مجلـــه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشـــگاه علـــوم پزشـــکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۲, شماره‌ی ۹۵, بهمن و اسفند ۱۳۹۳, صفحات ۱۱۲ تا ۱۲۱

اثرات تعدیل کننده پاسخ‌های ایمنی توسط عصاره‌ی هیدروالکلی ریشه‌ی شیرین بیان

دکتر سید میثم ابطحی فروشانی[۱]، هادی اسمعیلی گورچین قلعه[۲]، رضا رضاپور[۳]، بهمن منصوری مطلق[٤]، علی روستایی[۳]

نویسنده‌ی مسوول: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده‌ی دامپزشکی، گروه میکروب شناسی meysamabtahi@hotmail.com

دریافت: ۹۲/۹/۱۸ پذیرش: ۹۳/۵/۲۱

چکیده

زمینه و هدف؛ *مدت‌های مدیدی است که ریشه‌ی گیاه شیرین بیان (Glycyrhiza glabra L.) برای درمان طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها از جمله سرفه‌ی ساده تا هپاتیت و حتی موارد پیچیده‌تر از قبیل سرطان کاربرد دارد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات ایمونومودلاتوری عصاره‌ی هیدروالکلی ریشه‌ی گیاه شیرین بیان بر موش‌های سوری متعاقب چالش با پادگن گویچه‌های سرخ گوسفند (SRBC) می‌باشد.*

روش بررسی؛ *جامعه‌ی مورد مطالعه، شامل ۲۰ موش سوری نر بود که در دو گروه مساوی به‌طور تصادفی قرار گرفتند و با پادگن SRBC ایمونیزه شدند. موش‌های گروه تیمار از ابتدای مطالعه به مدت دوهفته عصاره‌ی هیدروالکلی شیرین بیان (۰/۷۵g/Kg - روزانه - خوراکی) را دریافت نمودند. موش‌های گروه تیمار از ابتدای مطالعه روزانه به مدت دوهفته عصاره‌ی هیدروالکلی شیرین بیان را به میزان ۰/۷۵g/Kg دریافت نمودند.*

یافته‌ها؛ *نتایج به‌دست آمده حاکی از افزایش معنی‌دار تیتر پادتن ضد SRBC در سرم موش‌های گروه تیمار همزمان با کاهش شدت واکنش DTH می‌باشد. به‌علاوه، میزان قابلیت انفجار تنفسی در بین سلول‌های فاگوسیت کننده موجود در جمعیت سلول‌های طحالی در موش‌های گروه تیمار کاهش معنی‌داری یافت، در حالی که میزان تکثیر لنفوسیت‌های طحالی در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافته بود.*

نتیجه گیری؛ *به‌نظر می‌رسد که عصاره‌ی هیدروالکلی ریشه‌ی گیاه شیرین بیان ممکن است که به عنوان یک ترکیب طبیعی تعدیل کننده‌ی دستگاه ایمنی مورد توجه قرار گیرد.*

واژگان کلیدی؛ گیاه شیرین بیان، ایمنی هومورال، ایمنی سلولی،

مقدمه

گیاه شیرین بیان با نام علمی (*Glycyrhiza glabra* L.) گیاهی چند ساله از خانواده بقولات (Fabaceae) است که به‌واسطه‌ی دارا بودن ترکیبات دارویی و غذایی مهم در ریشه و ریزوم آن در دنیا حایز اهمیت می‌باشد. این گیاه از جمله مهم‌ترین گیاهان دارویی بومی کشور ایران می‌باشد که به‌میزان قابل توجهی از آن سالیانه صادر می‌شود (۱). ماده‌ی اصلی عصاره‌ی شیرین بیان که در صنایع دارویی، غذایی و حتی دخانیات کاربرد دارد، یک ترکیب ساپونین‌تری ترپنوئیدی به نام اسید گلیسیریزیک یا گلیسیریزین با شیرینی ۳۰ تا ۵۰ برابر ساکارز است (۳و۲). عصاره‌ی شیرین بیان (گلیسیریزین) در طب سنتی اغلب به‌عنوان یک ترکیب ضد سرفه، مرهم تنفسی، تسکین دهنده‌ی زخم‌های گوارشی، درمان هپاتیت مزمن و

