشته شدن سلول‌ها نبوده است [۲۳، ۲۴]. هم‌راستا با مطالعه ما، نبود سمیت حاد و مزمن خارمریم و عصاره روغنی سیاه‌دانه بر حیوانات آزمایشگاهی حتی با دُزهای بیشتر از این مطالعه نشان داده شد [۲۵، ۲۶].

چنین به نظر می‌رسد که افزایش معنی‌دار قدرت آنتی‌اکسیدانی ترکیب این دو عصاره در برابر هریک از این عصاره‌ها و گروه کنترل بیان‌کننده اثر سینرژیسمی عناصر گوناگون و شرکت همه فلاونوئیدها در قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره باشد [۲۷، ۲۸]. در تأیید این هم‌گرایی نیز مطابق با موارد فوق روغن خام سیاه‌دانه و فراکسیون‌های آن (لیپیدهای خنثی، گلیکولیپیدها و فسفولیپیدها) فعالیت آنتی‌اکسیدانی از خود نشان دادند که به‌خوبی با کل محتوای آن‌ها ارتباط دارد [۲۹]. در مطالعه دیگری، قدرت آنتی‌اکسیدانی روغن دانه سیاه‌دانه و روغن دانه خارمریم با سه تست متفاوت به یک اندازه گزارش شده است [۲۷]. شاهین و همکاران نشان دادند، سیاه‌دانه دارای اثر آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به خارمریم است [۳۰]. این تفاوت می‌تواند به سبب متفاوت بودن حلّال استفاده‌شده در عصاره‌گیری و تأییدکننده نقش حلال‌های الکلی در قدرت آنتی‌اکسیدانی باشد.

با توجه به آزاد شدن واسطه‌های التهابی در التهاب حاد به خصوص نیتریک اکساید، طبق داده‌ها می‌توان نتیجه گرفت عصاره گیاهان مذکور به مقدار معنی‌داری از آزاد شدن این واسطه جلوگیری کرده است. همچنین در گروه ترکیب دو عصاره مذکور اثراتی مشابه دگزامتازون در کاهش نیتریک اکساید دیده شد. در تأیید این مسئله نشان داده شد که درمان ماکروفاژهای صفاقی استخراج‌شده با تیوگلیکولات و مجاورشده با LPS و IFNγ با عصاره آبی سیاه‌دانه منجر به سرکوب واسطه‌های اصلی التهاب مانند NO شده است [۲۴]. در این ارتباط نیز اثر مواد مؤثر عصاره‌های خارمریم و سیاه‌دانه که به ترتیب سیلیمارین و تیموکینون است بر میزان تولید نیتریک اکساید بررسی شده است. اثر ضدالتهابی تیموکینون در مدل التهابی آرتریت رماتوئید ایجادشده با کلاژن در موش، همراه با کاهش نیتریک اکساید می‌تواند مؤید اثر ضدالتهابی این گیاه باشد [۳۱]. همچنین عصاره خارمریم نیز در این مطالعه باعث کاهش نیتریک اکساید شده است که هم‌راستا با اثرات ضدالتهابی ماده مؤثر در مطالعات گذشته بوده است. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که سیلیبین با مسدود کردن مسیرهای سیگنالینگ یا NF-κB و مهار تولید نیتریک اکساید، منجر به مهار فعالیت ماکروفاژهای صفاقی موش می‌شود [۳۲]. در مطالعه حاضر اثر توأم عصاره‌های مذکور در کاهش چشمگیر نیتریک اکساید و افزایش معنادار آنتی‌اکسیدان در سرم موش‌ها نشان داده شد که تأییدی بر اثرات پلی هربالیسم و اثرات سینرژیسمی این دو گیاه است.

نتیجه‌گیری

با توجه به داده‌های آورده‌شده نتیجه گرفته می‌شود که فرضیه ما در ترکیب دو عصاره سیاه‌دانه و خارمریم و افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی و مهار التهاب در مدل موشی پریتونیت قبول است. و ممکن است در جلوگیری از التهاب و مزمن شدن آن نقش داشته باشد و بتوان از آن به عنوان درمان مکمل در بیماری‌های التهابی استفاده کرد. در مورد چگونگی اثر گیاهان در میزان و مقدار آزاد شدن واسطه‌های التهابی درگیر باید تحقیقات ایمونولوژیک تکمیلی صورت گیرد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی مرکز تحقیقات دانشگاه علوم‌پزشکی اراک همه ملاحظات اخلاقی و پروتکل‌های کار روی حیوانات آزمایشگاهی را در این مطالعه تأیید کرده و این پژوهش با کد اخلاق IR.ARAKMU.REC.1397.359 تصویب شد.

