Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 25, No.3, Jun 2017
Pages:171-182

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۵، شماره ۳، خرداد ۱۳۹۶
صفحه: ۱۸۲-۱۷۱

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 14:23 IRDT on Wednesday August 23rd 2017

تقویت عملکرد مونوسیت‌های خون محیطی رت به دنبال تجویز خوراکی کورکومین

حسین زیرک مرنگلو[۱]، شیوا خضری*[۲]، سیدمیثم ابطحی فروشانی[۳]

چکیده

مقدمه: کورکومین یک ماده شیمیایی به رنگ زرد روشن است که توسط برخی از گیاهان مانند زردچوبه (Tumeric) تولید می‌شود. اثرات ضدالتهابی کورکومین در برخی از مطالعات ثبت شده است. این مطالعه به منظور بررسی اثرات کورکومین بر عملکرد فیزیولوژیکی مونوسیت‌های خون رت انجام گرفت.

روش بررسی: این پژوهش یک مطالعه تجربی است. جامعه مورد مطالعه شامل ۲۰ رأس رت ویستار است که به‌طور تصادفی به دو گروه تیمار و کنترل تقسیم شدند. از روز اول کورکومین با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم به صورت خوراکی به مدت چهار هفته به گروه تیمار داده شد. موش‌های گروه کنترل PBS را در همان حجم دریافت کردند. در پایان از موش‌ها خون‌گیری شد و مونوسیت‌ها تحت یک گرادیانفایکول جدا شدند. مونوسیت‌های جدا شده با مخمر اپسونیزه به چالش کشیده شدند و عملکرد آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مونوسیت‌های جدا شده از گروه کنترل و تیمار، هیچ تفاوت معنی‌داری در فاگوسیتوز پس از چالش با مخمر اپسونیزه ندارند (P= ۰/۱) . با این وجود، انفجار تنفسی (P= ۰/۰۰۹) و تولید نیتریک اکساید (P= ۰/۰۳) در موش‌هایی که کورکومین دریافت کرده‌اند نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت. البته فعالیت زیستی مونوسیت‌های گروه درمانی نسبت به مونوسیت‌های گروه شاهد بیشتر بود (P= ۰/۰۰۰۱).

نتیجه‌گیری: در مجموع به نظر می‌رسد که کورکومین یک منبع طبیعی برای تعدیل عملکرد مونوسیت‌ها به ویژه در بیماری‌های خود ایمنی است به طوری که افزایش فعالیت مونوسیت‌ها منجر به ایجاد شرایط ایمونوپاتولوژیک می‌شود.

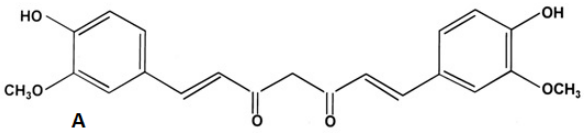
واژه‌های کلیدی: کورکومین، مونوسیت، فاگوسیتوز، نیتریک اکساید، رت

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه
۲- استادیار فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه
۳- استادیار ایمونولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۴۴۳۱۹۴۲۱۲۲، پست الکترونیکی: sh.khezri@urmia.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۱۶

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 14:23 IRDT on Wednesday August 23rd 2017

مقدمه

مرگ و میر ناشی از بیماری‌های غیر عفونی، از مهم‌ترین چالش‌های پیشروی طب امروزی است. متأسفانه در کشور ما نیز روند این بیماری رو به افزایش است. با وجود تحقیقات و آزمودن راه‌کارهای متنوع، فرایند پیشگیری و نیز پاسخ‌دهی به درمان‌های رایج هنوز رضایت‌بخش نبوده و چاره‌اندیشی بهتر و مؤثرتری را طلب می‌کند (۱). در همین راستا امروزه توجه زیادی به مواد با منشاء گیاهی شده است. اگرچه این گیاهان نیز عاری از عـوارض نیستند ولی در بسیاری از موارد ممکن است به دلیل داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی سمیت داروهای دیگر را کم کنند (۲). زردچوبه (curcuma longa) از جمله مهم‌ترین این گیاهان دارویی است که سال‌ها است که به عنوان یک گیاه دارویی در طب سنتی مصرف می‌شود. زردچوبه گیاهی علفی، پایا، به ارتفاع یک تا یک و نیم متر دارای ریزوم متورمی است که از آن ساقه‌های هوایی خارج می‌شود. این گیاه در نواحی شرقی هندوستان و چین می‌روید ولی در بسیاری از نقاط حاره‌ای مانند مالزی، پاکستان، اندونزی، آفریقا و آمریکای جنوبی نیز پرورش می‌یابد و تکثیر آن از طریق کاشتن قطعات ریزوم جوانه‌دار گیاه صورت می‌گیرد. این گیاه به سبب ویژگی‌های منحصر به فرد سلامتی زایی‌اش در سراسر جهان به عنوان یک ماده غذایی عمل‌گرا شناخته شده است. گیاه زردچوبه به صورت سنتی در صنایع غذایی و دارویی کاربردهای فراوانی دارد. خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضدتورم و ضد سرطان ریزوم زردچوبه به اثبات رسیده است (۳). کورکومین یا دی فرولیل متان ($C_{12}H_{20}O_6$)، یک پلی فنول هیدروفوب مشتق شده از ریزوم گیاه زردچوبه است. ریزوم زردچوبه محتوی سه آنالوگ مهم است: کورکومین، دمتوکسی کورکومین و بیس دمتوکسی کورکومین که در مجموع کورکومینوئیدها نامیده می‌شوند. این ترکیبات در موقعیت گروه متوکسی بر روی حلقه آروماتیک با یکدیگر متفاوت هستند.



