بررسی اثر پودر سیاه دانه بر افزایش بیگانه خواری مونوسیت ها در خوکچه ی هندی

نوروز دلیرژ[1] - احمد مرشدی[2] - سید شمس الدین اطهاری[3]

چکیده

زمینه و هدف: در اکثر عفونت ها و بیماری ها، برای بهبود بیماری و کاهش شدت آن، تحریک و افزایش قدرت دفاعی سیستم ایمنی ضروری می باشد. سیاه دانه گیاهی است که برای درمان تعداد زیادی از بیماری ها استفاده شده است. در این تحقیق برای بررسی اثر آن بر روی تقویت بیگانه خواری مونوسیت ها مورد استفاده قرار گرفت تا کاربرد و مکانیسم استفاده از این گیاه برای تقویت بیگانه خواری سلول های اصلی سیستم ایمنی ذاتی بدن مشخص گردد.

روش تحقیق: بدین منظور 21 قطعه خوکچه هندی نر در طول 3 هفته و در سه گروه شاهد بدون دریافت سیاه دانه، تیمار با دوز 6/25 درصد خوراکی و تیمار با دوز 12/5 درصد خوراکی با پودر سیاه دانه تغذیه شدند. سپس در پایان هر هفته از هر گروه خون گیری به عمل آمده و سلول های تک هسته ای خون محیطی از خون هپارینه به روش فایکول های پک جدا شده و سه آزمون احیای نیتروبلوتترازولیوم، فاگوسیتوز با مخمر و فاگوسیتوز با لاتکس بید فلوئوروسانس بر روی آن انجام گرفت.

یافته ها: نتایج به دست آمده از آزمایش های مذکور نشان دهنده ی افزایش معنی داری در بیگانه خواری مونوسیت ها بود ($p<0/05$).

نتیجه گیری: استفاده از سیاه دانه همراه با غذا موجب افزایش بیگانه خواری تک هسته ای ها گردیده و فعالیت بیگانه خواری آن ها را برای بلع مواد و ذرات خارجی و پاتوژن ها افزایش می دهد. بنابراین از این ماده می توان برای مقابله با پاتوژن ها از طریق فعال سازی مسیر مونوسیت- ماکروفاژ که رابط سیستم ایمنی ذاتی و آداپتیو می باشد، بهره برد.

کلید واژه ها: بیگانه خواری؛ سیاه دانه؛ مونونوکلئرهای خون محیطی

افق دانش؛ فصلنامه ی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گناباد (دوره ی 16؛ شماره ی 3؛ پاییز سال 1389)

دریافت: 1389/2/4 اصلاح نهایی: 1389/8/22 پذیرش: 1389/9/17

1- استادیار ایمنی شناسی، دانشکده ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

2- دانشیار ایمنی شناسی، دانشکده ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

3- **نویسنده ی مسؤول؛** دکتری دامپزشکی، عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز

آدرس: آذربایجان شرقی- دانشگاه آزاد اسلامی- واحد تبریز- باشگاه پژوهشگران جوان

تلفن: 09143044606 **نمابر:** 0441-2771924 **پست الکترونیکی:** ss.athari@gmail.com

مقدمه

تمامی جانوران باید در مقابل بیماری هایی که به وسیله میکرو ارگانیسم های بیماری زا و عوامل داخلی ایجاد می گردند از خود دفاع نمایند. سیستم ایمنی در برگیرنده مکانیسم های دفاعی بدن بوده و روش های تحریک این سیستم دفاعی به منظور کاهش خطر بیماری ها ضروری به نظر می رسد. برای رسیدن به این هدف یکی از مواد مورد استفاده، داروهای گیاهی است که سیاه دانه یکی از آن ها می باشد و به طور خلاصه مکانیسم اثر آن افزایش بیگانه خواری است و چون بیگانه خواری نخستین مرحله ی برخورد و مقابله بدن با هر آنتی ژنی است، اولین عملی که در ارتباط با ایمنی بدن به وقوع می پیوندد عبارتست از به دام اندازی و نابود کردن هر ماده خارجی که وارد بدن می شود (1,2).

سیاه دانه یک گیاه علفی بومی است که متعلق به خانواده ی Buttercup یا Ranunculaceae است که به عنوان ادویه ی غذایی و نیز برای اهداف درمانی و به عنوان درمانی طبیعی برای تعدادی از عوارض و بیماری ها استفاده شده است (3). دانه ی این گیاه دارای اسانس، قندهای مختلف، مواد صمغی، آلبومینوئیدی و یک ساپونوئید به نام ملانتین است. همچنین دارای لیپیدهای غیر فرار، پروتئین ها، آلکالوئیدها و لیپیدهای ضروری می باشد (4).

نشان داده شده است که روغن غیر فرار سیاه دانه و تیموکینون اثر آنتی اکسیدانی دارد (5,6). این ویژگی آنتی اکسیدانی سیاه دانه، اثر آنرا علیه آسیب کبدی ناشی از تترا کلرید کربن، فیبروز و سیروز کبدی و آسیب کبدی ایجاد شده توسط عفونت با شیستوزوما مانسونی بیان می کند (3,7).

اثر ضد باکتریایی قسمت فنولی روغن سیاه دانه اولین بار به وسیله توپوزادا و همکاران گزارش شده است (8) و مدتی بعد تیموهیدروکینون از روغن فرار سیاه دانه جدا شد و اثر قوی آن بر علیه میکرو ارگانیسم های گرم مثبت مشخص گردید (9). با اشاره به اثر آن بر سیستم ایمنی، گزارش گردید که سیاه دانه موجب افزایش نسبت لنفوسیت های T کمکی به لنفوسیت های T سرکوب کننده و افزایش فعالیت سلول های کشنده ی طبیعی می شود. مشاهده شد که سیاه دانه میزان اینترلوکین-1 را افزایش می دهد. لذا پیشنهاد می شود که سیاه دانه دارای اثر بر روی ماکروفاژها نیز می باشد (10).

