



دانشگاه علوم پزشکی شهید

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی

عنوان:

# بررسی اثر عصاره آبی - الکی گیاه زرد چوبه و ماده موثره آن، کورکومین بر عضله صاف نای موش صحرائی و مکانیسم های احتمالی آن

استاد راهنما:

دکتر محمد حسین بسکابادی

استاد مشاور:

دکتر زهرا غلام نژاد

ارائه دهنده:

بهمن امامی

شماره پایان نامه: ۱۰۲۶-آ

شهریور ۱۳۹۵

«حق هرگونه انتشار و بهره برداری از نتایج این پایان نامه برای دانشکده پزشکی مشهد محفوظ است»

## چکیده

مقدمه: زردچوبه، ادویه ای از ریشه گیاه زردچوبه است که به علت خواص ضد پیری، ضد سرطان، ضد آلزایمر، آنتی اکسیدانی، و انواع دیگر خواص دارویی، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. کورکومین، جزء مؤثر زردچوبه، یک مولکول با اثر چند گانه است و دارای خواص ضد التهابی، ضد قند خون، آنتی اکسیدانی، بهبود زخم و فعالیت های ضد میکروبی است.

روش کار: اثر اتساعی چهار غلظت تجمعی عصاره آبی - الکی زردچوبه (۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ mg/ml)، چهار غلظت تجمعی کورکومین (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰  $\mu\text{M}$ ) و چهار غلظت تجمعی تئوفیلین (۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ و ۰/۸ mM) به عنوان شاهد مثبت بر عضله صاف نای منقبض شده توسط ۱۰ میکرومول متاکولین هیدروکلراید یا ۶۰ mM کلراید پتاسیم در دو حالت بافت غیر اینکوبه و بافت اینکوبه شده با پروپرانولول (۱  $\mu\text{M}$ )، دلتیازم (۵  $\mu\text{M}$ )، گلی بن کلامید (۱  $\mu\text{M}$ )، L-NAME (۳۰۰  $\mu\text{M}$ )، آتروپین (۱  $\mu\text{M}$ )، کلرفنیرامین (۱  $\mu\text{M}$ )، ایندومتاسین (۱  $\mu\text{M}$ ) و پاپاورین (۱۰۰  $\mu\text{M}$ ) بررسی گردید.

نتایج: در عضله صاف نای غیر اینکوبه منقبض شده با متاکولین، تئوفیلین و عصاره اثر اتساعی معنی دار و وابسته به غلظت بر عضلات صاف نای نشان دادند ولی کورکومین فقط اثر اتساعی معنی دار و وابسته به غلظت در بافت منقبض شده با کلراید پتاسیم نشان داد ( $p < ۰/۰۰۱$  برای تمام موارد). اثرات اتساعی دو غلظت پایین تر عصاره به طور معنی داری نسبت به تئوفیلین کمتر بود ( $p < ۰/۰۵$ ) تا ( $p < ۰/۰۰۱$ ). اثر اتساعی دو غلظت کمتر عصاره بر انقباض حاصل از متاکولین و اثر غلظت کم آن بر انقباض حاصل از کلراید پتاسیم از غلظت های متناظر تئوفیلین بطور معنی داری کمتر بود ( $p < ۰/۰۵$  تا  $p < ۰/۰۰۱$ ). همچنین اثر اتساعی تمام غلظت های کورکومین بر انقباض حاصل از متاکولین و کلراید پتاسیم بطور معنی دار از اثر غلظت های توفیلین کمتر بود ( $p < ۰/۰۱$  تا  $p < ۰/۰۰۱$ ). اثر اتساعی تمام غلظت های کورکومین بر انقباض حاصل از متاکولین و کلراید پتاسیم بطور معنی دار از اثر غلظت های عصاره کمتر بود ( $p < ۰/۰۵$  تا  $p < ۰/۰۰۱$ ). هیچگونه اختلاف معنی داری در اثر اتساعی عصاره و غلظت ایجاد کننده ۵۰٪ حداکثر پاسخ اتساعی ( $EC_{50}$ ) آن بین گروه غیر اینکوبه و عضله صاف نای اینکوبه شده با مواد مختلف در هر دو حالت عضله منقبض شده توسط متاکولین و کلراید پتاسیم وجود نداشت. اثر اتساعی سه غلظت اول کورکومین در گروه اینکوبه شده توسط آتروپین و همچنین  $EC_{50}$  از اثر اتساعی آنها در بافت غیر اینکوبه بطور معنی داری کمتر بود ( $p < ۰/۰۵$  تا  $p < ۰/۰۰۱$ ).

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان دهنده اثر اتساعی نسبتاً قوی عصاره زرد چوبه بر نای موش صحرایی قابل مقایسه با اثر تئوفیلین است و مکانیسم های بررسی شده (اثر بر گیرنده های بتا آدرنرژیک، موسکارینی، گیرنده های هیستامینی، کانال های کلسیمی و پتاسیمی، اثر ضد التهابی، NO یا فسفودی استراز) مسئول بروز اثر اتساعی آن نیست. اثر اتساعی کورکومین از اثر عصاره و تئوفیلین کمتر بود و اثر آن بر مهار کانالهای کلسیمی و باز کنندگی کانالهای پتاسیمی ممکن است در اثر اتساعی مشاهده شده نقش داشته باشد. نتایج این مطالعه همچنین نشان می دهد که کورکومین بطور نسبی مسئول اثر اتساعی زردچوبه بر عضله صاف نای است.

کلمات کلیدی: زردچوبه، کورکومین، اثر اتساعی، عضله صاف نای، مکانیسم های احتمالی.

## ABSTRACT

**Background:** Turmeric is a spice from the root of *Curcuma longa* (*C. longa*) which has acquired great attention for its anti-aging, anticancer, anti-alzheimer diseases, antioxidant, and a variety of other medicinal properties. Curcumin, the active component of turmeric, is a highly pleiotropic molecule and possesses anti-inflammatory, hypoglycemic, antioxidative, wound-healing and antimicrobial activities.