شکل ۱: ساختمان شیمیایی کورکومین (۴)

در میان این سه کورکومینوئید، کورکومین در زردچوبه از همه فراوان‌تر است (۴). کورکومین به صورت خالص، پودری کریستالی و نامحلول در آب بوده و به راحتی در حلال‌هایی مانند استون، اتانول و متانول حل می‌شود. از نظر ساختاری، کورکومین دارای دو حلقه فنولی در مولکول خود است در حالی که آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی BHA (هیدروکسی آنیزول بوتیله) و BHT (هیدروکسی تولوئن بوتیله) تنها یک حلقه فنولی دارند، بنابراین کورکومین می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری نسبت به آن‌ها داشته باشد (۵). علاوه بر اثرات آنتی‌اکسیدانی، اثرات ضد باکتریایی، کاهش‌دهنده سطح کلسترول، بازدارندگی از بیماری‌های قلبی و عروقی، مهارکننده آسیب غشاء زیستی در مقابل پراکسیداسیون، خاصیت ضدالتهابی و کاهنده آرتروز روماتیسمی، حفاظت کننده در مقابل بیماری آلزایمر، مهارکننده آفلاتوکسین B1، ضد تومور و ضد سرطانی آن به اثبات رسیده است. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که کورکومین به طور ذاتی توانایی تعدیل مسیرهای سرطان‌زایی و در نتیجه درمان یا تأخیر فرایند سرطان‌زایی را در گونه‌های مختلف حیوانی دارا است (۶). همچنین در کنار مطالعات متعددی که به اثرات ضدالتهابی زردچوبه اشاره داشته‌اند، برخی مطالعات نیز به اثرات مستقیم ضدالتهابی کورکومین در شرایطی از قبیل آسیب‌های نخاعی و همچنین عفونت‌های گوش میانی اشاره شده است (۷،۸). مشخص است که واکنش‌های التهابی با عملکردهای سیستم ایمنی به ویژه پاسخ‌های ایمنی ذاتی در هم تنیده شده است (۹).

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 14:23 IRDT on Wednesday August 23rd 2017

اجزای ایمنی ذاتی از قبیل بیگانه خوارهای حرفه‌ای نقش مهمی در واکنش‌های دفاعی بر عهده دارند. وظیفه اصلی آن‌ها بلع میکروارگانیسم‌ها، سلول‌ها و ذرات خارجی است. بیگانه خوارهای حرفه‌ای شامل نوتروفیل‌ها و سیستم بیگانه خواری تک‌هسته‌ای شامل مونوسیت‌ها و ماکروفاژها می‌باشند. مونوسیت‌ها دومین خط دفاعی بدن در برابر عوامل بیگانه محسوب می‌شوند. این سلول‌ها فعالانه به سمت مواد کموتاکتیک و بیگانه مهاجرت کرده (کموتاکسی)، آن‌ها را می‌بلعند (فاگوسیتوز) و از بین می‌برند(۱۰). در بافت‌های جراحت دیده یا عفونی مونوسیت‌ها توانایی تمایز به انواع مختلف سلول‌ها از قبیل ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک را دارا می‌باشند. این سلول‌ها به نوبه خود نقش مهمی را در ایجاد و شکل‌دهی به پاسخ‌های سیستم ایمنی اکتسابی و ذاتی در بیماری‌ها بازی می‌کنند. این سلول‌ها همچنین با از بین بردن بافت‌های مرده، در حال مرگ و یا تخریب شده مستقیماً در عمل ترمیم نسوج شرکت می‌نمایند (۱۱). مونوسیت‌ها فنوتیپ‌های مجزایی را نسبت به نوع پاسخ ایمنی القا شده از خود نشان می‌دهند. در بیماری‌های عفونی و خود التهابی میزان تکثیر سلول‌های مونوسیت در مغز استخوان افزایش می‌یابد (۱۲). امروزه افزایش میزان مونوسیت‌ها به عنوان شاخص تشخیصی غیرمستقیم انواع بیماری‌های خود ایمن، اختلالات دستگاه گوارش، سارکوئیدز، توبرکلوزیس، سرطان و عفونت‌های باکتریایی و ویروسی در نظر گرفته می‌شود (۱۳). در مقابل سندرم مونوسیتوپنی (کاهش مونوسیت) در اندوتوکسمی، استفاده از کورتیکواستروئیدها و داروهای شیمی‌درمانی و همچنین بیمارانی که در ژن GATA2 نقص دارند دیده می‌شود (۱۴). با وجودی که برخی از اثرات ضدالتهاب کورکومین شده است ولی تاکنون تحقیق جامعی در مورد اثرات این گیاه بر عملکردهای مونوسیت‌ها صورت نگرفته است. مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات احتمالی تعدیل کنندگی تجویز خوراکی کورکومین بر پاسخ‌های مونوسیت‌ها در رت‌های نژاد ویستار انجام شده است.

روش بررسی

جامعه مورد مطالعه و گروه‌ها:

جامعه مورد مطالعه شامل ۲۰ سر رت نژاد ویستار (به وزن ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم) بود که از حیوان‌خانه دانشکده علوم دانشگاه ارومیه خریداری شده بودند و به طور تصادفی در دو گروه مساوی شاهد و تیمار با کورکومین قرار گرفتند. کلیه مراحل این تحقیق از نظر اخلاقی مورد تایید شورای پژوهشی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه با کد " 2720/تد.ت " قرار گرفت. رت‌های گروه تیمار به مدت یک ماه کورکومین به میزان ۲۰۰mg/kg به صورت سوسپانسون خوراکی دریافت کردند. انتخاب دوز کورکومین بر اساس مطالعات قبلی صورت گرفت به طوری که عدم اثرات جانبی را برای این دوز کورکومین تایید می‌کردند (۸). رت‌های گروه شاهد نیز در همان مدت در حجم مشابه با گروه تیمار بافر PBS را به صورت گاواژ دریافت کردند. پس از این مدت موش‌ها به شیوه انسانی کشتار شده و خون محیطی از قلب آن‌ها استحصال شد و مونوسیت‌های خون محیطی آن‌ها تحت گرادیان فایکول بدین شرح جدا شد و سپس اقدام به بررسی عملکرد این سلول‌ها گردید.