۱- دکترای تخصصی ایمونولوژی، استادیار گروه میکروب شناسی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه ارومیه
۲- دانشجوی دکترای ایمنی شناسی، گروه میکروب شناسی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه ارومیه
۳- دانشجوی دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه ارومیه
٤- دانشجوی کارشناسی ارشد ایمنی شناسی، گروه میکروب شناسی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه ارومیه

هم‌چنین به‌عنوان یک عامل ضد ویروس مورد استفاده قرار می‌گیرد (٤). از جمله اثرات مفید دیگر گلیسیریزین که گزارش شده است کاهش سطح سرمی تستسترون در خانم‌ها (٥)، کاهش میزان ترومبین (٧ و ٦)، درمان آنمی آپلاستیک (٨) و بیماری آدیسون (١٠و ٩) می‌باشد. هم‌چنین اثرات مثبت این گیاه در درمان آترو اسکلروز در خرگوش اثبات شده است (١١). با وجود اثرات متعدد منسوب به شیرین بیان تاکنون تحقیق جامعی در مورد اثرات تجویز عصاره‌ی گیاه یاد شده، بر روی سیستم ایمنی صورت نگرفته است. در عین حال مطالعه‌ی منابع مختلف گاهی حاکی از نتایج متضادی می‌باشد. به‌طور مثال در برخی از مطالعات به اثرات مفید عصاره‌ی گیاه شیرین بیان در درمان برخی از اختلالات خود ایمن اختصاصی بافت ناشی از ایمنی سلولی اشاره شده است (٤). به‌طور متضادی برخی از گزارشات حاکی از وجود ترکیبات محرک سیستم ایمنی در شیرین بیان می‌باشد (١٣ و ١٢). هدف اصلی ما در مطالعه‌ی پیش رو تعیین اثرات احتمالی ایمونومودلاتوری بر پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی متعاقب چالش با پادگن گویچه‌های سرخ گوسفند (SRBC) در مدل موشی بود. گویچه‌های سرخ گوسفند به عنوان یک منبع پادگنی سهل الوصول و در عین حال کارآمد، جهت تحریک پاسخ‌های ایمنی در یک گونه دیگر از قبیل موش مطرح می‌باشد (١٤).

روش بررسی

تهیه‌ی عصاره گیاهی: بعد از تهیه‌ی گیاه از نواحی اطراف ارومیه، جنس وگونه به عنوان *Glycyrrhiza glabra* واریته *violacca* توسط کارشناس گیاه شناسی تعیین گردید. سپس به‌وسیله‌ی دستگاه خرد کننده، کل گیاه به‌صورت پودر در آورده شد.عصاره با تغلیظ محلول به‌دست آمده از قرار گرفتن پودر گیاه دراتانول ٩٦ و ٧٠ درصد در بالون دستگاه تقطیر در خلا، دکانته نمودن محلول تغلیظ شده توسط کلرفرم و خشک نمودن محلول به‌دست آمده از مرحله‌ی دکانته کردن در شرایط استریل ودمای مناسب تهیه گردید.

ایمن سازی و تیمار حیوانات: جامعه‌ی مورد مطالعه در این بررسی تجربی که به صورت موردی/ شاهدی انجام شده است، شامل ٢٠ موش نر سوری با محدوده‌ی سنی ٦ هفته می‌باشد که از حیوان خانه‌ی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه شده بود. دلیل انتخاب موش‌های نر حذف اثرات ناشی از تغییرات سطح هرمون‌های جنسی در موجودات ماده می‌باشد. این موش‌ها در شرایط استاندارد آب، غذا، دما و نور کافی نگاه‌داری شدند. کلیه‌ی مراحل این تحقیق در کمیته‌ی اخلاق پژوهشی دانشگاه ارومیه مورد تایید قرار گرفت. پس از طی زمان مورد نظر جهت تطابق موش‌ها (٢ هفته)، حیوانات به‌طور تصادفی در دو گروه مشابه از نظر میانگین وزنی به‌شرح زیر قرار گرفتند:

گروه تیمار: موش‌های این گروه در روز شروع آزمایش و یک هفته بعد از آن به‌صورت داخل صفاقی تحت تزریق 1×10^{9} گویچه‌ی سرخ گوسفند (SRBC) در حجم ٠/١ میلی‌لیتر قرار گرفتند. همچنین موش‌های گروه تیمار از ابتدای مطالعه به‌مدت دوهفته عصاره هیدروالکلی گیاه شیرین بیان (٠/٧٥ گرم در کیلوگرم روزانه- خوراکی) را دریافت نمودند.