**Materials and methods:** The relaxant effects of four cumulative concentrations of hydro-ethanolic extract of *C. longa* (6.25, 12.5, 25, 50 mg/ml), curcumin (12.5, 25, 50, 100 mg/ml) or theophylline (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mM) as positive control was studied on precontracted tracheal smooth muscle by methacholine or KCl on non-incubated or incubated with different substance including propranolol, diltiazem, L-NAME, glibenclamide, atropine, chlorpheniramine, indomethacin and papaverine.

**Results:** In non-incubated tracheal smooth muscle, Theophylline and the extract of *C. longa* showed significant and concentration-dependent relaxant effects on both methacholine and KCl induced tracheal smooth muscle contraction but curcumin showed significant relaxant effect only on KCl induce muscle contraction ( $p < 0.001$  for all cases). The relaxant effects of two lower concentrations of the extract on methacholine induced muscle contraction and the relaxant effect of its low concentration on KCl induced contraction were significantly lower than the effect of corresponding concentrations of theophylline ( $p < 0.05$  to  $p < 0.001$ ). The relaxant effects of all concentrations of curcumin on both methacholine and KCl induced contractions were significantly lower than the effects of theophylline ( $p < 0.01$  to  $p < 0.001$ ). In addition the relaxant effect of all concentrations of curcumin on both methacholine and KCl induced muscle contraction were significantly lower than the relaxant effects of the extract ( $p < 0.05$  to  $p < 0.001$ ). There was no significant difference in the relaxant effects and  $EC_{50}$  values of *C. longa* between non-incubated and incubated tissues in both methacholine and KCl induced muscle contraction. The relaxant effects of only three first concentrations of curcumin and their  $EC_{50}$  values in incubated tissue with atropine were significantly lower than their effects on non-incubated condition ( $p < 0.05$  to  $p < 0.001$ ).

**Conclusions:** The results of the present study showed relatively potent relaxant effects of *C. longa* on tracheal smooth muscle, comparable with theophylline at studied concentrations which was not due to different studied mechanisms (effect on  $\beta$ -adrenergic, muscarinic, histamine (H1) receptors, calcium and potassium channels, anti inflammatory effect, No or phosphodiesterase). The relaxant effect of curcumin was lower than the effects of the extract and theophylline which its blocking property on calcium channels or opening of potassium channels may contribute on its relaxant effect. The results also suggest that the relaxant effect of the plant is partially due to its constituent, curcumin.

**Key words:** Curcuma longa, curcumin, relaxant effect, tracheal smooth muscle, possible mechanisms



دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه دکتری تخصصی رشته فیزیولوژی

عنوان:

## بررسی اثر عصاره آویشن شیرازی و کارواکرول بر برخی از سایتوکاین‌های آزاد شده از لنفوسیت‌های موشهای Balb/c مدل حساس شده

استاد راهنما:

دکتر محمد حسین بسکابادی

استاد مشاور:

دکتر سید عبدالرحیم رضایی

دکتر سید محمود حسینی

دکتر محمود محمودی

ارائه دهنده:

مجید کیان مهر

## چکیده

**زمینه:** علاوه بر آثار متعدد دیگر، اثرات تنفسی نیز برای عصاره آویشن و کارواکول ذکر شده است. لذا در این مطالعه اثر عصاره آویشن و ماده موثره آن، کارواکول بر بیان ژن سایتوکاین‌ها در سلولهای طحال موشهای حساس شده به وسیله Real time PCR مورد سنجش قرار گرفت. علاوه بر آن، زیر رده های لنفوسیتی در سلولهای جدا شده طحال موشهای حساس شده به وسیله تکنیک فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

**روش کار:** این مطالعه در دو مرحله انجام شد: ۱- حیوانات درمان شده در طی حساس سازی برای ارزیابی اثر پیشگیری کننده و ۲- تیمار سلولهای طحالی حیوانات حساس شده برای سنجش اثر درمانی گیاه و کارواکول. در مرحله پیشگیرنده، بیان ژنهای  $IFN-\gamma$ ,  $FOXP3$ ,  $IL-4$ ,  $TGF-\beta$  و  $IL-17$  و درصد زیر رده های لنفوسیتی  $Th_1$ ,  $Th_2$ ,  $Th_{17}$  و Treg در گروه شاهد و ۸ گروه حساس شده به اولبومین (مدل حیوانی آسم) مورد ارزیابی قرار گرفت. حیوانات حساس شده، آب آشامیدنی محتوی مواد زیر را در گروه های مختلف دریافت نمودند: آب آشامیدنی به تنهایی (گروه S)، آب آشامیدنی محتوی سه غلظت عصاره (۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آب) در ۳ گروه، آب آشامیدنی محتوی سه غلظت کارواکول (۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آب) در ۳ گروه و دگزامتازون (1mg/kg) نیز برای ۷ روز در طی حساس سازی گاوژ گردید (n=6 برای تمامی گروه ها). در مرحله تیمار، سلولهای طحالی از گروه شاهد و موشهای حساس شده به اولبومین (گروه S) جدا شده و کشت داده شد. سلولهای طحالی گروه S به گروه های غیر تیمار شده، سه گروه تیمار شده با عصاره، سه گروه تیمار شده با کارواکول و یک گروه تیمار شده با دگزامتازون (۱ میکرومول در لیتر) تقسیم شدند.