جداسازی سلول‌های مونوسیت

خون هپارینه استحصال شده از قلب حیوان، با محیط کشت RPMI-1640 به نسبت ۱:۱ رقیق شد. خون رقیق شده به آرامی بر روی فایکول که حجم آن برابر خون رقیق نشده است اضافه گردید. مجموع خون رقیق شده و فایکول با سرعت g 800 به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی که در حدفاصل فایکول و خون رقیق شده به صورت لایه میانی ابر مانند جمع شده بودند به آرامی جمع‌آوری گردید. سلول‌های تک‌هسته‌ای شامل مونوسیت‌ها و لنفوسیت‌های (PBMC) به دست آمده به منظور حذف فایکول همراه آن، با محیط کشت RPMI-1640 مخلوط و با سرعت 450g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریوفوژ گردید. سلول‌های حاصل مجدداً با محیط کشت RPMI-1640 مخلوط و این بار به منظور حذف پلاکت همراه PBMC با سرعت g۲۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریوفوژ شدند. سپس تعداد ۱×۱۰^{۷} سلول تک‌هسته‌ای جدا شده به یک فلاسک T25 به همراه محیط کشت RPMI-1640، ۲mM L- گلوتامین، ۱۰۰U/ml پنی‌سیلین، ۱۰۰ µg/ml

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 14:23 IRDT on Wednesday August 23rd 2017

استرپتومایسین، ۱۰ درصد FBS اضافه گردید. بعد از اتمام انکوباسیون (۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 و ۹۰ درصد رطوبت) مایع رویی که حاوی کلیه سلول‌های تک هسته‌ای به جز مونوسیت‌ها هستند با دو بار شستشوی آرام حذف شدند. سپس به هر فلاسک ۱۰-۵ میلی‌لیتر بافر سرد PBS بدون کلسیم و منیزیم به همراه EDTA (۱۰mM) اضافه و فلاسک‌ها را به مدت ۱۰-۵ دقیقه به آرامی تکان داده تا سلول‌ها جدا شوند و سلول‌های تخلیص شده از نظر میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند. میزان زنده‌مانی این سلول‌ها در حد ۸۵٪ پس از رنگ‌آمیزی با تریپان بلو سنجش شد (۱۵).

سنجش عملکردهای فاگوسیتوز و میکروب‌کشی مونوسیت‌ها:

درصد فاگوسیتوز و درصد مخمر کشی مونوسیت‌ها به ترتیب بر اساس سنجش میزان کل مخمرهای برداشت شده و میزان مخمرهای زنده مانده در سلول‌های مونوسیت پس از ۹۰ دقیقه محاسبه شد. در این شیوه پس از لیز مونوسیت‌ها، با استفاده از آزمون MTT میزان فعالیت متابولیک مخمرها که شاخصی از تعداد آن‌هاست در گروه‌های مختلف مقایسه شدند. در این ارزیابی هر نمونه مونوسیت که از هریک از موش‌های شاهد و یا تیمار شده با کورکومین استحصال شد، به دو گروه تقسیم شدند. گروه تست (T) شامل سوسپانسیون‌های مونوسیت با تراکم ۵×۱۰^{۶} cell/ml در بافر HBSS با ۱۰۰ میکرولیتر سرم رت و گروه کنترل (C) شامل نیم میلی لیتر بافر HBSS با ۱۰۰ میکرولیتر سرم رت بدون مونوسیت به مدت ۵ دقیقه انکوبه شدند. سپس یک دهم میلی لیتر مخمر ساکارومایسس سرویسیه (نسبت برابر مونوسیت و مخمر) به هر دو گروه تست و کنترل اضافه گردید. در زمان صفر از هر دو لوله‌های تست (T_0) و کنترل (C_0) به میزان ۱۰ میکرولیتر نمونه‌برداری شد. بعد از انکوباسیون به مدت ۹۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه، نیز نمونه‌برداری از هر دو لوله‌های تست (T_{90}) و کنترل (C_{90}) به میزان ۱۰ میکرولیتر صورت گرفت. در مرحله بعد به منظور لیز مونوسیت‌های موجود، نمونه‌های برداشته شده از گروه تست (زمان‌های صفر و ۹۰ دقیقه) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق در آب مقطر استریل تیمار شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ها به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته و انکوباسیون به مدت چهار ساعت انجام شد. در نهایت ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT(۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به چاهک‌ها اضافه گردید و بعد از مدت ۲۰ دقیقه انکوبه با افزودن ۱۵۰ میکرولیتر DMSO کریستال‌های فورمازون حل شده و میزان جذب نوری (OD) در طول‌موج ۴۹۰ نانومتر قرائت شد. درصد باکتری کشی از این رابطه محاسبه گردید:

$$\%\text{KILLING} = 100 - \frac{100 \times \text{ODT90}}{\text{ODT0}}$$

به منظور تعیین درصد فاگوسیتوز لوله‌های تست بعد از ۹۰ دقیقه انکوباسیون (T_{90}) به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰ g در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و باکتری‌های خارج سلولی (EC: Extracellular) فاگوسیت نشده جدا شده و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی نمونه‌ها به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته و ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به چاهک‌ها اضافه گردید و بعد از مدت ۲۰ دقیقه انکوبه با افزودن ۱۵۰ میکرولیتر DMSO کریستال‌های فورمازون حل شده و میزان جذب نوری (OD) در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت شدند تعداد آن‌ها به شیوه MTT مشخص شد. درصد فاگوسیتور از این رابطه حساب شد (۲):

$$\text{PHAGOCYTOSIS\%} = \text{ODT0} - 100 \times \frac{\text{EC/Bg}}{\text{ODT0}}$$

$$\text{Bg(bacterial growth)} = \frac{\text{ODC90}}{\text{ODC0}}$$

سنجش فعالیت زیستی (vitality):

بعد از جداسازی مونوسیت‌های خون محیطی، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مونوسیت‌ها به میکروتیوب منتقل‌شده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۲۰ میکرولیتر MTT (۳- (۵،۴- دی متیلتیازول ۲-ایل)- ۵،۲- دی فنیل تترازولیوم بروماید) اضافه شده و دوباره ۲۰ دقیقه انکوبه شد در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر DMSO به میکروتیوب اضافه گردید. محتویات آن به پلیت‌های ۹۶ خانه منتقل شد و در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت شد (۲).