گروه شاهد: موش‌های این گروه مشابه با گروه قبلی تحت چالش با پادگن SRBC قرار گرفتند. از روز شروع ایمونیزاسیون به این موش‌ها به‌صورت روزانه هم حجم با گروه تیمار، به‌صورت خوراکی PBS دریافت نمودند.

ارزیابی ایمنی هومورال: دو هفته پس از آغاز مطالعه، موش‌ها بیهوش شده، اقدام به خون‌گیری از قلب آن‌ها شد. سپس تیتر پادتن تولید شده علیه آنتی‌ژن گلبول‌های قرمز گوسفند (SRBC) به شیوه‌ی میکروهماگلوتیناسیون تعیین گردید. به‌طور خلاصه بعد از بیهوش کردن موش‌ها، خون‌گیری از قلب انجام شده و سرم خون جدا گشت. رقت سریال (از ١/٢ تا ١/١٠٢٨) از سرم در پلیت‌های ٩٦ خانه ته‌گرد تهیه شده (دوپلیکیت) و سوسپانسیون ٥ درصد از

گلبول قرمز گوسفند به همه‌ی چاهک‌ها اضافه شد و ۲ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق انجام گشت. سپس وقوع آگلوتیناسیون در چاهک‌ها مطالعه شده و تیتر هر نمونه بر اساس رقت آخرین چاهکی که آگلوتیناسیون در آن مشاهده شد محاسبه گردید (۱۵و۱٤).

ارزیابی شدت واکنش‌های ازدیاد حساسیت تاخیری: ٤۸ ساعت قبل از خون‌گیری به کف پای چپ حیوانات ۱×۱۰^{۹} SRBC در حجم ۰/۱ میلی‌لیتر تزریق شد. همزمان ۰/۱ میلی‌لیتر PBS به پای راست جانوران تزریق شد. پس از گذشت ٤۸ ساعت و قبل از خون‌گیری ضخامت پای موش‌ها به کمک کولیس (Mauser Dial Caliper-Germany) سنجیده شد. میزان تورم کف پا به‌عنوان شاخص واکنش ازدیاد حساسیت تاخیری (DTH) طبق رابطه‌ی زیر محاسبه گردید (۱۵و ۱٤):

$$\text{شاخص واکنش ازدیاد حساسیت تاخیری} = \frac{\text{ضخامت تورم پای چپ} - \text{ضخامت تورم پای راست}}{\text{ضخامت تورم پای راست}} \times ۱۰۰$$

تهیه‌ی کشت سلولی طحال و سنجش قابلیت انفجار تنفسی درجمعیت سلول‌های فاگوسیت کننده طحال: به دنبال خون‌گیری از موش‌ها، طحال آن‌ها تحت شرایط استریل خارج و بعد از قطعه‌قطعه شدن در ۵ میلی لیتر محیط کشت RPMI- ۱٦٤۰ (شرکت Sigma -آمریکا) حاوی۱۰ درصد، FBS (شرکت Gibco -آلمان) له گردید. بافت حاصل جهت تهیه سوسپانسیون سلولی از توری سیمی به قطر ۰/۲ میلی‌متر عبور داده شد. پس از سانتیریفیوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰ گرم، به‌منظور حذف RBC ها، بر روی رسوب سلولی به‌دست آمده ۵ میلی لیتر بافر لیز کننده افزوده شد. بعد از ۵ دقیقه ضمن افزودن ۱۰ میلی لیتر محیط کشت بار دیگر به‌مدت ده دقیقه در ۲۰۰ گرم سانتریفیوژ شد. سپس رسوب سلولی در محیط کشت RPMI حاوی FBS ۱۰ درصد به‌حالت سوسپانسون (۲×۱۰^{٦} cell/ml) در آورده شد (۱٦).