**نتایج:** در مرحله پیشگیرنده، سلولهای  $Th_2$  و  $Th_{17}$  در حیوانات حساس شده تحت درمان با عصاره و کارواکول در مقایسه با گروه S غیر درمان شده به طور معنی داری کاهش و سلولهای Treg و نسبت  $Th_1/Th_2$  افزایش یافت ( $p<0.001$  برای تمامی موارد). در گروه S درمان شده با دگزامتازون در مقایسه با گروه S درمان نشده سلولهای  $Th_1$ ,  $Th_2$  و  $Th_{17}$  کاهش یافته اما سلولهای Treg افزایش یافت ( $p<0.001$  برای تمامی موارد). در گروه S در مقایسه با گروه شاهد بیان ژنهای  $IFN-\gamma$  و  $FOXP3$  به طور معنی داری کاهش یافته اما بیان ژنهای  $IL-4$  و  $IL-17$  افزایش یافت ( $p<0.001$  برای تمامی موارد). بیان ژنهای  $IFN-\gamma$  و  $FOXP3$  در گروه S درمان شده با عصاره افزایش یافته، اما فقط بیان ژن  $FOXP3$  در گروه درمان شده با کارواکول به طور معنی داری افزایش یافت ( $p<0.05$  تا  $p<0.001$ ). اما بیان ژنهای  $TGF-\beta$  و  $IL-17$  در گروه های درمان شده با عصاره و کارواکول کاهش یافته اما بیان ژن  $IL-4$  فقط در گروه درمان شده با کارواکول کاهش یافت ( $p<0.05$  تا  $p<0.01$ ). درمان با دگزامتازون منجر به کاهش بیان ژنهای  $IL-4$  ( $p<0.05$ )،  $TGF-\beta$  و  $IL-17$  ( $p<0.001$ ) برای هر دو مورد گردید. در مرحله تیمار سلولی، نتایج افزایش بیان ژنهای  $IFN-\gamma$  و  $FOXP3$  و کاهش بیان  $IL-4$ ،  $TGF-\beta$  و  $IL-17$  را در سلولهای تیمار شده با عصاره و کارواکول نشان دادند ( $p<0.05$  تا  $p<0.001$ ). اما فقط بیان ژنهای  $IL-4$  و  $TGF-\beta$  در نتیجه تیمار سلولهای طحالی موشهای حساس شده با دگزامتازون کاهش نشان داد ( $p<0.001$  برای هر دو مورد).

**نتیجه گیری:** این نتایج نشان دادند که عصاره آویشن و ماده موثره آن کارواکول، بیان ژن سایتوکاین های پیش التهابی را کاهش داده اما بیان ژن سایتوکاین های ضد التهابی را در حیوانات حساس شده و سلولهای طحالی تیمار شده افزایش می دهد که نشان دهنده اثرات تنظیم کننده ایمنی درمانی و پیشگیرنده آنها می باشد.

این نتایج احتمالاً نشان دهنده ارزش درمانی اختصاصی تر برای عصاره گیاه آویشن و کارواکول در مقایسه با دگزامتازون در آلرژی، بیماریهای عفونی و ایمنی به وسیله تقویت سایتوکاین های ضد التهابی و سرکوب سایتوکاین های پیش التهابی می باشد.

**کلمات کلیدی:**

## ABSTRACT:

**Background:** Respiratory as well as other effects were shown for *Zataria multiflora* (*Z. multiflora*) and carvacrol. The effect of the *Z. multiflora* extract and its constituent, carvacrol on cytokines genes expression in sensitized mice and splenocytes of asthmatic mice was examined by Real time PCR in this study. In addition, Th cells subpopulation was examined in isolated splenocyte of sensitized mice by flowcytometry.

**Methods:** The study was performed in two phases including; treating animals during sensitization to evaluate prophylactic effect and treating of splenocytes of sensitized animals to examine the therapeutic effect of the plant and carvacrol. In prophylactic phase, IFN- $\gamma$ , FOXP3, IL-4, TGF- $\beta$  and IL-17 gene expression and percent of Th1, Th2, Th17 and Treg were examined in control and 8 groups of sensitized to ovalbumin (animal model of asthma). Sensitized animals were given drinking water containing the following agents in different groups; drinking water alone in one group (group S), drinking water contain three concentrations of extract (200, 400 & 800  $\mu\text{g/ml}$ ) in three groups, drinking water contain three concentrations of carvacrol (75, 150 & 300  $\mu\text{g/ml}$ ) in three groups and dexamethasone (1mg/kg) was gavaged for 7 days during sensitization in another group, (n=6, for all groups). In therapeutic phase, splenocytes were isolated from non sensitized (control) and sensitized mice to ovalbumin (group S) and cultured. Splenocytes of group S were sub-divided to non-treated, three groups treated with the extract, three groups with carvacrol and one group treated with dexamethasone with same concentrations as prophylactic phases (n=6, for each group).

**Results:** In prophylactic phases, Th2 and Th17 subpopulations in sensitized animals treated with the extract and carvacrol were decreased but Treg and Th1/Th2 ratio were increased compared to non-treated S group ( $p<0.001$  for all cases). In treated S group with dexamethasone, Th1, Th2 and Th17 were decreased but Treg was increased compared to non-treated S group ( $p<0.001$  for all cases). Gene expression of IFN- $\gamma$  and FOXP3 were significantly decreased but those of IL-4 and IL-17 genes expression were significantly increased ( $p<0.001$  for all cases) in S compared to control group. Increased gene expression of IFN- $\gamma$  and FOXP3 in treated S groups with the extract but only FOXP3 in treated group with carvacrol were observed ( $p<0.05$  to  $p<0.001$ ). However, IL-17 and TGF- $\beta$  genes expression were decreased in treated groups with both the extract and carvacrol but IL-4 in only treated with carvacrol ( $p<0.05$  to  $p<0.01$ ). Dexamethasone treatment leads to reduction of IL-4 ( $p<0.05$ ), IL-17 and TGF- $\beta$  ( $p<0.001$  for both cases). In therapeutic phase, the results indicated increase in IFN- $\gamma$  and FOXP3 but decrease of TGF- $\beta$ , IL-4 and IL-17 genes expression in splenocytes of sensitized animals treated with the extract and carvacrol ( $p<0.05$  to  $p<0.001$ ). However, only IL-4 and TGF- $\beta$  genes expression were significantly decreased due to dexamethasone treatment in splenocytes of sensitized mice ( $p<0.001$  for both cases).