سنجش قابلیت انفجار تنفسی سلول‌های مونوسیت:

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 14:23 IRDT on Wednesday August 23rd 2017

سوسپانسیون مونوسیت‌ها به تعداد $۲×۱۰^{۶}$ cell/ml تهیه شد. سلول‌ها به مدت یک ساعت با مخمر اپسونیزه انکوبه گردید. آنگاه ۱۰۰ میکرولیتر محلول زیموزان و NBT (نیتروبلوتترازولیوم) (شرکت - Sigmaآمریکا) به میکروتیوب اضافه گردید و به مدت یک ساعت دیگر انکوبه گردید. در نهایت ۴۰۰ میکرولیتر N-N دی متیل فورماید به میکروتیوب اضافه گردید و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی میکروتیوب را در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته و نتیجه با الایزانگار در طول موج ۵۴۰nm قرائت گردید (۲).

سنجش نیتریک اکساید

توسط واکنش گریس به روش میکروپلیتی انجام پذیرفت. برای اندازه‌گیری غلظت نیتریت و نیترات تام، در یک میکروپلیت الایزا ابتدا 100 میکرولیتر سرم پروتئین‌زدایی شده و سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول کلریدوانادیوم اضافه شد تا نیترات‌ها به نیتریت تبدیل شوند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر مخلوط ۱ به ۱ سولفانامید و NEDD افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. بعد از انجام واکنش و تشکیل رنگ، جذب نوری حاصل از تشکیل ماده رنگی در ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه خوانشگر الایزا قرائت گردید و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت نمونه‌ها محاسبه شد (۲).

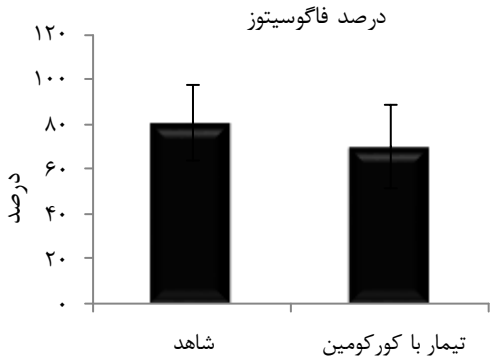
تجزیه تحلیل آماری:

جهت مقایسه داده‌ها از آزمون آنالیز من ویتنی یو استفاده شد. داده‌ها به صورت Mean±SD گزارش شدند. سطح معنی‌داری، $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

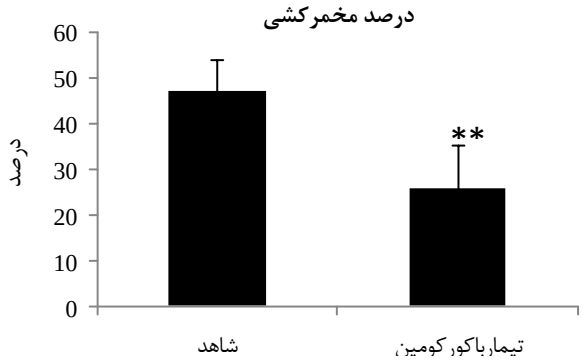
پس از فاگوسیت شدن ذره میکروبی توسط فاگوسیت کننده‌ها و تشکیل فاگوزوم، جسم فاگوسیت شده از دو طریق مکانیسم‌های وابسته به اکسیژن (انفجار تنفسی) و غیر وابسته به اکسیژن تخریب می‌شود و از بین می‌رود.

تست ارزیابی فاگوسیتوز که در این مطالعه استفاده شد، ارزیابی کلی از قابلیت برداشت به‌وسیله سلول‌های مونوسیت را ارائه می‌دهد (۲). بر اساس این نتایج به نظر می‌رسد که با وجودی که میزان فاگوسیتوز در مونوسیت‌های جدا شده از خون رت‌های تیمار شده با کورکومین نسبت به گروه کنترل کاهش می‌یابد ولی تغییر داده شده از نظر آماری معنی‌دار نیست (P= ۰/۱) (نمودار ۱). در مقابل درصد مخمر کشی در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری یافت (P= ۰/۰۲) (نمودار ۲).



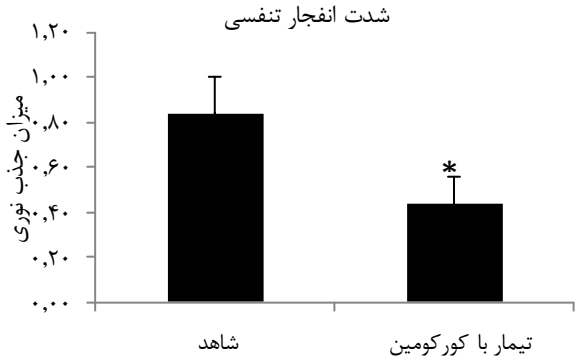
نمودار ۱: ارزیابی درصد فاگوسیتوز مونوسیت ها در دو گروه تیمار شده با کورکومین و شاهد

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 14:23 IRDT on Wednesday August 23rd 2017