حامی مالی

این مقاله برگرفته از پروژه تحقیقاتی با کد ۳۱۹۶ است و هزینه انجام آن را معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم‌پزشکی اراک تأمین کرده است.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان به یک اندازه در نگارش مقاله مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

طبق نظر نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و شورای پژوهشی دانشگاه علوم‌پزشکی اراک به دلیل تأمین مالی تشکر و قدردانی می‌شود.

References

[1] Ganji A, Farahani I, Palizvan MR, Ghazavi A, Ejtehadifar M, Ebrahimi-monfared M, et al. Therapeutic effects of walnut oil on the animal model of multiple sclerosis. Nutr Neurosci. 2019; 22(3):215-22.[DOI: 10.1080/1028415X.2017.1371389]

[2] Ghazavi A, Mosayebi G, Solhi H, Rafiei M, Moazzeni SM. Serum markers of inflammation and oxidative stress in chronic opium (Taryak) smokers. Immunol Lett. 2013; 153(1-2):22-6. [DOI:10.1016/j.imlet.2013.07.001]

[3] Jones RS, Claridge JA. Acute abdomen. In: Townsend CM, Sabiston DC, editors. Sabiston Textbook of Surgery, 17th edition. Philadelphia: Elsevior SAounders; 2004. https://books.google.com/books?id=8b_IRwAACAAJ&dq

[4] Mion CM, Béraud JJ. Treatment of acute renal failure by peritoneal dialysis. In Acute Renal Failure. Boston: Springer; 1984. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4613-2841-4_24

[5] Amirghofran Z. Medicinal plants as immunosuppressive agents in traditional Iranian medicine. Iran J Immunol. 2010; 7(2):65-73. [PMID]

[6] Woo CC, Kumar AP, Sethi G, Tan KHB. Thymoquinone: Potential cure for inflammatory disorders and cancer. Biochem Pharmacol. 2012; 83(4):443-51. [DOI:10.1016/j.bcp.2011.09.029][PMID]

[7] Lirussi F, Beccarello A, Zanette G, De Monte A, Donadon V, Velussi M, et al. Silybin-beta-cyclodextrin in the treatment of patients with diabetes mellitus and alcoholic liver disease. Efficacy study of a new preparation of an anti-oxidant agent. Diabetes Nutr Metab. 2002; 15(4):222-31. [PMID]

[8] Agrawal S, Bonkovsky HL. Management of nonalcoholic steatohepatitis: An analytic review. J Clin Gastroenterol. 2002; 35(3):253-61. [DOI:10.1097/00004836-200209000-00011]

[9] Lucena MI, Andrade RJ, de la Cruz JP, Rodriguez-Mendizabal M, Blanco E, de la Cuesta FS. Effects of silymarin MZ-80 on oxidative stress in patients with alcoholic cirrhosis. Int J Clin Pharmacol Ther. 2002; 40(1):2-8. [DOI:10.5414/CPP40002]

[10] Tavakkoli A, Mahdian V, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Review on clinical trials of black seed (Nigella sativa) and its active constituent, thymoquinone. J Pharmacopuncture. 2017; 20(3):179-93. [DOI:10.3831/KPI.2017.20.021] [PMID] [PMCID]

[11] Esmaeil N, Balouchi Anaraki S, Gharagozloo M, Moayedi B. Silymarin impacts on immune system as an immunomodulator: One key for many locks. Int Immunopharmacol. 2017; 50:194-201. [DOI:10.1016/j.intimp.2017.06.030]

[12] Wianowska D, Wiśniewski M. Simplified procedure of silymarin extraction from silybum marianum L. Gaertner. J Chromatogr Sci. 2015; 53(2):366-72.[DOI:10.1093/chromsci/bmu049]

[13] Koshak AE, Yousif NM, Fiebich BL, Koshak EA, Heinrich M. Comparative immunomodulatory activity of Nigella sativa l. preparations on proinflammatory mediators: A focus on asthma. Front Pharmacol. 2018; 9:1075. [PMID] [PMCID]

[14] Noel PRB, Barnett KC, Davies RE, Jolly DW, Leahy JS, Mawdesley-E, et al. The toxicity of dimethyl sulphoxide (DMSO) for the dog, pig, rat and rabbit. Toxicol. 1975; 3(2):143-69. [DOI:10.1016/0300-483X(75)90081-5]

[15] Xu T, Qiao J, Zhao L, He G, Li K, Wang J, et al. Effect of dexamethasone on acute respiratory distress syndrome induced by the H5N1 virus in mice. Eur Respir J. 2009; 33:852-60. [DOI:10.1183/09031936.00130507]