**Conclusion:** These results showed that the extract of *Z. multiflora* and its constituent carvacrol, decreased pro-inflammatory, IL-4, TGF- $\beta$  and IL-17 but increased anti-inflammatory cytokines, IFN- $\gamma$  and FOXP3 genes expression in sensitized animals during sensitization period and splenocytes of sensitized mice which indicated both prophylactic and therapeutic immunoregulatory effects. These results may indicate the more specific therapeutic value for the extract of the plant and carvacrol compared to dexamethasone in allergy, autoimmunity and infectious diseases by both potentiating anti-inflammatory and suppressing pro-inflammatory cytokines.

**Keywords:** *Zataria multiflora*, Carvacrol, Gene expression, Cytokines, Real time PCR, flowcytometry, Splenocyte, Asthma.



دانشگاه علوم پزشکی مشهد

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی

عنوان:

# بررسی اثر عصاره آبی - الکلی گیاه خرفه بر گیرنده های موسکارینی و بتا آدرنرژیک زنجیره تراشه خوکچه هندی

استاد راهنما:

دکتر محمد حسین بسکابادی

ارائه دهنده:

میلاذ هاشم زهی

شماره پایان نامه: ۶۱۹/آ

شهریور ۱۳۹۳

«حق هرگونه انتشار و بهره برداری از نتایج این پایان نامه برای دانشکده پزشکی مشهد محفوظ است»

## چکیده

مقدمه: در طب سنتی گیاه خرفه برای اهداف درمانی مختلفی مورد استفاده قرار می گرفته. اثرات شل کنندگی گیاه بر عضله صاف در مطالعات قبلی نشان داده شده است.

لذا در مطالعه حاضر اثرات عصاره گیاه خرفه روی گیرنده های موسکارینی و آدرنرژیک به عنوان مکانیسم های دخیل در شل شدن عضله صاف مجاری تنفسی مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: در بخش اول این مطالعه اثرات سه غلظت عصاره آبی-الکلی گیاه خرفه ( ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در هر میلی لیتر) و ۱۰ نانومول آتروپین و نرمال سالین در سه گروه: بافت غیر اینکوبه (n=۶) ، بافت اینکوبه با پروپرانولول و کلرفنیرآمین (n=۶) و بافت اینکوبه با پروپرانولول (n=۷) بر منحنی غلظت پاسخ متاکولین در عضله صاف نای جهت بررسی اثر گیاه بر گیرنده های موسکارینی مورد بررسی قرار گرفت. در بخش دیگر این مطالعه اثر سه غلظت دیگر عصاره گیاه خرفه ( ۰/۰۶، ۰/۱۲ و ۰/۲۵ میلی گرم در هر میلی لیتر) و ۱۰ نانومول پروپرانولول و نرمال سالین در دو گروه: غیر اینکوبه (n=۷) و اینکوبه با کلرفنیرآمین (n=۵) بر منحنی غلظت پاسخ ایزوپرنالین در عضله صاف نای جهت بررسی اثر بر گیرنده های آدرنرژیک بررسی شد. در هر دو بخش غلظت ایجاد کننده ۵۰٪ پاسخ و حداکثر پاسخ به متاکولین اندازه گیری شد. همچنین شیب منحنی غلظت پاسخ و نسبت غلظتی (CR-1) جهت بررسی اثر آنتاگونیستی رقابتی نیز اندازه گیری شدند.

نتایج: در بخش مربوط به گیرنده های موسکارینی نمودار غلظت پاسخ متاکولین در حضور سه غلظت عصاره و آتروپین انحراف به سمت راست قابل ملاحظه ای را نسبت به نمودار سالین در هر سه گروه نشان می دهد. EC<sub>50</sub> بدست آمده در حضور آتروپین، غلظت متوسط و غلظت بالای عصاره در هر سه گروه و همچنین غلظت پایین عصاره در گروه سوم بطور معنی داری بیشتر از سالین بود ( p<۰/۰۵ تا p<۰/۰۰۱). (CR-1) بدست آمده در حضور هر سه غلظت عصاره در سه گروه بطور معنی داری کمتر از آتروپین بود ( p<۰/۰۵ تا p<۰/۰۰۱).

نتایج حاصل از اثر تحریکی عصاره بر گیرنده های آدرنرژیک نشان دهنده انحراف به چپ نمودار غلظت پاسخ ایزوپرنالین در حضور دو غلظت بالای عصاره در گروه اول و هر سه غلظت در گروه دوم بود در حالیکه نمودار مربوط به پروپرانولول انحراف به سمت راست قابل ملاحظه ای را نسبت به سالین در هر دو گروه نشان می دهد.

EC<sub>50</sub> متاکولین بدست آمده در حضور پروپرانولول در گروه اول (غیراینکوبه) بطور معنی داری بیشتر از EC<sub>50</sub> مربوط به متاکولین در حضور سالین بود (p<۰/۰۵) اما EC<sub>50</sub> مربوط به غلظت های متوسط و بالای عصاره در گروه دوم (اینکوبه) با کلرفنیرآمین) بطور معنی داری کمتر از EC<sub>50</sub> مربوط به متاکولین در حضور سالین بود ( p<۰/۰۰۵) علاوه بر این EC<sub>50</sub> متاکولین در حضور به سالین ، پروپرانولول و غلظت های مختلف عصاره در گروه اول بطور معنی داری کمتر از EC<sub>50</sub> مربوط به گروه دوم مورد مطالعه بود ( p<۰/۰۰۱ تا p<۰/۰۰۵). (CR-1) مربوط به دو غلظت بالای عصاره در گروه اول و هر سه غلظت عصاره در گروه دوم منفی و بطور معنی داری کمتر از پروپرانولول بود ( p<۰/۰۰۱ تا p<۰/۰۰۵).

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه پیشنهادکننده اثر مهارگی گیاه خرفه بر گیرنده های موسکارینی و یا اثر تحریکی آن بر گیرنده های آدرنرژیک می باشد. و پیشنهاد می کند که اثر گیاه بر گیرنده های هیستامینی هم مورد بررسی قرار گیرد.