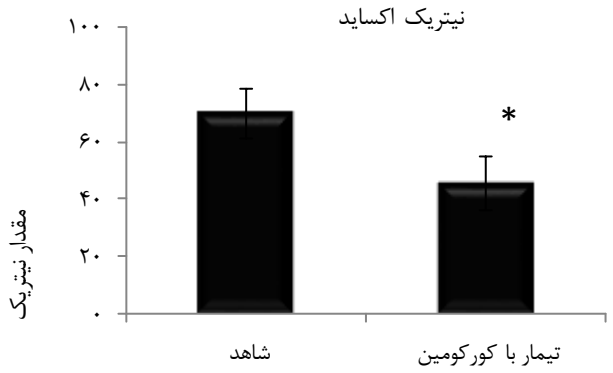
نمودار ۲: ارزیابی درصد مخمرکشی مونوسیت‌ها در دو گروه تیمار شده با کورکومین و شاهد (**اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۱)

در تست احیای نیتروبلوتترازولیوم (NBT) توانایی و ظرفیت فاگوسیت کننده‌ها مثل مونوسیت‌ها در تولید رادیکال‌های آزاد به ویژه آنیون سوپر اکسید در فرایند انفجار تنفسی مشخص می‌گردد. آنیون سوپر اکسید تولیدشده، ماده رنگی NBT (زرد، شفاف محلول در آب) را احیا نموده و به فورمازون آبی نامحلول و رسوب در داخل مونوسیت تبدیل می‌کند (۹). میزان فورمازون تولیدشده با روش فتومتری برای ارزیابی عملکرد انفجار تنفسی مونوسیت اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از تست NBT حاکی از کاهش قابلیت انفجار تنفسی مونوسیت‌های گروه تیمار است (P=۰/۰۰۹) (نمودار ۳). در کنار واسطه‌های اکسیژن واسطه‌های نیتروژن نیز در حذف عامل فاگوسیت شده دخالت می‌کنند. در این راستا نتایج حاکی از کاهش تولید نیتریک اکسید در سلول‌های مونوسیت رت‌های گروه تیمار نسبت به گروه شاهد بود (P= ۰/۰۳) (نمودار ۴). میزان احیای MTT به کریستال‌های آبی فورمازون توسط میتوکندری مونوسیت‌ها شاخصی از فعالیت زیستی این سلول‌ها است (۲). نتایج ارزیابی فعالیت زیستی مونوسیت‌های استحصال شده حاکی از افزایش معنی‌دار در گروه درمانی نسبت به گروه شاهد بود (P= ۰/۰۰۰۱)(نمودار ۵).

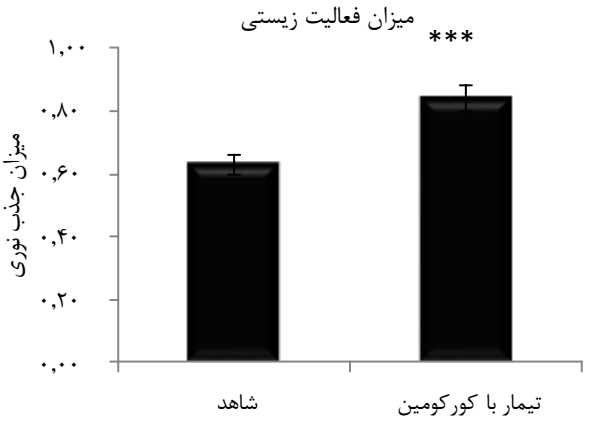


نمودار ۳: ارزیابی میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن مونوسیت‌ها در دو گروه تیمار شده با کورکومین و شاهد(** اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۱)

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 14:23 IRDT on Wednesday August 23rd 2017



نمودار ۴: ارزیابی میزان نیتریک اکسایدمونوسیت‌ها در دو گروه تیمار شده با کورکومین و شاهد (* اختلاف معنی‌دار در سطح P۰/۰۵>).



نمودار ۵: ارزیابی میزان فعالیت زیستی مونوسیت‌ها در دو گروه تیمار شده با کورکومین و شاهد (*** اختلاف معنی‌دار در سطح P۰/۰۰۱>)

بحث

گیاهان دارای ویژگی ایمونومودولاتوری می‌توانند به عنوان رهیافت جایگزین داروهای شیمی‌درمانی مرسوم استفاده شوند (۲). کورکومین یکی از مواد تشکیل‌دهنده عصاره ریزوم زردچوبه بوده که به دلیل خواص بسیار زیاد آن در سیستم‌های زیستی، تحقیقات وسیعی بروی آن صورت گرفته است (۱۶). بیش از ۱۰۰ مطالعه بالینی در مراحل مختلف در حال انجام است که اثرات کورکومین را در بیماری‌های مزمن از جمله دیابت و انواع سرطان‌ها، بیماری‌های خود ایمن، بیماری‌های قلبی، عصبی و روان‌شناختی بررسی می‌کنند (۱۷). ارزیابی نتایج حاصل از پژوهش ما که در زیر به آن پرداخته خواهد شد، گامی در جهت افزایش دانسته‌های موجود در مورد اثرات تجویز خوراکی کورکومین در مونوسیت‌ها به عنوان یکی از سلول‌های اساسی ایمنی ذاتی است.