پروتئین های موجود در دانه های سیاه دانه خالص سازی شد و مشخص گردید که برخی از پروتئین ها خواص سرکوب کنندگی و برخی دیگر از آنها خواص تحریک کنندگی را در کشت های سلولی لنفوسیتی دارا می باشند (11). به نظر می رسد در عصاره ی دانه، ترکیبات آن سمیت بسیار کمی بر سیستم بیولوژی داشته باشند (12). تحریک سیستم ایمنی برای افزایش کارایی آن در برابر انواع بیماری ها همواره مورد توجه بوده است. لذا ما بر آن شدیم تا تأثیر این گیاه دارویی را بر افزایش بیگانه خواری سلول های اصلی سیستم ایمنی ذاتی بدن (سلول های بیگانه خوار تک هسته ای) بدن مورد بررسی قرار دهیم. این مطالعه از نوع کاربردی بوده که در بخش ایمنی شناسی دانشکده ی دامپزشکی دانشگاه ارومیه در سال 1388 انجام شده است.

روش تحقیق

در این پژوهش از لاتکس بید فلوئوروسانس و مخمر ساکارومایسس سرویسیه به عنوان آنتی ژن استفاده شد و از طریق سنجش درصد فاگوسیتوز آن ها به بررسی میزان فاگوسیتوز مونوسیت ها پرداخته شد. تست دیگر مورد استفاده در این تحقیق، آزمون احیای نیتروبلوتترازولیوم بود.

21 قطعه خوکچه ی هندی نر 5-4 ماهه که سالم و نرمال بودند و به لحاظ وزنی اختلاف معنی داری با هم نداشتند به طور تصادفی به 3 گروه تقسیم شدند (انتخاب جنس نر به دلیل جلوگیری از تأثیر هورمون های استروسی و مادگی بر بررسی می باشد).

گروه1: دریافت روزانه یک دوز 6/25 درصد (13) پودر سیاه دانه همراه با ماده ی غذایی به صورت خوراکی.

گروه2: دریافت روزانه دو دوز پودر سیاه دانه به صورت خوراکی یعنی 12/5درصد پودر سیاه دانه همراه با ماده ی غذایی.

گروه3: شاهد (به گروه شاهد ماده ی غذایی بدون سیاه دانه خورانده شد).

پس از خریداری سیاه دانه و اطمینان از سلامت ظاهری و تأیید علمی، دانه های سالم آن جدا و پس از آسیاب نمودن، پودر به دست آمده با یک نسبت وزنی 6/25 درصد و 12/5 درصد با غذای پودر شده و استاندارد خوکچه هندی مخلوط و مجدد غذای پلیت تولید گردید (13,14).

مدت بررسی مطالعه به صورت سه دوره ی 7 روزه در نظر گرفته شد، به این صورت که 21 روز پودر سیاه دانه خورانده شد.

در طی 21 روز که سیاه دانه تجویز شد، 3 بار خونگیری انجام شد. به این صورت که پس از هر 7 روز از هر 3 گروه 2 خوکچه به طور تصادفی انتخاب و این خوکچه ها را از سایرین جدا کرده که به مدت 12 تا 18 ساعت ناشتا نگه داشته شدند. سپس این خوکچه ها به آزمایشگاه ایمنی شناسی منتقل و از قلب هر خوکچه 5 سی سی خون گرفته شد. برای انجام این مراحل ابتدا جدا سازی سلول های تک هسته ای خون محیطی به صورت زیر انجام شد (15).

0/8 میلی لیتر هپارین به هر فالکون تیوپ در نظر گرفته شده برای هر گروه، اضافه شد. خون و هپارین مخلوط گردید. محیط کشت (به میزان هم حجم با خون) اضافه گردید. 2 میلی لیتر فایکول های پک به داخل فالکون تیوپ های خالی ریخته شد. 4 میلی لیتر خون حاوی محیط کشت به آهستگی به فایکول اضافه شد به نحوی که دو فاز کاملاً جدا، مشخص گردید. با 2000 دور در هر دقیقه به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شد. لایه ی حاوی محیط کشت به کمک پیپت پاستور جدا شد و به لوله ی فالکون استریل انتقال داده شد. مقداری محیط کشت به فالکون تیوپ ها اضافه و لوله ها با دور 1500 دور در هر دقیقه به مدت 5 دقیقه به منظور شستشوی محیط کشت سانتریفیوژ شد؛ سپس مایع رویی دور ریخته شد (تنها کمی محیط کشت را داخل فالکون ها نگه داشته، فالکون را تکان داده تا سوسپانسیون سلولی ایجاد شود). 5 لاندا (5 میکرولیتر) رنگ تریپان بلو و 5 لاندا سوسپانسیون سلولی در یکی از چاهک های میکروپلیت مخلوط نموده، سپس 2 لاندا از این ترکیب جهت شمارش سلولی بر روی لام نئوبار انتقال داده شد. شمارش سلولی و بررسی میزان زنده بودن سلول ها انجام گرفت. تست احیای نیتروبلوتترازولیوم به صورت زیر انجام گرفت: 15 میکرولیتر سوسپانسیون سلولی (که مرحله بیگانه خواری با مخمر را انجام داده اند) با تراکم (2×10^7 cell/ml) همراه با 15 میکرولیتر محیط کشت حاوی نیتروبلوتترازولیوم (6876 Sigma, N) و زیموزان (4250Sigma, Z) با هم در داخل یک میکروتیوپ مخلوط شدند. یک ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد انکوبه گردید. 400 میکرولیتر ماده N و N- دی متیل فورمایـد (2265 Merck, Germany. UN) اضافه شد. سانتریفیوژ با دور 3000g به مدت 10 دقیقه در دمای 4 درجه ی سانتی گراد انجام شد. دانسیته ی نوری (OD) 200 میکرولیتر از محلول رویی در طول موج 540 نانومتر با دستگاه الایزا ریدر (Denley, USA) قرائت گردید (11,16,18,19).