واژگان کلیدی: گیاه خرفه، عصاره آبی-الکلی، گیرنده های موسکارینی ، گیرنده های آدرنرژیک و نای کوچک هندی



## ABSTRACT:

**Background:** In traditional medicine, *Portulaca olerace* (*P. olerace*) has been used for different therapeutic purposes. The relaxant effect of this plant on smooth muscles has also been shown previously. The present study was undertaken to investigate the effects of the *P. olerace* on muscarinic and adrenoceptors of tracheal smooth muscle, as possible mechanisms responsible for the relaxant effect of the plant.

**Methods:** In this study the effects of three cumulative concentrations of aqueous-ethanolic extract (0.25, 0.50 and 1.00 mg/ml), 10 nM atropine, and saline on muscarinic receptors were tested in; non incubated tracheal smooth muscle (group 1, n=6), incubated tissues with propranolol and chlorpheniramine (group 2, n=6) and incubated tissues with propranolol (group 3, n=7). In other part of this study the effect of three concentrations of aqueous-ethanolic extract, 10 nM propranolol, and saline on  $\beta$ -adrenoceptor was tested in nonincubated tracheal smooth muscle (group 1, n=7) and the ones incubated with chlorpheniramine (group 2, n=5). Concentration response curve to isoprenaline was obtained in pre-contracted tracheal smooth muscle in the presence of the extract, propranolol and saline. Values of  $EC_{50}$  (the effective concentration of isoprenaline, causing 50% of maximum response) and CR-1 ( $(EC_{50}$  obtained in the presence of active substances/ $EC_{50}$  obtained in the presence of saline) -1) were measured.

**Results:** Cumulative log concentration-response curves to methacholine obtained in the presence of concentration of the extract and atropine showed clear rightward shift compared to the curves in the presence of saline in all groups. The values of  $EC_{50}$  methacholine obtained in the presence of atropine, medium and highest extract concentrations in all groups and its low concentration in group 3 were significantly higher than that of saline ( $p < 0.05$  to  $p < 0.001$ ). The values of (CR-1) obtained in the presence of all extract concentrations in three groups were significantly lower than that of atropine ( $p < 0.05$  to  $p < 0.001$ ). Cumulative log concentration-response curves to isoprenaline obtained in the presence of two higher concentrations of the extract in group 1 and all three concentration in group 2 showed small leftward shift while the curve of propranolol showed clear rightward shift compared to isoprenaline curves produced in the presence of saline in both groups 1 and 2.  $EC_{50}$  obtained in the presence of propranolol was significantly higher than that of saline in 1 groups of experiments ( $p < 0.05$ ). The  $EC_{50}$  obtained in the presence of two higher concentrations of the extract in group 2 were significantly lower than those of saline ( $p < 0.05$ ). The values of (CR-1) obtained in the presence of medium and high concentrations of the extract in group 1 and all concentrations were negative and significantly different with that of propranolol in 2 groups ( $p < 0.05$  to  $p < 0.001$ ).

**Conclusion:** The results indicated a small stimulatory effect of the extract from *P. olerace* on  $\beta_2$ -adrenoceptors and inhibitory effect for the extract on muscarinic receptors. A small inhibitory effect on histamine receptors ( $H_1$ ) was also suggested for the extract.

**Key words:** *Portulaca olerace*, Hydroalcoholic extract, muscarinic receptor,  $\beta$ -adrenoceptor, Guinea pig Trachea



دانشگاه علوم پزشکی شهید  
دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی پزشکی

عنوان:

بررسی اثر عصاره آبی- الکی آویشن شیرازی و کارواکرول بر پاسخ دهی مجاری تنفسی، تعداد و انواع گلبولهای سفید، میانجی های التهابی، سیتوکین ها و تغییرات آسیب ریه در خو کچه هندی مدل بیماری مزمن انسدادی ریه

استاد راهنما:

دکتر محمد حسین بسکابادی

نگارنده:

لیلا غلامی مهتاج

آ-۴۸۱

پایان نامه:

شماره

آبانماه ۱۳۹۲

«حق هرگونه انتشار و بهره برداری از نتایج این پایان نامه برای دانشکده پزشکی مشهد محفوظ است»

## چکیده

**زمینه:** اثرات مختلف فارماکولوژیک برای گیاه آویشن و یکی از اجزاء اصلی آن کارواکروول از جمله اثر ضداسپاسمی، اثر مهاری بر گیرنده های موسکارینی و هیستامینی و اثر تحریکی بر گیرنده های آدرنرژیک بر تراشه جدا شده خوکیچه هندی و اثرات ضدالتهابی ذکر شده است. در این مطالعه اثر این گیاه و یکی از اجزاء آن کارواکروول بر خوکیچه هندی مبتلا به بیماری مزمن انسداد ریه (COPD) مورد بررسی قرار گرفت.

**روش کار:** پاسخدهی زنجیره تراشه خوکیچه هندی، شمارش کل گلبولهای سفید، شمارش افتراقی گلبولهای سفیدخون و لاواژ ریه، اینترلوکین ۸، تیول، MDA، اختلاف وزن، و بالاخره خصوصیات آسیب شناسی ریه در ۹ گروه خوکیچه های هندی (برای هر گروه  $n=6$ ) به شرح زیر بررسی شد: گروه شاهد (C)، گروه COPD، گروه درمان شده با دگزامتازون ( $50 \mu\text{g/ml}$ )، کنترل مثبت، سه گروه درمان شده با سه غلظت عصاره تام آویشن شیرازی ( $0.4$ ،  $0.8$  و  $1.6$  میلی گرم در میلی لیتر)، سه گروه درمان شده با سه غلظت کارواکروول ( $60$ ،  $120$  و  $240$  میکرو گرم در میلی لیتر). ایجاد COPD در حیوانات با استنشاق دود سیگار و درمان از طریق آب آشامیدنی انجام گرفت.