بر اساس دانسته‌های کنونی به نظر می‌رسد که سلول‌های مونوسیت پس از مهاجرت آن‌ها به بافت (ماکروفاژها و سلول‌های دندرتیک) بر اساس ریز محیط اطرافی چندین فنوتیپ مختلف را پیدا می‌کنند (۱۱،۱۸،۱۹). به طور مثال نشان داده شده است که مونوسیت‌ها پس از مهاجرت به بافت بسته به شرایط قادر به تبدیل به حداقل دو نوع ماکروفاژ می‌باشند. این فنوتیپ‌ها از لحاظ سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها، گیرنده‌های لیگاند و عملکرد با یکدیگر متفاوت هستند.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 14:23 IRDT on Wednesday August 23rd 2017

ماکروفاژهای کلاسیک یا M1 گروهی از این ماکروفاژها با خاصیت ضدمیکروبی و التهابی قوی بوده که در پاتوژنز بیماری‌های التهابی و خود ایمن نقش فعالی را بازی می‌کنند (۱۸،۱۹). ماکروفاژهای M2 یا ماکروفاژهای فعال‌شده از مسیر آلترناتیو (جایگزین) به میزان کمتری از سایتوکاین های التهابی را نسبت به ماکروفاژهای M1 تولید کرده و در عوض نقش مهمی را در بازسازی وترمیم آسیب‌های بافتی ایجاد می‌کنند. این سلول‌ها نسبت به ماکروفاژهای M1 قابلیت میکروب‌کشی به‌مراتب کمتری دارند (۱۹). بر اساس نتایج تحقیق ما به نظر می‌رسد که کورکومین به دلیل کاهش میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن و هم‌چنین قابلیت کشتار کمتر، سلول‌های مونوسیت را به سمت فنوتیپ ضدالتهابی با قابلیت تبدیل به ماکروفاژهای M2 برنامه‌ریزی می‌کند. البته ذکر این نکته اساسی است که افزایش میزان فعالیت زیستی که در این تحقیق در رابطه با مونوسیت‌های استحصال شده از رت‌های تیمار شده با کورکومین دیده شد، حاکی از القاء پویای یک فنوتیپ ضدالتهابی و نه مهار ساده فعالیت این سلول‌ها توسط کورکوکین است. در گذشته اواد و همکاران نشان دادند که کورکومین با مهار TGF-βو کاسپاز-۳ موجب مهار آپوپتوز و افزایش زنده مانی سلول‌ها در بافت‌های آسیب‌دیده تحت پرفیوژن مجدد است (۲۰). همچنین عدم تغییر قابلیت فاگوسیتوز در کنار کاهش تولید رادیکال‌های آزاد در سلول‌های مونوسیت استحصال شده از رت‌های گروه تیمار نسبت به گروه شاهد نیز تاییدی بر تغییر در برنامه‌ریزی و پلاریزه شدن سلول‌های مونوسیت‌ها پس از مجاورت با کورکومین است.

رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن نقش اساسی را در حذف عوامل فاگوسیت شده بازی می‌کنند، با این حال زمانی که میزان تولید این رادیکال‌ها بیش از حد باشد و یا تولید آن‌ها در شرایط نامناسب صورت گیرد، این رادیکال‌های آزاد اکسیژن و یا نیتروژن منجر به ایجاد و گسترش آسیب‌های بافتی خواهند شد (۲۱). رادیکال‌های آزاد تولید شده در واکنش‌های التهابی می‌توانند در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌های خود ایمنی و خود التهابی نقش مهمی را ایفا نمایند. در شرایط طبیعی بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد تعادل دقیقی وجود دارد (۲۱،۲۲). عدم تعادل در این فرایند منجر به بروز استرس اکسیداتیو و نیتراتیو شده و زمینه ایجاد تغییرات پاتولوژیک را در سطح ماکرومولکول‌های سلول فراهم می‌دارد (۲۳). نتایج ما به خوبی نشان دادند که تیمار موش‌ها با کورومین به طور معنی‌دار تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن را پس از چالش با مخمر اپسونیزه را کاهش می‌دهد. تحقیقات نشان داده است که کورکومینوئیدهای موجود در زردچوبه رادیکال‌های آزاد نظیر رادیکال‌های هیدروکسیل، رادیکال‌های سوپراکسید، اکسیژن نوزاد، رادیکال‌های پروکسیل و پروکسی نیتریت که محصولات آن‌ها در القاء و ایجاد اکسیداسیون مؤثر هستند را به دام می‌اندازند. کورکومینوئیدها به طور موثررادیکال آزاد پایدار ۱ و ۱- دی فنیل ۲- پیکریل – هیدرازیل (DPPH) را خنثی می‌کنند و این واکنش اغلب برای مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ترکیبات مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. کورکومین به دلیل این که هم دارای حلقه فنولی و هم بخش ß- دی کتونی بر روی یک مولکول است، منحصر به فرد است، زیرا هردو این گروه‌ها سبب ایجاد قابلیت فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شوند (۵،۲۴).

از آنجایی که مطالعات متعدد نشان دادند کورکومین یک ترکیب با فعالیت اساسی آنتی اکسیدانتی است، احتمالاً بخش مهمی از کاهش شدت تولید غیراختصاصی رادیکال‌های آزاد در موش‌های تحت تیمار با کورکومین که در این مطالعه مشاهده شد، مربوط به این بخش است. در مطالعات مختلفی نیز نشان داده شده کورکومین دارای اثرات محافظت کننده در برابر اختلالات عملکردی، آسیب‌های بافتی، استرس اکسیداتیو و التهاب ناشی از ایسکمی خون‌رسانی مجدد است (۲۵). اخیراً برای کورکومین کاربردهای کلینیکی نیز گزارش شده است که از جمله مهم‌ترین بیماری‌هایی که در آن‌ها کورکومین مورد استفاده قرار گرفته می‌توان به روماتویید آرتریت، التهاب پس از جراحی، التهاب ایدیوپاتیک اوریت، آسم و بیماری آلزایمر اشاره کرد (۲۶). لازم به ذکر است که تولید لجام گسیخته رادیکال‌های آزاد در کلیه این بیماری‌ها توسط سلول‌های ایمنی

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 14:23 IRDT on Wednesday August 23rd 2017