روش انجام مراحل فاگوسیتوز با مخمر (4): ابتدا دو عدد لامل داخل پتری دیش قرار داده شد و پس از پوشاندن پلیت با فویل آلومینیومی به مدت 20 دقیقه در دمای 121 درجه سانتیگراد استریل شد. سپس از سوسپانسیون سلول های تک هسته ای خون محیطی با تراکم 1×10^6 سلول در هر میلی لیتر محیط RPMI، 1 میلی لیتر وارد پلیت گردید. به آرامی پلیت را تکان داده تا سلول ها روی لامل منتقل شوند. به مدت 2 ساعت در دمای 37 درجه ی سانتی گراد و 5 درصد دی اکسید کربن انکوبه گردید. لامل ها سه مرتبه با محیط کشت RPMI با دمای 37 درجه ی سانتی گراد شستشو داده شد تا سلول های متصل نشده حذف شوند. سپس دوباره لامل ها به پلیت برگردانده شد و در آخر 1 میلی لیتر محیط RPMI را به پلیت افزوده و تا هنگام آماده شدن سوسپانسیون مخمر در فضای 5 درصد دی اکسید کربن انکوبه گردید.

الف) نحوه ی آماده کردن سوسپانسیون مخمر: حدوداً 0/22 گرم مخمر به 24 میلی لیتر بافر فسفات سالین (PBS) اضافه شد. سه مرتبه سوسپانسیون با حجم برابر محلول هنگس (HBSS) به مدت 15 دقیقه با سرعت 1500 دور در هر دقیقه شستشو داده شد. تراکم مخمر به 10^7 سلول در هر میلی لیتر بافر HBSS رسانده شد. 10 میلی لیتر از سوسپانسیون مخمر با سرعت 1500 دور در هر دقیقه به مدت

15 دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل در 10 میلی لیتر محیط RPMI حاوی 10 درصد سرم تازه سوسپانسیون شد. به مدت 30 دقیقه در دمای 37 درجه سانتیگراد انکوبه گردید تا مرحله اپسونیزاسیون صورت گیرد. محیط RPMI حاوی مخمر را به مدت 10 دقیقه با دور 1500 g سانتریفیوژ کرده و رسوب 2 الی 3 بار با HBSS شستشو داده شد. مجدداً رسوب را در محیط RPMI فاقد سرم حل کرده تا تراکم 10^7 سلول در هر یک میلی لیتر به دست آید.

ب) مراحل فاگوسیتوز: ابتدا محیط کشت RPMI داخل پلیت آسپیره شد. یک میلی لیتر سوسپانسیون مخمر را به پتری دیش افزوده و پلیت را تکان داده تا محلول روی لامل ها پخش گردد. اجازه داده شد یکی از لامل ها به مدت 30 دقیقه و دیگری به مدت 60 دقیقه در دمای 37 درجه ی سانتی گراد انکوبه شوند، سپس محلول رویی آسپیره گردید. لامل ها پس از گذشت زمان مربوطه با افزودن 1 میلی لیتر بافر PBS حاوی 10 درصد فرمالین فیکس شدند. سپس لامل های فیکس شده را با روش هماتوکسیلین ائوزین رنگ آمیزی و لامل بر روی لام چسبانده شد.

ج) قرائت نتیجه: در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی 40 برابر حدوداً 5 شان به ازای هر لامل بررسی گردید تا تعداد کل مونوسیت های حاوی مخمر مشخص گردید. هر شان حدوداً حاوی 100-70 مونوسیت بود که برای بررسی بیشتر با بزرگنمایی 100 برابر مشاهده گردید.

روش انجام فاگوسیتوز با لاتکس بید فلوئوروسانس (16,18,19):

الف) مراحل اپسونیزه کردن لاتکس بید فلوئوروسانس: 35 میکرولیتر لاتکس بید فلوئوروسانس (Sigma, L 0905) به یک میلی لیتر محیط RPMI حاوی 20 درصد سرم تازه اضافه شد و سپس یک ساعت در دمای 37 درجه ی سانتی گراد انکوبه گردید و دو بار با HBSS شستشو داده شد و در انتها با 300 میلی لیتر محیط RPMI فاقد سرم سوسپانسیون گردید.

ب) روش انجام بیگانه خواری با لاتکس بید:

300 میلی لیتر PBMC (با تراکم 2×10^6 cell/ml) روی لام قرار داده شد (مانند مراحل قبل لامل در داخل پلیت قرار داده شد و استریل گردید). یک نمونه کنترل منفی نیز به کار برده و به مدت 2 ساعت در دمای 37 درجه ی سانتی گراد انکوبه شد. سپس 3 بار (با RPMI 37 درجه ی سانتی گراد) شستشو داده شد تا سلول های نچسبیده جدا شوند. 300 میکرولیتر لاتکس بید فلوئوروسانس به هر لام اضافه شد (طبق دستورالعمل کارخانه سازنده تهیه گردیده بود). و یک ساعت دیگر در دمای 37 درجه ی سانتی گراد انکوبه گردید. دو بار با هنگس شستشو و 5 دقیقه با اتانول فیکس شد. در انتها در زیر میکروسکوپ فلوئوروسانس لام ها مشاهده شدند.