**نتایج:** افزایش پاسخدهی تراشه به متاکولین در خوکیچه های هندی COPD، افزایش تعداد گلبول سفید و ائوزینوفیل درخون و مایع لاواژ و کاهش تعداد نوتروفیل در مایع لاواژ گروه COPD در مقایسه با گروه شاهد مشاهده گردید ( $p<0.05$ ). افزایش معنی دار در میزان اینترلوکین ۸ در خون ( $p<0.01$ ) و در مایع لاواژ ( $p<0.05$ ) گروه COPD نسبت به گروه شاهد وجود داشت. افزایش میزان MDA در خون ( $p<0.01$ ) و کاهش گروه تیول در مایع لاواژ ( $p<0.001$ ) گروه COPD در مقایسه با گروه شاهد مشاهده گردید. کاهش وزن بعد از ۳ ماه استنشاق سیگار در گروه COPD در مقایسه با گروه شاهد مشاهده گردید. ( $p<0.05$ ) نتایج همچنین نشان دهنده افزایش آمفیژم و تخریب آلئوئولی در گروه COPD در مقایسه با گروه شاهد بود ( $p<0.001$ ). اکثر معیارهای اندازه گیری شده در گروههای درمانی دگزامتازون، عصاره و کارواکروول نسبت به گروه COPD بهبود نشان داد ( $P<0.05$  تا  $P<0.001$ ).

اگر چه اثر غلظت کمتر عصاره و کارواکروول از دگزامتازون کمتر بود ولی در اکثر موارد اثر غلظت بالای عصاره و کارواکروول بطور معنی داری بیشتر از دگزامتازون بود ( $P<0.05$  تا  $P<0.01$ )، در بیشتر موارد نیز اثر غلظت بالا و متوسط عصاره و کارواکروول افزایش معنی داری نسبت به غلظت پایین داشت ( $P<0.05$  تا  $P<0.001$ ).

**نتیجه گیری:** این نتایج معرف اثرات پیشگیری کننده انه عصاره آبی الکی آویشن شیرازی و ماده موثر تشکیل دهنده آن کارواکروول در پاسخدهی و التهاب و تغییرات ساختاری بافت ریه خوکیچه های هندی COPD می باشد که قابل مقایسه و حتی بیشتر از اثر دگزامتازون بود. نتایج همچنین نشان می دهد که اثر عصاره گیاه احتمالاً بخاطر اثر جزء کارواکروول آن می باشد. و اثر درمانی غلظت آخر عصاره و کارواکروول از اثر دگزامتازون بیشتر بوده است.

**کلمات کلیدی:**

## ABSTRACT

### **The effect of hydro-ethanolic extract from *Zataria multiflora* Boiss. and carvacrol on airway responsiveness, Total and differential WBC, inflammatory mediators, cytokine level and lung pathology in guinea pig of chronic obstructive pulmonary disease**

**Background:** Different pharmacological effects of *Zataria multiflora* (*Z. multiflora*) and its constituent, carvacrol including relaxant effect, inhibitory effect on muscarine and histamine ( $H_1$ ) and stimulatory effect on  $\beta$ -adrenoceptors have been demonstrated on guinea pig tracheal chains in previous studies. In the present study, the effect of *Z. multiflora* and carvacrol on different parameter such as Tracheal responsiveness (TR), total and differential white blood cells (WBC) count in blood and lung lavage fluid, serum inflammatory mediators levels, serum cytokines levels and lung pathological changes in sensitized guinea pigs were examined.

**Methods:** Tracheal responsiveness, total and differential white blood cells count in blood and lung lavage fluid, serum inflammatory mediators levels, serum cytokines levels and lung pathological changes were examined in control and 8 sensitized guinea pigs groups to smoke cigarette which were given drinking water alone in one group (group S), drinking water contain three concentrations of extract (0.4, 0.8 & 1.6 mg/ml) in three groups, drinking water contain three concentrations of carvacrol (60, 120 & 240  $\mu$ g/ml) in three groups and contain one concentration of dexamethasone (50  $\mu$ g/ml) in another group, (n=6, for all groups).

**Results:** TR to methacoline, total and WBC count and eosinophil & neutrophil in blood and BALF, the level of serum & balf IL-8, serum MDA and emphysema levels were increased in sensitized animals compared to those of controls ( $p < 0.05$  to  $p < 0.001$ ) and balf thiol & weight were decreased. However, all measured parameters in all treated groups were significantly decreased compared to S group ( $p < 0.05$  to  $p < 0.001$ ). Although the effect of low concentration of the extract and carvacrol was lower than the effect of dexamethasone, the effect of their high concentration was significantly greater than the effect of dexamethasone ( $p < 0.05$  to  $p < 0.01$ ). The effects of higher concentration of the extract and carvacrol and in some cases the effect of medium concentration were significantly greater than low concentration ( $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ ).

**Conclusion:** These results showed preventive effect of the extract of *Z. multiflora* and its constituent, carvacrol on all measured parameter in sensitized guinea pigs which was comparable or even more potent than dexamethasone. The results also suggested that the preventive effect of the plant is perhaps due to its constituent carvacrol.

**Keywords:** *Zataria multiflora*, Carvacrol, inflammatory mediators, airway responsiveness



دانشگاه علوم پزشکی گیلان

دانشکده پزشکی

**پایان نامه جهت اخذ درجه دکتری رشته فیزیولوژی**

عنوان:

**اثر عصاره آبی-الکلی سیاه دانه و تیموکینون بر سیتوکاین های آزاد شده از  
لنفوسیتها و تعادل Th1/Th2 بدنبال بیش تمرینی در رت**

**استاد راهنما:**

دکتر محمد حسین بسکابادی

**اساتید مشاور:**

دکتر سید محمود حسینی

دکتر مجتبی سنکیان

دکتر ابولفضل خواجوی راد

**ارائه دهنده:**

زهرا غلام نژاد

«حق هرگونه انتشار و بهره‌برداری از نتایج این پایان‌نامه برای دانشکده پزشکی مشهد محفوظ است»