این سلول‌ها در پلیت‌های کشت ۲٤ خانه به‌مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن انکوبه گردید، سپس خانه‌ها با محیط کشت هنکس به‌منظور حذف لنفوسیت‌ها شستشو داده شدند. سلول‌های باقیمانده به مدت یک ساعت با مخمر اپسونیزه انکوبه گردید. آن‌گاه ۱۰۰ میکرولیتر محلول زیموزان و NBT (نیترو بلو تترازولیوم) (شرکت Sigma -آمریکا) به هریک از خانه‌ها اضافه گردید و به مدت یک ساعت دیگر انکوبه گردید. در نهایت ٤۰۰ میکرولیتر N-N دی متیل فورماید به هر یک از خانه‌ها اضافه گردید و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی از هر یک از خانه‌ها را در میکروپلیت ۹٦ خانه‌ای ریخته و نتیجه با الایزا نگار در طول موج ۵٤۰ نانومتر قرائت گردید (۱۷).

بررسی میزان تکثیر لنفوسیت‌های موجود در بین جمعیت سلول‌های طحالی: پس از طی مراحلی که در بالا توضیح داده شد، به دنبال شمارش سلول‌ها، سوسپانسونی حاوی ۱×۱۰^{٦}cell/ml تهیه شد و ۱۰۰ میکرو لیتر از آن در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹٦ خانه‌ای ته تخت ریخته شد. برای هر نمونه سه تکرار در حضور ۵۰ میکرو لیتراز محلول فیتوهماگلوتینین ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و سه تکرار بدون حضور فیتوهماگلوتینین در نظر گرفته شد. به‌عنوان بلانک نیز در سه چاهک از محیط RPMI خالی استفاده شد. بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در انکوباتور حاوی CO2 ۵ درصد به هر چاهک ۲۵ میکرو لیتر محلول MTT (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در PBS) افزوده شده، به‌مدت ٤ ساعت دیگر گرمخانه‌گذاری گردید. در این مدت احیای ماده‌ی MTT (۳- (٤،۵) –دی متیل تیازول ۲-ایل)-۲ و۵- دی فنیل تترازولیوم بروماید) توسط سلول‌های زنده و در حال تکثیر سبب تشکیل کریستال‌های فورمازون گردید که با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به‌حالت محلول در آمد.

سپس شدت رنگ در طول موج ۴۹۰ نانومتر تعیین و ایندکس تحریک بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید (۱۶):

$$\text{اندکس تحریک} = \frac{OD_{\text{چاهک با حضور پنبه}} - OD_{\text{چاهک بدون حضور پنبه}}}{OD_{\text{چاهک بدون حضور پنبه}}}$$

آنالیز آماری: جهت مقایسه از آزمون Mann Whitney-U استفاده شد. سطح P<۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel Microsoft (۲۰۱۰) استفاده شد. کلیه‌ی داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش گردید.

یافته‌ها

اساس سنجش ایمنی سلولی اختصاصی که در این مطالعه انجام شده است بر مبنای واکنش ازدیاد حساسیت تاخیری (DTH) و همچنین میزان تکثیر لنفوسیت‌های موجود در بین جمعیت سلول‌های طحالی در پاسخ به آنتی ژن اختصاصی (گلبول قرمز گوسفند) می‌باشد. همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، موش‌های تحت تیمار با عصاره‌ی آبی گیاه شیرین بیان به‌طور معنی‌داری یک کاهش ۲/۴۸ برابری را در واکنش DTH نشان دادند (P<۰/۰۰۰۱). بررسی میزان تکثیر لنفوسیت‌های موجود در بین جمعیت سلول‌های طحالی به‌شیوه‌ی MTT (۳- (۴،۵ –دی متیل تیازول ۲-ایل)-۵،۲- دی‌فنیل تترازولیوم بروماید) حاکی از افزایش در میزان تکثیر لنفوسیتی در گروه درمانی با عصاره‌ی آبی گیاه شیرین بیان در قیاس با گروه شاهد می‌باشد (P<۰/۰۵) (جدول ۲).