ج) قرائت نتیجه: در زیر میکروسکوپ فلوئورسانس با بزرگنمایی 40 برابر حدوداً 5 شان به ازاء هر لامل بررسی گردید تا تعداد کل مونوسیت ها و مونوسیت های حاوی لاتکس بید مشخص گردند. هر شان حدوداً حاوی 100-70 مونوسیت بود. سپس با بزرگنمایی 100 برابر تعداد بیدهای بیگانه خواری شده داخل هر سلول شمارش گردید.

در پایان داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ی 9 و با استفاده از آزمون های آماری آنالیز واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

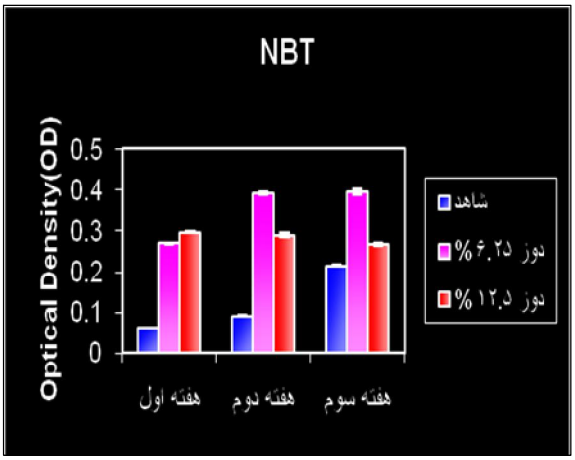
یافته ها

نتایج آزمون احیای نیتروبلوتترازولیوم:

هفت روز اول: در آزمون سنجش بیگانه خواری توسط آزمون احیای نیتروبلوتترازولیوم در گروه اول تیمار با مصرف یک دوز دارو، میانگین OD آن 0/269 و در گروه دوم تیمار با مصرف دو دوز دارو، میانگین OD آن 0/297 به دست آمد، در حالی که میانگین OD گروه شاهد 0/060 به دست آمد.

هفت روز دوم: در آزمون احیای نیتروبلوتترازولیوم در گروه اول تیمار با مصرف یک دوز دارو میانگین OD آن 0/392 و در گروه دوم تیمار با مصرف دو دوز دارو میانگین OD آن 0/290 به دست آمد، در حالی که میانگین OD گروه شاهد 0/090 به دست آمد.

هفت روز سوم: در آزمون احیای نیتروبلوتترازولیوم، میانگین OD گروه اول تیمار 0/395، در گروه دوم تیمار میانگین 0/266 و در گروه شاهد میانگین 0/05 به دست آمد (نمودار1).

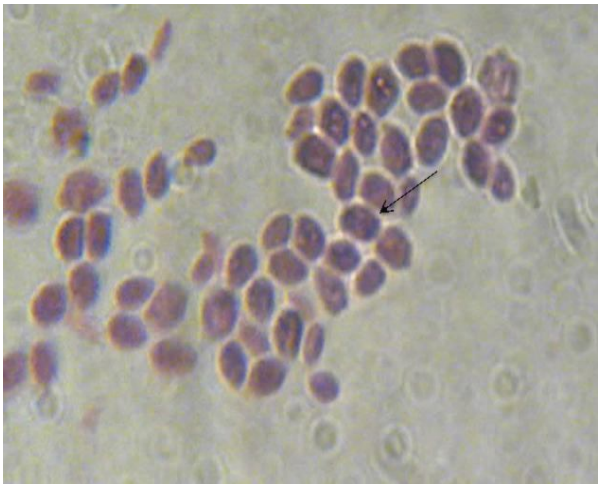


نمودار 1: نتایج احیای نیتروبلوتترازولیوم بر حسب OD ^{nm} 540

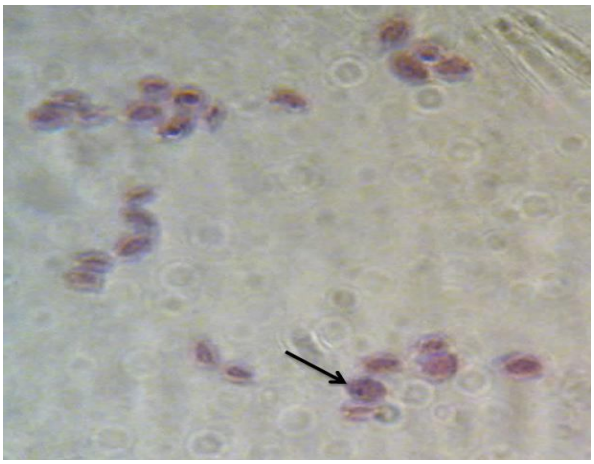
نتایج آزمون بیگانه خواری با مخمر

هفت روز اول: در سنجش بیگانه خواری از طریق آزمون بیگانه خواری با مخمر در گروه اول تیمار که یک دوز دارو دریافت کردند، میانگین بیگانه خواری 40 درصد، در گروه دوم تیمار با دریافت دو دوز دارو، میانگین بیگانه خواری 75 درصد و در گروه شاهد، میانگین بیگانه خواری 4/5 درصد به دست آمد.