ذاتی از جمله سلول‌های مونوسیت/ ماکروفاژ از ویژگی‌های اساسی پاتوژنز آن‌ها است. تولید واسطه‌های التهابی از قبیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن در مونوسیت‌ها از طریق فعالیت محصولات ژن‌های میلوپراکسیداز، نیتریک اکسید سنتتاز القایی در همکاری با فراورده ژن سیکلواکسیژناز صورت می‌گیرد. به نحو قابل‌توجهی مهار همه این ژن‌های یاد شده پس از استفاده از کورکومین ذکرشده است (۲۷). نکته جالب اینکه کاهش سطح نیتریک اکساید از جمله عوامل مؤثر در کاهش اثرات استرس در رت‌های تحت تیمار با کورکومین گزارش شده است (۲۸). کاهش تولید نیتریک اکساید در مونوسیت‌های استحصالی از رت‌های تحت تیمار با کورکومین از جمله یافته‌های ما در این پژوهش است. اخیراً نشان داده شده است که کورکومین میزان تولید فاکتورهای التهابی IL-1،IL-8، TNF-α و IL-6 را در مدل‌های تجربی آسم و دیابت کاهش می‌دهد. این سایتوکاین‌ها از عوامل التهابی بسیار مهم هستند. کاهش سطح این سایتوکاین ممکن است یکی از عوامل دیگر کاهش تولید فعالیت ضدالتهابی کورکومین بر مونوسیت‌ها باشد (۲۹،۳۰).

در کل به نظر می‌رسد که کورکومین به طور پویا موجب ایجاد یک فنوتیپ ضدالتهابی در سلول‌های مونوسیت می‌گردد. به طوری که این مونوسیت‌ها میزان کمتری از رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن را تولید می‌کنند. این مسئله یعنی کاهش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در شرایط ایمونوپاتولوژیک از قبیل بیماری‌های خود ایمن، امر مطلوبی به شمار می‌آید. البته کاهش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن در شرایط بیماری‌های عفونی ممکن است به گسترش عفونت کمک نمایید. در همین راستا نتایج ما حاکی از کاهش قابلیت مخمرکشی سلول‌های مونوسیت استحصالی از رت‌های تحت تیمار با کورکومین در مقایسه با رت‌های شاهد بود؛ بنابراین لازم است که در صورت استفاده دارویی از کورکومین به عنوان یک عامل ضدالتهاب، مهار دستگاه ایمنی و افزایش خطر عفونت‌ها مد توجه قرار گیرد.

در هر حال مطالعه حاضر تنها یک مطالعه مقدماتی است و لازم است در آینده مطالعات بیشتری از قبیل استفاده از کورکومین در مدل بیماری خود ایمن و یا عفونی صورت گیرد.

نتیجه‌گیری

کورکومین یک منبع طبیعی برای تعدیل عملکرد مونوسیت‌ها است بنابراین ممکن است که استفاده از آن به ویژه در بیماری‌های خود ایمنی و یا پیوند بافت که افزایش فعالیت مونوسیت‌ها منجر به ایجاد شرایط ایمونوپاتولوژیک می‌شود، مفید واقع گردد.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد بوده و نگارندگان از زحمات آقای مهندس علیاری، کارشناس آزمایشگاه ایمونولوژی جهت همکاری صمیمانه شان در پیشبرد این پایان‌نامه کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References:

1-Hosseini AK, Majidi J, Baradaran B, Yousefi M. ***Toll-Like Receptors in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases.*** Adv Pharm Bull 2015; 5(1): 605-14.

2-Abtahi Froushani SM, Esmaili Gouvarchin Galee H, Khamisabadi M, Lotfallahzade B. ***Immunomudulatory effects of hydroalcoholic extract of Hypericum perforatum.*** Avicenna J Phytomed 2015; 5(1): 62-8.

3-Palma M, Pinero Z, Barroso CG. ***Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents.*** J Chromatogr A 2001; 921(2): 169-74.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 14:23 IRDT on Wednesday August 23rd 2017

4-Joe B, Vijaykumar M, Lokesh BR. ***Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanism of action.*** Crit Rev Food Sci Nutr 2004; 44: 97-111.

5-Cleary K. ***Effects of oxygen and turmeric on the formulation of oxidative aldehyde in fresh pack dill pickles.*** A Thesis submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State University. 2004.

6-Carmona-Ramírez I, Santamaría A, Tobón-Velasco JC, Orozco-Ibarra M, Maldonado PD, González-Herrera IG, et al. ***Curcumin restores Nrf2 levels and prevents quinolinic acid-induced neurotoxicity.*** J Nutr Biochem 2013; 24: 14-24.

7-Akyuz S, Turan F, Gurbuzler L, Arici A, Sogut E, Ozkan O. ***The Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Curcumin in Middle Ear Infection.*** J Craniofac Surg 2016; 27(5): 494-7.

8-Sanivarapu R, Vallabhaneni V, Verma V. ***The Potential of Curcumin in Treatment of Spinal Cord Injury.*** Neurol Res Int 2016; 2016: 9468193.

9-Abtahi Froushani SM, Galeh HE. ***New insight into theimmunomodulatory mechanisms of Tretinoin in NMRI mice.*** Iran J Basic Med Sci 2014; 17: 632-7.

10-Yang J, Zhang L, Yu C, Yang X, Wang H. ***Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases.*** Biomark Res 2014; 2: 1-9.

11-Mansouri Motlagh B, Afzale Ahangaran N, Abtahi Froushani SM. ***Calcitriol modulates the effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells onmacrophage functions.*** Iran J Basic Med Sci 2015; 18:672-6.

12-Stefater JA, Ren S, Lang RA, Duffield JS. ***Metchnikoff's policemen-macrophages in development, homeostasis and regeneration.*** Trends Mol Med 2011; 17: 743-52.

13-Shi C, Pamer EG. ***Monocyte recruitment during infection and inflammation.*** Nat Rev Immunol 2011; 11: 762-74.