به‌منظور ارزیابی پاسخ ایمنی هومورال اختصاصی، عیار آنتی‌بادی‌های آگلوتینه کننده که در مقابل گلبول قرمز گوسفند در بدن موش‌ها تولید شده بود، سنجش شد. به‌دلیل اندازه و ماهیت پنج واحدی مولکول IgM، این آنتی‌بادی بر سد بار الکتریکی بین گویچه‌های قرمز نسبت به IgG به کارآمدتری فایق آمده، منجر به اتصال گویچه‌های قرمز به یکدیگر می‌شود. با نظر داشت این نکته و همچنین با توجه به‌کوتاه بودن طول دوره‌ی مطالعه به نظر می‌رسد که آنتی‌بادی سنجیده شده عمدتا از کلاس IgM می‌باشد. همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است تیتر آنتی‌بادی در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری یک افزایش سه برابری را نشان می‌دهد (P<۰/۰۰۰۱).

جدول ۱: مقایسه‌ی پاسخ ایمنی سلولی و هومورال به دنبال چالش با sRBC بین گروه‌های شاهد و تیمار

گروه‌ها	درصد تورم کف پا	تیتر پادتن ضد sRBC
شاهد	۴۰/۳۶±۳/۵۲	۲۹/۷۵±۸/۳۱
تیمار	۱۶/۲۷±۴/۲۲	۸۹/۷۷±۹/۹۳
P. value	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱

به‌منظور ارزیابی پاسخ ایمنی ذاتی اقدام به‌بررسی شدت انفجار تنفسی در جمعیت سلول‌های فاگوسیتیک طحال به‌شیوه NBT ارزیابی شد. در تست احیای NBT توانایی و ظرفیت لکوسیت‌ها در تولید رادیکال‌های آزاد به‌ویژه آنیون سوپراکسیداز مشخص می‌گردد.

جدول ۲: مقایسه‌ی بین شدت انفجار تنفسی سلول‌های فاگوسیت کننده (آزمون NBT) و میزان تکثیر لنفوسیتی (آزمون MTT) در جمعیت سلول‌های تک هسته ای طحال

گروه‌ها	آزمون NBT (شدت جذب نوری)	آزمون MTT (شاخص تحریکی)
شاهد	۱/۶۵±۳/۵۲	۱/۴۴±۰/۲۳
تیمار	۰/۸۶±۴/۲۲	۲/۰۴±۰/۱۱
P. value	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۵

آنیون سوپراکسیداز تولید شده، ماده رنگی NBT (زرد، شفاف و محلول در آب) را احیا نموده و به فورمازان آبی نامحلول و

رسوب در داخل فاگوسیت تبدیل می‌کند. میزان فورمازان تولید شده با روش فتومتری سنجش شده، که میزانی از ارزیابی عملکرد انفجار تنفسی فاگوسیت‌ها است (۱۷). نتایج حاصل از این تست حاکی از کاهش قابلیت انفجار تنفسی مونوسیت/ماکروفاژهای طحالی می‌باشد ($P<0/0001$) (جدول ۲).

بحث

امروزه گیاهان دارویی تعدیل کننده سیستم ایمنی افق جدیدی را در طب گیاهی ایجاد نموده‌اند. سیستم ایمنی بدن وظیفه‌ی حفاظت موجود زنده را برابر عوامل خارجی و هم چنین حفظ هموستاز بدن برعهده دارد. تعدیل واکنش‌های ایمنی نقش مهمی را در بهبود عملکرد بدن به دنبال چالش‌های ایمونولوژیک بازی می‌کند. در مواقعی که دستگاه ایمنی میزبان نیازمند مهار و یا بالعکس تقویت عملکرد می‌باشد، این چنین گیاهان دارای ویژگی ایمونومودلاتوری می‌توانند به‌عنوان رهیافت جایگزین داروهای شیمی درمانی مرسوم استفاده شوند (۱۸). در بین اجزای مختلف دستگاه‌های ایمنی، طحال به‌عنوان یک ارگان ثانویه لنفوئیدی نقش مهمی در حذف پاتوژن‌های موجود در خون و ایجاد پاسخ‌های عمومی ایمنی بازی می‌کند (۱۹). بدین سبب مطالعه‌ی حاضر نیز بر روی پاسخ سلول‌های ایمنی این بافت متمرکز گردید.