هفت روز دوم: در سنجش بیگانه خواری از طریق آزمون بیگانه خواری با مخمر در گروه اول تیمار که یک دوز دارو دریافت کردند، میانگین بیگانه خواری 85 درصد (شکل 1)، در گروه دوم تیمار که دو دوز دارو دریافت کردند، میانگین بیگانه خواری 10 درصد و در گروه شاهد میانگین بیگانه خواری 4 درصد به دست آمد (شکل 2).

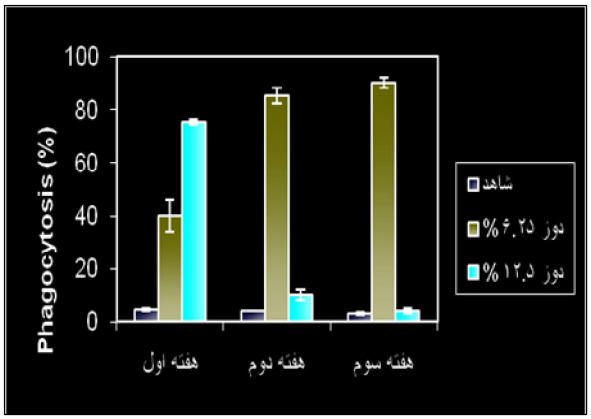


شکل1: بیگانه خواری مخمر توسط فاگوسیت ها در گروه تیمار



شکل2: بیگانه خواری مخمر توسط فاگوسیت ها گروه شاهد

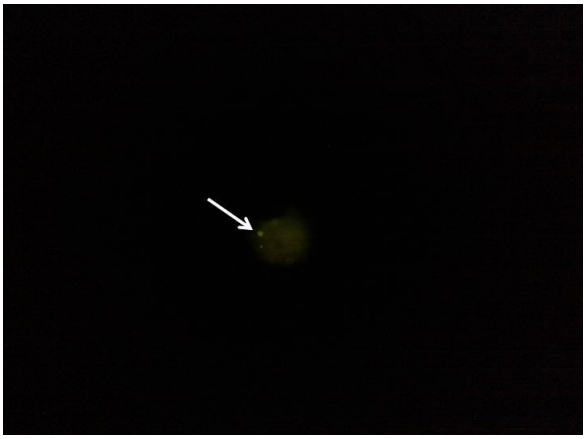
هفت روز سوم: در سنجش بیگانه خواری از طریق آزمون بیگانه خواری با مخمر در گروه اول تیمار میانگین درصد بیگانه خواری 90 درصد، در گروه دوم تیمار 4 درصد و در گروه شاهد 3 درصد به دست آمد (نمودار 2).



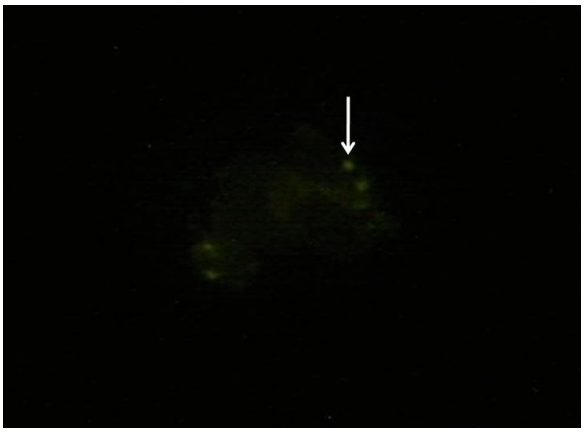
نمودار 2: درصد بیگانه خواری با مخمر ساکارومایسس سرویزی آ

نتایج آزمون بیگانه خواری بالاتکس بید فلوئوروسانس

هفت روز اول: در سنجش بیگانه خواری از طریق آزمون بیگانه خواری با لاتکس بید فلوئوروسانس در گروه اول تیمار که یک دوز دارو دریافت کردند، میانگین بیگانه خواری 45 درصد، گروه دوم تیمار با دریافت دو دوز دارو، میانگین بیگانه خواری 82 درصد و در گروه سوم به عنوان گروه شاهد، میانگین بیگانه خواری 4/5 درصد به دست آمد. هفت روز دوم: در سنجش بیگانه خواری از طریق آزمون بیگانه خواری با لاتکس بید فلوئوروسانس در گروه اول تیمار که یک دوز دارو دریافت کردند، میانگین بیگانه خواری 89 درصد (شکل3)، در گروه دوم تیمار با دریافت دو دوز دارو، میانگین بیگانه خواری 18 درصد و در گروه شاهد میانگین بیگانه خواری 4 درصد به دست آمد (شکل 4).

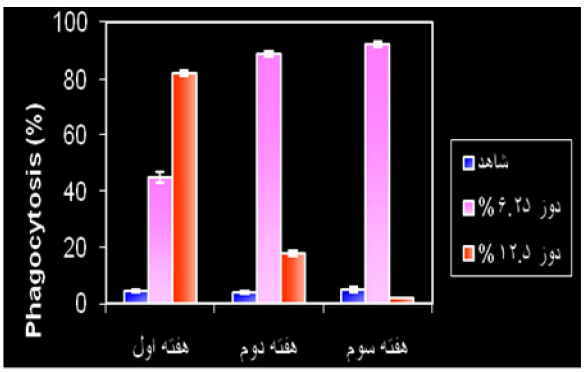


شکل3: بیگانه خواری لاتکس بید گروه شاهد



شکل4: بیگانه خواری لاتکس بید گروه تیمار

هفت روز سوم: در سنجش بیگانه خواری از طریق آزمون بیگانه خواری با لاتکس بید فلوئوروسانس در گروه اول تیمار، میانگین بیگانه خواری 92 درصد، در گروه دوم تیمار، میانگین بیگانه خواری 2 درصد و در گروه شاهد 5 درصد به دست آمد (نمودار 3).