## چکیده

**مقدمه:** اثرات شدت‌های مختلف تمرین ورزشی و عصاره آبی‌الکلی سیاه‌دانه بر پاسخ‌های ایمنی ارزیابی شد. **روش کار:** رت‌های نر نژاد ویستار به ۷ گروه شاهد، ورزش متوسط (MT)، بیش‌تمرینی (OT)، بیش‌تمرینی+۲ هفته استراحت (OR)، شاهد+سیاه‌دانه (NC)، ورزش متوسط+سیاه‌دانه (NM) و بیش‌تمرینی+سیاه‌دانه (NO) تقسیم شدند. آزمون عملکرد قبل و در طول تمرینات انجام شد. قبل و در پایان دوره تمرین (زمان‌های بلافاصله، ۲۴ ساعت و ۲ هفته) متغیرهای خونی، لاکتات و نیز کورتیکوسترون و سیتوکاین‌های سرم با الیزا اندازه‌گیری شد. در بخش برون‌تنی تکثیر و ترشح سیتوکاین‌های سلول‌های طحال در حضور و غیاب میتوزن و تیمار با دگزامتازون (۰/۱mM)، غلظت‌های مختلف عصاره (۱۰۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰ μg/ml) و تیموکینون (۱۰، ۵، ۱ μg/ml) بررسی شد.

**نتایج:** در بخش درون‌تنی، بیش‌تمرینی سبب کاهش لکوسیتها و عملکرد شد، اما غلظت لاکتات و کورتیکوسترون در مقایسه با گروه ورزش متوسط افزایش یافت ( $P < 0/05$  تا  $P < 0/001$ ). درمان با سیاه‌دانه سبب کاهش کورتیکوسترون در دو گروه فوق شد، اما میزان هموگلوبین در گروه NO در مقایسه با NC کاهش یافت ( $P < 0/05$ ). بیش‌تمرینی سبب افزایش درازمدت TNFα، IL-6 و IL-10 ( $P < 0/05$  تا  $P < 0/001$ ) اما IL-4 پس از ۲۴ ساعت کاهش یافت و میزان IFNγ و نسبت IFNγ/IL-4 تغییر نکرد. ورزش متوسط سبب افزایش دراز مدت IL-6 و IFNγ و نسبت IFNγ/IL-4 اما کاهش IL-4 گردید. درمان با سیاه‌دانه سبب افزایش مزمن IL-6، TNFα و IL-10 در تمام گروه‌های درمان شده اما کاهش حاد IL-4 و افزایش در نسبت IFNγ/IL-4 گردید ( $P < 0/05$  تا  $P < 0/001$ ). در آزمایشات برون‌تنی نتایج زیر بدست آمد. تحریک سلول‌های طحالی با PHA و ConA سبب افزایش تکثیر سلولی گردید که اثر ConA بیشتر بود و سبب تغییر الگوی سیتوکاینی به Th2 شد. درمان با دگزامتازون در سلول‌های تحریک‌شده و نشده سبب سرکوب تکثیر سلولی، IL-4 اما مهار بیشتر IFNγ گردید ( $P < 0/05$  تا  $P < 0/001$ ). غلظت‌های مختلف سیاه‌دانه (۵۰۰ μg/ml، ۱۰۰۰) و تیموکینون (۱۰، ۵، ۱ μg/ml) اثر مهاری وابسته به غلظتی بر تکثیر سلولی در سلول‌های تحریک‌شده و نشده داشت ( $P < 0/05$  تا  $P < 0/001$ ). تیمار با سیاه‌دانه و تیموکینون اثری بر ترشح IL-4 در سلول‌های تحریک‌شده نداشت اما بیشترین غلظت سیاه‌دانه و دو غلظت بیشتر تیموکینون سبب کاهش ترشح IL-4 توسط سلول‌های تحریک‌شده شدند ( $P < 0/001$ ). در حضور و غیاب میتوزن تیمار با کمترین غلظت سیاه‌دانه اثری بر ترشح IFNγ نداشت اما دو غلظت بیشتر ترشح آنرا کاهش دادند ( $P < 0/05$  تا  $P < 0/001$ ). در سلول‌های تحریک‌شده با ConA تمام غلظت‌های تیموکینون اثر مهاری بر ترشح IFNγ داشتند اما در سلول‌های تحریک‌شده تنها بالاترین غلظت این اثر را داشت ( $P < 0/05$  تا  $P < 0/001$ ). در حضور و غیاب میتوزن کمترین غلظت اثری بر نسبت IFNγ/IL-4 نداشت، غلظت دوم آنرا کم کرده و بالاترین غلظت آنرا افزایش داد ( $P < 0/001$  تا  $P < 0/05$ ). تیموکینون نیز اثر مشابهی داشت بطوریکه کمترین غلظت این نسبت را کاهش داده اما دو غلظت بالاتر آنرا افزایش دادند ( $P < 0/05$  تا  $P < 0/001$ ). در شاخص‌های فوق بین گروه‌های مختلف این تفاوتها دیده شد. در گروه OR تکثیر سلولی در مقایسه با دیگر گروهها در حضور و غیاب میتوزن افزایش یافت

( $P < 0/001$ ). در حضور PHA، نسبت IFN $\gamma$ /IL-4 در گروه MT و OT کمتر و در گروه OR بیشتر از شاهد بود (P < 0/001). در سلولهای تحریک شده با ConA این نسبت در تمام گروهها کمتر از شاهد بود. در گروههای تمرینی، اثر سیتوتوکسیک دگزامتازون، سیاه‌دانه و تیموکینون بیشتر از کنترل بود. نسبت IFN $\gamma$ /IL-4 در سلولهای تیمار شده با آنها در حضور و غیاب PHA بیشتر از سایر گروهها بود. در گروههای MT و OT نسبت IFN $\gamma$ /IL-4 سلولهایطحالی تحریک شده با ConA که با بالاترین غلظتهای سیاه‌دانه و تیموکینون تیمار شده بودند نسبت به گروه شاهد و OR کاهش داشت. بین گروههای درمان شده و گروههای درمان نشده متناظر در شاخصهای مختلف تفاوتی نبود.