عمده مطالعاتی که بر روی اثرات ریشه‌ی شیرین بیان صورت گرفته است بر روی بخش خاصی از مواد تشکیل دهنده‌ی عصاره از قبیل گلیسریزین و گلیسریتینیک اسید بوده است که این خود باعث نتایج متضادی در مورد یک اثر خاص شیرین بیان شده است (٤). به‌طور مثال اخیرا گزارش شده است که استفاده از گلیسریزین به‌عنوان یک ترکیب پلاریزه‌کننده سلول دندریتیک منجر به افزایش تولید اینترفرون گاما و اینترلوکین ۱۰ همزمان با کاهش اینترلوکین ٤ شده است (۲۰). در حالی که ترکیبات تری ترپنوئیدی مشتق از عصاره‌ی ریشه‌ی شیرین بیان موجب افزایش سلول‌های مولد آنتی‌بادی در طحال شده و به‌طور همزمان موجب کاهش تولید اینترفرون گاما واکنش‌های ازدیاد حساسیت تاخیری شده است (۲۱). از آنجایی که در طب سنتی به‌طور معمول از همه‌ی اجزای ریشه‌ی گیاه استفاده می‌شود، مطالعه‌ی حاضر نیز به بررسی اثرات عصاره‌ی هیدروالکلی خام ریشه شیرین بیان بر روی سیستم ایمنی پرداخته شده است.

در مطالعات قبلی افزایش سلول‌های مولد آنتی‌بادی به‌دنبال استفاده از برخی از اجزای عصاره‌ی شیرین بیان گزارش شده است (۲۲ و ۲۱). افزایش تکثیر لنفوسیتی، همزمان با تولید آنتی‌بادی ضد SRBC که در مطالعه‌ی حاضر نیز گزارش شده است ممکن است به‌دلیل افزایش سلول‌های مولد آنتی‌بادی توسط عصاره‌ی خام شیرین بیان صورت گرفته باشد.

در گذشته گزارش شده است که برخی از ترکیبات عصاره‌ی ریشه‌ی شیرین بیان از قبیل گلیسریزین دارای خاصیت کاهنده‌ی رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد (٤). کاهش شدت انفجار تنفسی که در مطالعه‌ی حاضر در ارتباط با سلول‌های تک هسته‌ای گزارش گردید، ممکن است بخشی از آن به‌دلیل فوق الذکر باشد. واکنش‌های DTH در نتیجه‌ی همکاری سلول‌های TH1 و ماکروفاژها صورت می‌گیرد. لنفوسیت‌های T فعال شده در طی واکنش‌های DTH موجب فعال سازی و به تبع آن افزایش تولید رادیکال‌های آزاد از سلول‌های تک هسته‌ای می‌شود (۲۳). این در حالی است که ما در این مطالعه با کاهش شدت واکنش‌های DTH نیز روبه رو بودیم. گزارش شده است که گلیسریزین موجب مهار تولید اینترلوکین ۲ (عامل گسترش سلول‌های TH1) توسط جمعیت سلول‌های طحالی می‌شود (٢٤). هم‌چنین برخی از ترکیبات موجود در عصاره از قبیل لیکوشاکن‌ها و آنالوگ‌های آن موجب مهار تکثیر و تولید سایتوکاین توسط سلول‌های T شده است (٤). بنابراین ممکن است که بخشی از کاهش واکنش DTH که در مطالعه‌ی حاضر مشاهده نمودیم به‌دلیل اثرات فوق صورت