نمودار 3: درصد بیگانه خواری با لاتکس بید فلوئورسانس

با توجه به نتایج، داده های آماری نشان دادند که استفاده از سیاه دانه تأثیر معنی داری بر افزایش بیگانه خواری مونوسیت ها داشته است ($p<0/05$) و بیشترین تأثیر آن استفاده از یک دوز به مدت سه هفته بوده است.

بحث

نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار آماری مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت که نشان دهنده ی افزایش معنی داری در بیگانه خواری مونوسیت ها بود. با توجه به نتایج اخذ شده از این تحقیق، مشاهده گردید که استفاده از سیاه دانه همراه با غذا موجب افزایش بیگانه خواری تک هسته ای ها گردیده و فعالیت بیگانه خواری آنها را برای بلع مواد و ذرات خارجی و پاتوژن های داخلی و خارجی افزایش می دهد. در این تحقیق افزایش در شاخص بیگانه خواری (تعداد ماکروفاژهایی که بیگانه خواری کرده اند) و سرعت بیگانه خواری (تعداد ذرات مخمر و بید بیگانه خواری شده در هر سلول) بررسی شد. تعداد ذرات فاگوسیت شده از 3-1 ذره به 20-4 ذره در هر سلول افزایش نشان می دهد. با توجه به نقش کلیدی این سلول ها به این طریق می توان به طور مستقیم و غیر مستقیم ایمنی سلولی و هومورال را تحریک کرده و بدن را در جهت حذف، نابود سازی و بی خطر کردن عوامل مضر داخلی و خارجی آماده و فعال نمود. در بررسی که در سال 1995 توسط هاک همکارانش بر روی سیاه دانه صورت گرفت، مشاهده شد که این گیاه موجب افزایش پاسخ لنفوسیت ها به سلول های آلوژنیک می شود. همچنین بر روی ماکروفاژها نیز اثر تحریکی مثبت دارد (10).

همچنین کارلتون و همکاران در سال 1986 با بررسی اثر این گیاه بر روی ماکروفاژهای صفاقی، افزایش بیگانه خواری و تعداد لنفوسیت های خون محیطی را مشاهده کردند که با یافته های ما در مورد افزایش بیگانه خواری منطبق بود. در این پژوهش، ما مشاهده کردیم که کاربرد این گیاه موجب افزایش بیگانه خواری در مونوسیت- ماکروفاژها شده که این سلول ها نیز علاوه بر میکروب کشی و از بین بردن این عوامل، پروتئین های حاصل از این بیگانه خواری را

نیز پردازش کرده و در اختیار سیستم ایمنی اکتسابی قرار می دهند تا پاسخ قوی تر و اختصاصی تری صورت پذیرد (2).

این گیاه موجب افزایش لنفوسیت ها و مونوسیت های خون محیطی می شود و ممکن است در دوزهای بسیار بالا اثرات سمی ساپرس کننده ی سیستم ایمنی را نیز داشته باشد (20). همان طوری که ما نیز در دوز بالا (12/5درصد) در مدت زمان طولانی (21 روز) مشاهده نمودیم بیگانه خواری در این رنج کاهش معنی داری را نسبت به بقیه گروه های تیمار داشته است و تغییر محسوسی در میزان فاگوسیتوز در این گروه تیمار نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد. این یافته شاید می تواند با اثر ساپرسی این گیاه بر سیستم ایمنی مرتبط باشد ولی مدرک خاصی جهت اثبات این موضوع در دسترس نمی باشد.

در بررسی هایی که توسط لی یو و همکارانش در سال 1999 و Fararh و همکارانش در سال 2004 و هاک و همکارانش در سال 1995 صورت گرفته، و با توجه به مطالعات پیشین دریافته بودند که با کاهش بیگانه خواری مونوسیت ها، دیابت افزایش می یابد ولی سیاه دانه با تقویت بیگانه خواری مانع دیابت می شود. طبق نمودارهای مطالعه ما نیز این افزایش کاملاً مشهود بود (10,22,23).

سیاه دانه یک داروی با اثرات جانبی خیلی کم می باشد (21). در این تحقیق اثر سمی خاصی در زمان مورد استفاده از این گیاه که موجب بر هم زدن شرایط و وضعیت طبیعی حیوانات شود، مشاهده نگردید. البته این گفته بررسی ها و آزمایش های زیادی را می طلبد و برای نتیجه گیری، بررسی و آنالیز کامل شرایط بدنی حیوان مورد نیاز است.

در سال 1995 هوفتون و همکاران دریافتند که سیاه دانه موجب فعال شدن لکوسیت ها می شود. ال قمدی در سال 2001 و حاج هاشمی و همکاران در سال 2004 و دخاخنی و همکاران در سال 2002 دریافتند که سیاه دانه اثر ضد التهابی خود را با کنترل در کاهش سنتز مواد مسیر لیپو اکسیژناز اعمال کرده و التهاب را مهار می کند (6,12,24).

مش هادیان و رخشنده در سال 2005 و اگروال و همکاران در سال 1979 دریافتند که ساز و کار (مکانیسم) اثر این گیاه می تواند از طریق افزایش بیگانه خواری، بلع، نابودسازی و همچنین عرضه آنتی ژن حاصل از آن به سیستم ایمنی اکتسابی باشد (26). سیاه دانه در پیشگیری از آسیب تتراکلرید کربن بر سلول های کبدی مؤثر واقع می شود (28).