14-Vinh DC, Patel SY, Uzel G, Anderson VL, Alexandra F. ***Autosomal dominant and sporadic monocytopenia withsusceptibility to mycobacteria, fungi, papillomaviruses, and myelodysplasia.*** Blood 2010; 115: 1519-29.

15-Beikzadeh B, Delirezh Nowruz, Habibian R. ***The comparison of Different Monocytes Isolation Methods with Their Extraction in Magnetic Activated Cell Sorting.*** Razi J Med Sci 2014; 20(117): 21-9 [Persian].

16-Chen QY, Jiao DM, Yao QH, Yan J, Song J, Chen FY, et al. ***Expression analysis of Cdc42 in lung cancer and modulation of itsexpression by curcumin in lung cancer cell lines.*** Int J Oncol 2012; 40: 1561-8.

17-Soetikno V, Sari FR, Lakshmanan AP, Arumugam S, Harima M, Suzuki K, et al. ***Curcumin alleviates oxidative stress, inflammation, and renal fibrosis in remnant kidney through the Nrf2-keap1Pathway.*** Mol Nutr Food Res 2013; 57: 1649-59.

18-Hume DA. ***The Many Alternative Faces of Macrophage Activation.*** Front Immunol 2015; 6: 1-10.

19-Das A, Sinha M, Datta S, Abas M, Chaffee S, Sen CK, et al. ***Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration.*** Am J Pathol 2015; 185(10): 2596-606.

20-Awad AS, El-Sharif AA. ***Curcumin immune-mediated and anti-apoptotic mechanisms protect against renal ischemia/reperfusion and distant organ induced injuries.*** Int Immuno pharmacol 2011; 11: 992-6.

21-Babior BM. ***Phagocytes and oxidative stress.*** Am J Med 2000; 109: 33-44.

22-Cohen HB, Mosser DM. ***Extrinsic and intrinsic control of macrophage inflammatory responses.*** J Leukoc Biol 2013; 94(5): 913-19.

23-Gwyer Findlay E, Hussell T. ***Macrophage-mediated inflammation and disease: a focus on the lung.*** Mediators Inflamm 2012; 2012: 1-6.

24-Wang F, Huang W. ***Determination of curcumin by its quenchingeffect on the fluorescence of Eu3+-tryptophan complex.*** J Pharm Biomed Anal 2007; 43: 393-8.

25-Kuhad A, Pilkhwal S, Sharma S, Tirkey N, Chopra K. ***Effect of curcumin on inflammation and oxidative stress in cisplatin induced experimental nephrotoxicity.*** J Agric Food Chem 2007; 55: 10150-5.

26-Yan H, Yuan Y, Xi ZH, Kun ZH, Shaohua CH, Zhiyun D. ***Curcumin, Inflammation, and Chronic Diseases: How Are They Linked?*** Molecules 2015; 20: 9183-213.

27-Aggarwal BB, Deb L, Prasad S. ***Curcumin differs from tetrahydrocurcumin for molecular targets, signaling pathways and cellular responses.*** Molecules 2014; 20(1): 185-205.

28-Kaufmann FN, Gazal M, Bastos CR, Kaster MP, Ghisleni G. ***Curcumin in depressive disorders: An overview of Potential mechanisms, preclinical and clinical findings.*** Eur J Pharmacol 2016; 784:192-8.

29-Aldebasi YH, Aly SM, Rahmani AH. ***Therapeutic implications of curcumin in the prevention of diabetic retinopathy via modulation of anti-oxidant activity and genetic pathways.*** Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol 2013; 5: 194-202.

30-Kurup VP, Barrios CS. ***Immunomodulatory effects of curcumin in allergy.*** Mol Nutr Food Res 2008; 52(9): 1031-9.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 14:23 IRDT on Wednesday August 23rd 2017

Improvement in the Function of rat Peripheral Blood Monocytes Following Oral Administration of Curcumin

Hossein Zirak Marangalu [1], Shiva Khezri *[2], Seyyed Meysam Abtahi Froushani [3]

[1,2] Department of Biology, Science Faculty, Urmia University, Urmia, Iran
[3] Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 26 Jul 2016 **Accepted:** 5 Jan 2017

Abstract

Introduction: Curcumin is a bright yellow chemical produced by some plants like Turmeric. The anti-inflammatory effects of Curcumin were recorded in some studies. This study was done to investigate the effects of the Curcumin on the physiological functions of rat blood monocytes.

Methods: This study was an experimental one. The study population consisted of 20 rats randomly categorized into the treatment and control groups. Curcumin was orally administered to treatment group in daily doses of 200 mg/kg from the beginning of the study and continued for 4 weeks. The control rats received PBS at the same volume. At the ends, the blood samples were taken from the rats and the monocytes were isolated under a ficoll-hypaque gradient. Isolated monocytes were challenged with opsonized yeast and the functions were evaluated.

Results: The results showed that the monocytes isolated from the control and treatment groups have not shown any significant differences in phagocytosis after challenge with opsonized yeast (p=0.1). Nevertheless, the respiratory burst (P=0.009) and nitric oxide production (P=0.03) were decreased in curcumin treated rat compared to the control rats. Albeit, the biological activities of monocytes in the treatment group was increased compared to the monocytes isolated from the control group (P=0.0001).

Conclusions: Collectively, it seems that curcumin is a natural source to intervene the monocytes functions especially in autoimmune diseases so that monocytes hyperactivity causes immunopathological conditions.

Keywords: Curcumin; Monocyte; Phagocytosis; Nitric Oxide; Rat

This paper should be cited as:
Zirak Marangalu H, Khezri SH, Abtahi Froushani SM. **Improvement in the Function of rat Peripheral Blood Monocytes Following Oral Administration of Curcumin.** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 25(3): 171-82.

***Corresponding author: Tel: 04431942122, email: sh.khezri@urmia.ac.ir**

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 14:23 IRDT on Wednesday August 23rd 2017