**نتیجه‌گیری:** بیش تمرینی سبب ایجاد عدم تعادل مزمن در سیستم Th1/Th2 و گرایش به Th2 شده اما ورزش متوسط سبب افزایش پاسخ سلولهای Th1 گردید. درمان با سیاه‌دانه این عدم تعادل را بطور کامل اصلاح نکرد. غلظتهای مختلف سیاه‌دانه و تیموکینون اثرات وابسته به غلظت سیتوتوکسیک بر هر دو رده سلولهای Th1 و Th2 داشتند. کمترین غلظت سبب تغییر تعادل به Th2 درحالیکه غلظتهای بیشتر اثر عکس داشتند.

**کلمات کلیدی:** ورزش متوسط، بیش‌تمرینی، تعادل Th1/Th2، سیاه‌دانه، تیموکینون، سلولهایطحالی

## Abstract

**Background:** The impact of different exercise intensity and *Nigella sativa* (*N.Sativa*) hydro-alcoholic extract treatment on immune responses was investigated.

**Method:** Male wistar rat were divided to 7 groups: sedentary control, moderate training (MT), overtraining (OT), overtraining+2W recovery (OR); control+ *N.Sativa* (NC), MT+*N.Sativa* (NM) and OT+*N.Sativa* (NO). Performance test were made before and during training. Before and at the end of training period at different time hematological factors, lactate; and also corticosterone and serum cytokine were measured. In other sets of experiments splenocyte proliferation and cytokine secretion were measured in non activated and non-activated cells by mitogens, treated with dexamethasone (0.1 mM), different *N.Sativa* (100, 500, 1000 mg/ml) and thymoquinone (1, 5, 10 mg/ml) concentrations.

**Results:** In vivo results showed that: Overtraining caused performance and leucocytes decline but lactate and corticosterone increment vs. moderate training ( $p<0.05$ - $p<0.001$ ). *N.Sativa* improved corticosterone in both groups ( $p<0.05$ ), but Hb decreased in NO vs. NC group. Overtraining induced longtime IL-6, TNF $\alpha$  and IL-10 increment ( $p<0.05$ - $P<0.001$ ) but IL-4 decrement after 24h with no change in IFN $\gamma$  concentration and IFN $\gamma$ /IL-4 ratio. Moderate exercise induced longtime IL-6, IFN $\gamma$  and IFN $\gamma$ /IL-4 increment but IL-4 decrement ( $p<0.05$ - $P<0.001$ ). *N.Sativa* treatment induced chronic IL-6, TNF $\alpha$ , IL-10 increment in all groups but acute decrease in IL-4 and increase in IFN $\gamma$ /IL-4 ratio ( $p<0.05$ - $P<0.001$ ). In vitro experiments showed that: splenocyte activation with PHA and ConA increases cell viability and proliferation. ConA effect was dominant and changed cytokine profile toward Th2 balance ( $p<0.05$ - $P<0.001$ ). Dexamethasone treatment in non-activated and activated splenocyte suppressed proliferation, viability, IFN $\gamma$  and IL-4 secretion with more IFN $\gamma$  inhibition ( $p<0.05$ - $P<0.001$ ). Different concentrations of *N.Sativa* (500 and 1000 mg/ml) and thymoquinone (1, 5, 10 mg/ml) showed concentration dependent inhibitory effect on viability and proliferation of activated and non-activated splenocyte ( $p<0.05$ - $P<0.001$ ). They had no effect on IL-4 secretion in non-activated cells, but higher concentration of *N.sativa* (1000 mg/ml) and thymoquinone (5 and 10 mg/ml) reduced IL-4 secretion in activated cells ( $P<0.001$ ). In activated and non-activated cells the lowest concentration of *N.sativa* had no effect on IFN $\gamma$  secretion but two higher concentrations decreased IFN $\gamma$  secretion in both situations ( $p<0.05$ - $P<0.001$ ). In ConA activated cells all concentrations of thymoquinone had inhibitory effect on IFN $\gamma$  secretion but in non-activated cells just highest concentration had this effect ( $p<0.05$ - $P<0.001$ ). Lowest concentration of *N.sativa* had no effect on IFN $\gamma$ /IL-4 ratio, its second concentration decreased it, but highest concentration increased it in both activated and non-activated cells ( $p<0.05$ - $P<0.001$ ). Thymoquinone had similar effect and first concentration decreased it but two highest concentration increased this ration in just activated cells ( $p<0.05$ - $P<0.001$ ). Exercise caused variation in splenocyte response. In OR groups splenocyte proliferation increased vs. others in both activated and non-activated cells ( $P<0.001$ ). In presence of PHA, INF $\gamma$ /IL-4 ratio was lower in OT and MT groups than control but it was higher in OR group than control ( $P<0.001$ ). In ConA activated cells this ratio was lower in all groups than control ( $P<0.001$ ). In exercised groups cytotoxic effect of



dexamethasone, *N.sativa* and thymoquinone was more than control. INF $\gamma$ /IL-4 ratio in OR splenocyte treated with those substances in presence of PHA and absence of mitogen was higher than other groups. In presence of ConA, MT and OT splenocyte treated with highest concentration of *N.sativa* and thymoquinone decreased INF $\gamma$ /IL-4 ratio vs. control and OR groups. There were no significant differences between those parameter in those treated and non-treated groups.

**Conclusion:** Overtraining caused chronic imbalance in Th1/Th2 system toward Th2 but moderate exercise induced Th1 shift. *N.sativa* treatment did not improve these imbalances after overtraining. *N.sativa* and thymoquinone showed cytotoxic effect on these subtypes concentration dependently. Low concentrations were in favor of Th2 and high concentrations had opposite effect.

**Keywords:** Moderate training, Overtraining, Th1/Th2 balance, *Nigella sativa*, Thymoquinone, Splenocyte