نافذ و همکاران در سال 2009 دریافتند که سیاه دانه با تأثیر بر فاکتورهای خونی موجب تنظیم سیستم ایمنی می شود و اثر مثبت بر روی این سیستم در برابر پاتوژن ها دارد (4). سوامی و تان در سال 2000 در یک بررسی مشاهده کردند که سمیت این گیاه در دوزهای بسیار بالا نمود پیدا می کند (28). در این بررسی بیشترین اثر رضایت بخش این گیاه در دوز 6/25 درصد و در استفاده ی طولانی مدت یعنی به مدت سه هفته مشاهده گردید و کمترین میزان اثر بخشی آن در دوز بالا (12/5درصد) و به مدت طولانی یعنی سه هفته مشاهده شد که البته این اثر می تواند به دلیل بروز اثر ایمونوساپرسیو این گیاه باشد که در دوزهای بالا و مصرف طولانی مدت مشاهده می شود. البته با دوز 6/25 درصد به مدت دو هفته و یا دوز 12/5 درصد به مدت یک هفته نیز نتایج قابل قبولی به دست آمد. می توان در مواقع مورد نیاز از دوز بالا (12/5درصد) در زمان کم (یک هفته) و یا در صورت عدم مشکل بازه زمانی از دوز کمتر (6/25 درصد) در زمان طولانی (سه هفته) برای تحریک سیستم بیگانه خواری تک هسته ای ها بهره برد ولی همان طوری که ذکر گردید بهترین نتیجه و بالاترین درصد بیگانه خواری (92درصد) در دوز 6/25 درصد و به مدت سه هفته مشاهده گردید. نتایج حاصل از هر سه تست این مقدار را بهترین دوز درمانی معرفی می کند.

نتیجه گیری

پژوهش حاضر نشان داد که پودر سیاه دانه می تواند باعث تقویت بیگانه خواری در مونوسیت های خوکچه ی هندی شود و بهترین اثر بخشی دارو موقعی به دست آمد که با دوز پایین (6/25 درصد خوراکی) و در زمان طولانی (21 روز) استفاده گردید که می تواند بهترین و مناسب ترین تأثیر درمانی را داشته باشد. با توجه به اینکه بیگانه خواری اولین و یکی از مهمترین قدم ها در مسیر مقابله با بیماری است و قبل از انجام واکسیناسیون در برخی بیماری ها می توان با تحریک ایمنی

ذاتی موجب افزایش بیگانه خواری و پردازش آنتی ژن و بـه تبـع آن تحریک مؤثر ایمنـی اکتسـابی پرداخـت، بنـابراین نتیجـه بـه دست آمده می تواند بسیار قابل تأمل باشد و البته پژوهش هـای گسترده تری را در حیوانات مختلف و نیز انسان می طلبد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از حمایت های دانشکده ی دامپزشکی دانشگاه ارومیه در انجام این پـروژه کمـال تشـکر و قـدردانی را دارند.

References:

1- Bassoe CF, Laerum OD, Glette J, Hopen G, Haneberg B, Solberg CO. Simultaneous measurement of phagocytosis and phagosomal PH by flow cytometry: role of polymorphonuclear neutrophilic leukocyte granules in phayosome acidification. cytometry 1983; 4: 254-262.

2- Carleton CS, Bruce EL, Steinkamp JA. Invitro and inviro measurement of phapocytosis by flow cytometry. Methods enzymol 1986; 132: 183-193.

3- Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of Nigella Sativa. Phototh Res 2003; 17(4): 299-305.

4- Nafez A, AL-Beitawi SS, EL-Ghousein, Abdullah HN. Replacing bacitracin methylene disalicylate by crushed Nigella sativa seeds in broiler rations and its effects on growth, blood constituents and immunity. Livestock Science 2009; 125: 304–307.

5- Abdel-Salam IM, Raafat A, Abdel-Muniem H. Radioprotective effect of Nigella sativa oil on the liver of Swiss albino mice. Egypt J Biochem 1998; 16: 167-176.

6- Houghton PJ, Zarka R, De Las Heras B, Hoult JRS. Fixed oil of Nigella Sativa and derived thymoguinine inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. Planta Med 1995; 61: 33-36.

7- Mahmoud MR, El-Abhar HS, Saleh S. The effect of Nigella sativa oil against the liver damage induced by Schistosoma mansoni infection in mice. J Ethnopharmacol 2002; 79:1-11.

8- Randhawa MA, Al-Ghamidi MS. A review of pharmacotherapeutic effect of Nigella sativa. Pakistan J Med Res 2002; 41:1-10.

9- Hanafy MS, Hatem ME. Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin). Ethnopharmacology 1991; 34: 275-278.

10- Haq A, Lobo PI, Al-Tufail M, Rama NR, Al-Sedairy ST. Nigella sativa effect on humanlymphocytes and polymorphonuclear leukocytes phagocytic activity. Immunopharmacol 1995; 30: 147-155.

11- Hag A, Lobo P, Al-Tufail M, Rama N, Al-Sedairy ST. Immunomodulatory effect of Nigella Sativa proteins fractioned by ion exchange chromatography. Int J Immunopharmacol 1999; 21: 283-295.

12- El-Dakhakhny M, Madi NJ, Lembrt N, Ammon HP. Nigella sativa oil, nigellon and derived thymoguinone inhibit sythesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear lekocytes from Rats. J Ethnopharmacol 2002; 81:161-164.