گرفته باشد. کاهش فعالیت ماکروفاژها (کاهش شدت انفجار تنفسی) نیز می‌تواند تا حدودی کاهش میزان شدت واکنش‌های DTH را در تحقیق حاضر توجیه نماید. همچنین ممکن است که افزایش تکثیر لنفوسیت‌ها که در این مطالعه مشاهده شد، ناشی از پلاریزه شدن آن‌ها به‌سمتی به‌غیر از سلول‌های TH1 باشد. در مطالعات پیشین به اثرات ضد التهابی برخی از اجزای عصاره‌ی ریشه شیرین بیان اشاره شده است (۲۵ و٤). محققین چند عامل را در ایجاد اثرات ضد التهابی شیرین بیان موثر دانسته‌اند. نخست برخی از ترکیبات موجود در عصاره از قبیل گلیسریتینیک اسید موجب مهار متابولیسم گلوکوکورتیکوئیدها شده است (۲۷و۲٦). دوم اینکه برخی از اجزای عصاره از قبیل گلیسریتینیک اسید موجب مهار مسیر کلاسیک کمپلمان می‌گردد (۲۸). از طرفی گلیسریزین نیز موجب کاهش رادیکال‌های آزاد در دسترس می‌شود (٤). در تحقیق حاضر نیز کاهش فعالیت لنفوسیت‌های T و سلول‌های ماکروفاژ به‌صورت کاهش شدت واکنش DTH و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن گزارش گردید. این امر خود می‌تواند توجیه کننده‌ی برخی از اثرات ضد التهابی منتسب شیرین بیان باشد. در مجموع می‌توان اینطور استنتاج کرد که شیرین بیان موجب ایجاد فنوتیپ ضد التهابی M2 در رده‌ی مونوسیت/ماکروفاژ شده و بدین‌ترتیب ممکن است که از گسترش آسیب‌های بافتی در بیماری‌های خود ایمن اختصاصی بافت ممانعت به‌عمل آورد. در طب سنتی استفاده از عصاره‌ی ریشه شیرین بیان در درمان برخی اختلالات خود ایمن مرسوم می‌باشد (٤). مطالعات اخیر حاکی از تاثیر اجزای عصاره بر درمان روماتوئید آرتریت (۳۰و ۲۹) و مدل تجربی تیروئیدیت خود ایمن (۳۱)، بوده است. فرایند حذف موثر یک پاتوژن مرحله‌ی اساسی پس از برداشت پاتوژن به راه افتادن ساز و کارهای انفجار تنفسی و تولید نیتریک اکساید جهت نابودی موثر عامل برداشت شده می‌باشد (۲۳). از آنجایی که شدت انفجار تنفسی در سلول‌های فاگوسیتیک به‌طور مشخصی کاهش می‌یابد، بنابراین به نظر نمی‌رسد که سرخار گل اثر واقعا مفیدی در تقویت سیستم ایمنی از جمله دفاع ضد باکتریایی داشته باشد. البته مطالعات متعددی در مورد اثرات ضد باکتریایی اجزای شیرین بیان صورت پذیرفته است (۳۷-۳۳). تقریبا تمام مطالعات یاد شده در شرایط آزمایشگاهی (In vitro) بوده و یا بر روی عفونت‌های سطحی مورد بررسی قرار گرفته است. بنابراین اثرات یاد شده ناشی از اثرات مستقیم اجزای گیاه بر روی باکتری بوده است. در مطالعه‌ای هم که اخیرا در مورد اثرات مفید تجویز شیرین بیان در اسهال ناشی از E. coli صورت گرفته است، محقیقن اثرات مفید یاد شده را به‌دلیل ممانعت از عملکرد سم حساس به حرارت باکتری دانسته‌اند (۳۷). همچنین در برخی مطالعات که عمدتا در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفته است به‌خواص آنتی‌ویروسی و خاصیت ضد سرطانی گیاه مزبور اشاره شده است (٤). با توجه به قالبیت عصاره‌ی گیاه در کاهش شدت واکنش‌های ایمنی سلولی، اثرات یاد شده به‌دلیل اثرات مستقیم ترکیبات گیاه است و به نظر نمی‌رسد که سازو کارهای ایمنی چندان در ایجاد اثرات مقید ضد ویروسی و ضد سرطانی گیاه دخیل باشند. مسلم است که این مطالعه تنها یک بررسی کاملا مقدماتی بوده و لازم است که آزمایشات تکمیلی بیشتری جهت ارزیابی وضعیت پلاریزه شدن لنفوسیت‌های T و میزان تولید سایر کلاس‌های ایمونوگلوبولین و هم‌چنین سایر شاخصه‌های فعالیت اجزای ایمنی انجام شود.