[16] Vahdati-Mashhadian N, Rakhshandeh H, Omidi A. An investigation on LD50 and subacute hepatic toxicity of Nigella sativa seed extracts in mice. Int J Pharm Sci. 2005; 60(7):544-7. https://www.ingentaconnect.com/content/govi/pharmaz/2005/00000060/00000007/art00013

[17] Soufy NI. Hepatoprotective and antioxidant effects of Silybum marianum plant against hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride in rats. J Am Sci. 2012; 8(4):479-86. http://www.jofamericanscience.org/journals/am-sci/am0804/064_8482am0804_479_486.pdf

[18] Kitano M. Updating of OECD guidelines for the testing of chemicals. Wat Sci Tech. 1992; 25(11):465-72. https://www.proquest.com/docview/1943169657

[19] Lam D, Harris D, Qin Z. Inflammatory mediator profiling reveals immune properties of chemotactic gradients and macrophage mediator production inhibition during thioglycollate elicited peritoneal inflammation. Mediators Inflamm. 2013; 1-9. [DOI:10.1155/2013/931562]

[20] Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability Of Plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. Anal Biochem. 1996; 239(1):70-6.[DOI:10.1006/abio.1996.0292]

[21] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N] nitrate in biological fluids. Anal Biochem. 1982; 126(1):131-8. [DOI:10.1016/0003-2697(82)90118-X]

[22] Gholamnezhad Z, Keyhanmanesh R, Boskabady MH. Anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory aspects of Nigella sativa for its preventive and bronchodilatory effects on obstructive respiratory diseases: A review of basic and clinical evidence. J Funct Foods. 2015; 17:910-27. [DOI:10.1016/j.jff.2015.06.032]

[23] Gharagozloo M, Jafari S, Esmaeil N, Javid EN, Bagherpour B, Rezaei A. Immunosuppressive effect of silymarin on mitogen-activated protein kinase signalling pathway: The impact on T cell proliferation and cytokine production. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2013; 113(3):209-14. [DOI:10.1111/bcpt.12088]

[24] Majdalawieh AF, Hmaidan R, Carr RI. Nigella sativa modulates splenocyte proliferation, Th1/Th2 cytokine profile, macrophage function and NK anti-tumor activity. J Ethnopharmacol. 2010; 131(2):268-75. [DOI:10.1016/j.jep.2010.06.030]

[25] Hajhashemi V, Ghannadi A, Jafarabadi H. Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and antiinflammatory drug. Phytother Res. 2004; 18(3):195-9. [DOI: 10.1002/ptr.1390]

[26] Bahmani M, Shirzad H, Rafieian S, Rafieian-Kopaei M. Silybum marianum: Beyond hepatoprotection. J Evid Based Complementary Altern Med. 2015; 20(4):292-301. [DOI:10.1177/2156587215571116]

[27] Meddeb W, Rezig L, Zarrouk A, Nury T, Vejux A, Prost M, et al. Cytoprotective activities of milk thistle seed oil used in traditional tunisian medicine on 7-ketocholesterol and 24s-hydroxycholesterol-induced toxicity on 158N murine oligodendrocytes. Antioxidants (Basel). 2018; 7(7):95. [DOI:10.3390/antiox7070095]

[28] Anvari D, Jamei R. Evaluation of antioxidant capacity and phenolic content in ethanolic extracts of leaves and flowers of some asteraceae species. Recent Pat Food Nutr Agric. 2018; 9(1):42-9. [PMID]

[29] Ramadan MF, Kroh LW, Mörsel JT. Radical scavenging activity of black cumin (Nigella sativa L.), coriander (Coriandrum sativum L.), and niger (Guizotia abyssinica Cass.) crude seed oils and oil fractions. J Agric Food Chem. 2003; 51(24):6961-9. [DOI:10.1021/jf0346713] [PMID]

[30] Shahin YR, Elguindy NM, Abdel Bary A, Balbaa M. The protective mechanism of Nigella sativa against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma through its antioxidant effect and EGFR/ERK1/2 signaling. Environ Toxicol. 2018; 33(8):885-98. [DOI:10.1002/tox.22574]

[31] Umar S, Zargan J, Umar K, Ahmad S, Katiyar CK, Khan HA. Modulation of the oxidative stress and inflammatory cytokine response by thymoquinone in the collagen induced arthritis in Wistar rats. Chem Biol Interact. 2012; 197(1):40-6. [DOI:10.1016/j.cbi.2012.03.003]

[32] Kang JS, Jeon YJ, Kim HM, Han SH, Yang KH. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase expression by silymarin in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. J Pharmacol Exp Ther. 2002; 302(1):138-44. [DOI:10.1124/jpet.302.1.138]

This Page Intentionally Left Blank