13- Roghani M, Baluchnejhad mojarad T, Sajjadi M, Kavandi E, Kargarsharif F. Analgesic effect and long term Oral of black seed on diabetic Rats. Medical science J of Shahid Sadughi of Yazd Uni 1385; 14 (2): 38-43[In Persian]

14- Swahston-Flatt SK, Day C, Bailey CJ, Flatt PR. Evaluation of traditional plant treatments for diabetes: Studies in streptozotoein diabetic mice. Acta diabetol Lat 1989; 26(1): 50-51.

15- Sally AQ. Isolation of human blood mononuclear cells using ficoll-hypaque density gradient centrifugation. University of Rochester medical center. HIC-1-0020 Rochester human immunology center core laboratory David H. Smith center for vaccine biology and immunology. Aab Institute of Biomedical Sciences 2007.

16- Broussseau P, Tryphonas H, Blackly B, Boermans H, Flip D, Fournier M. Manual of immunological methods. Washington, D.C: CRC Press, 1999: 7-56.

17- Chen JJ, Ye ZQ, Koo MW. Growth inhibition and cell cycle arrest effect of epigallocatechin gallatein the NBT-11 bladder tumour cell line. Bju int 2004; 93: 1082-1086.

18- Hay C, Westwood OMR. Practical immunology, 4th ed. Blackwell Science Ltd. Berlin, Germany 2002: 203-210.

19- Nagelkerke LAJ, Pannevis MC, Hoalihan DF, Secombes CJ. Oxigen uptake of rainbow Trout on corhynchus Mykiss phagocytes following stimulation of the respirator burst. D exp Bio 1990; 1(154): 339-353.

20- Nazrul Islam SK, Begum P, Touhida A, Huque S, Ahsan M. Immunosuppressive and cytotoxic properties of Nigella sativa. Phytotherapy Research 2004; 18(5): 395–398.

21- Vahdati-Mashhadian N, Rakhshandeh H, Omidi A. An investigation on LD50 and subacut hepatic toxicity of *Nigella sativa* seed extracts in mice. Pharmazie 2005; 60(7): 544-547.

22- Fararh KM, Atoji Y, Shimizu Y, Shiinx H, Nikami T. Mechanisms of the hypoglycaemic and immunopotentiating effects of *Nigella sativa* L. oil in streptozotocin-induced diabetic hamsters. Takewaki-research in veterinary science 2004; 77: 123-129.

23- Liu B, Miyata S, Kojima H, Urihara A, Kusunoki H, Suzoki K, Kasuga M. Low phagocytic activity of resident peritoneal macrophages indabetic mice. Diabetes 1999; 48:2074-2082

24- AL-Ghamdi MS. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella Sativa*. J Ethuopharmacol 2001; 76:45-48.

25- Hajhashemi V, Ghannadi A, Jafarabadi H. Black cumin seed essential oil, as apotent salgesic and anti inflammatory drug. Phytother Res 2004; 18:195-199.

26- Mashhadian NV, Rakhshandeh H. Antibacterial and antifungal effects of Nigella sativa exteracts against S. aureus, P. aeroginosa and C. albicans. Pak Med Sci J 2005; 21(1):47-52.

27- Agarwal R, Kharya MD, Shivastave R. Antimicrobial and antihelminthic activities of the essential oil of Nigella sativa linn. Ind J Exp Biol 1979; 17: 1264-1265.

28- Swamy SM, Tan BK. Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of *Nigella sativa* L. seeds. J Ethnopharmacol 2000; 70:1-7.

29- Mestoure S, Feher J. Protective effect of Nigella sativa seeds against carbon tetracholoride induced liver damage. The Ame J chin med 2003; 31(5):721-728.

Survey of the Effect of Powder Nigella Sativa (Black Seed) in Increscent of Monocyte Phagocytosis in Quinea Pig

Nowruz Delirejh[1], **Ahmad Morshedi**[2] **and Seyyed Shamsadin Athari**[3]

Abstract

Background and Aim: In most infections and diseases, induction and increasing power of immuno system are necessary to cure and decrease the effect of the disease. Nigella sativa is a plant that has been used for treatment of many diseases. In this survey, the effect of Nigella sativa is surveyed in strengthening of Monocyte phagocytosis so that the use and mechanism of this plant for strengthening the phagocytosis of main cells of immune system are characterized.

Materials and Methods: For this purpose, 21 male quinea pigs were selected and divided into three groups: control group given nothing, treatment group with taking 6.25% Nigella sativa nutrient and another treatment group with taking 12.5% Nigella sativa nutrient for 3 weeks. At an even period, blood samples were taken and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated from each subject's Heparin Blood in the Faikol-Hypak style. Finally, the three tests, that is, reduction Nitro Blue Tetrazolium (NBT) renewal, phagocytosis with yeast and latex bead floressance were given.

Results: The results have shown that increasing of phagocytosis in Monocyte is meaningful ($p \leq 0.05$).

Conclusion: Using Black seed with food causes the increasing of phagocytosis in mononuclear cells and increasing of phagocytosis activity for uptake of foreign particles and pathogens. Thus, this substance can be used to define pathogens through activating Monocyte-Macrophage pathway, that is, the connector between the innate and adaptive immuno systems.

Keywords: Nigella sativa, PBMC, phagocytosis

Ofogh-e-Danesh. GMUHS Journal. 2010; Vol. 16, No. 4

1- Assistant Professor, Department of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

2- Associate professor, Department of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

3- **Corresponding Author:** Member of Young Researchers' Club of Tabriz Islamic Azad University, Malekan, Iran.

Tel: +98 422 8223904 **Fax:** +98 441 2771924 **E-mail:** ss.athari@gmail.com