نتیجه گیری

نتایج حاضر به خوبی نشان می‌دهد که دریافت خوراکی عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه شیرین بیان در موش‌ها موجب انحراف پاسخ‌های ایمنی اختصاصی پادگن از سمت ایمنی سلولی به سمت تقویت ایمنی هومورال بوده است. بنابراین ممکن است که عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه شیرین به‌عنوان یک ترکیب طبیعی تعدیل کننده‌ی دستگاه ایمنی مورد توجه قرار

گیرد. البته از آنجایی که شدت انفجار تنفسی در سلول‌های فاگوسیتیک به‌طور مشخصی کاهش می‌یابد، بنابراین به‌نظر نمی‌رسد که شیرین بیان اثر واقعا مفیدی در تقویت سیستم ایمنی در دفاع ضد میکروبی علیه عوامل باکتریایی داشته باشد.

تقدیر و تشکر

نگارندگان از زحمات آقای مهندس اصغر علیاری کارشناس آزمایشگاه ایمنی شناسی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه ارومیه کمال تقدیر و تشکر را دارند.

References

1- Amani M, Sotudeh-Gharebagh R, Mostaoufi N, Kashani H. Optimal exteraction of glycyrrhetinic acid from licorice root. *Technol.* 2005; 3(4): 376-580.

2- Nezamabadi H, Rahimiyan Mashhadi H, Zand A and Alizadeh H. Ecophysiological aspects of licorice rhizome. *Plant Dis Pests.* 1385; 74(2): 45-62.

3- Marzi V, Circella G, Vampa GM. Effect of soil depth on the rooting system growth in Glycyrrhiza glabra L. *Acta Horti.* 1993; 331: 71-8.

4- Nassirasl M and Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects ofglycyrrhiza sp. and its bioactive compounds. *Phytother Res.* 2008; 22: 709-724.

5- Armanini D, Mattarello MJ, Fiore C, et al. Licorice reduces serum testosterone in healthy women. *Steroids.* 2004; 69(11-12): 763-6.

6- de Paula FT, Frauches PQ, Pedebos C, et al. Improving the thrombin inhibitory activity of glycyrrhizin, a triterpenic saponin, through a molecular simplification of the carbohydrate moiety. *Chem Biol Drug Des.* 2013; 82(6): 756-60.

7- Mendes-Silva W, Assafim M, Rata B, Monteiro RQ, Guimaraes JA, Zingalia RB. Antithrombiotic effect of glycyrrihizin, a plant derived thrombin inhibitor. *Thromb Res.* 2003; 112: 93-98.

8- Su EY, Fang YH, Chen HS. Clinical observation of treating 62 patients with severe aplastic anemia failing in immunosuppressive therapy by integrative medicine. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 2012; 32(12): 1616-20.

9- Methlie P, Husebye EE, Hustad S, Lien EA, Lovas K. Grapefruit juice and licorice increase cortisol availability in patients with Addison's disease. *Eur J Endocrinol.* 2011; 165(5): 761-9.

10- Cooper H, Bhattacharya B, Verma V, McCulloch AJ, Smellie WS, Heald AH. Liquorice and soy sauce, a life-saving concoction in a patient with Addison's disease. *Ann Clin Biochem.* 2007; 44(Pt 4): 397-9.

11- Fuhrman B, Volkova N, Kaplan M, et al. Antiatherosclerotic effects of licorice extract supplementation on hypercholesterolemic patients: increased resistance of LDL to atherogenicmodifications, reduced plasma lipid levels, and decreased systolic blood pressure. *Nutrition.* 2002; 18(3): 268-73.

12- He X, Li X, Liu B, Xu L, Zhao H, Lu A. Down-regulation of Treg cells and up-regulation of TH1/TH2 cytokine ratio were induced by

polysaccharide from radix glycyrrhizae in H22 hepatocarcinoma bearing mice. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2011; 16(10): 8343-52.

13- Kim J, Joo I, Kim H, Han Y. 18beta-glycyrrhetinic acid induces immunological adjuvant activity of Th1 against Candida albicans surface mannan extract. *Phytomedicine.* 2013; 20(11): 951-5.

14- Zimecki M, Wieczorek Z. Differential patterns of cyclosporine A-induced inhibition of humoral and cellular immune responses to sheep erythrocytes in mice. *Polish J Pharmacol.* 2001; 53(5): 495-500.

15- Hassan ZM, Ebtekar M. Immunological consequence of sulfur mustard exposure. *Immunol Lett.* 2002; 83(3): 151-2.

16- Abtahi Froushani SM, Delirezh N, Hobbenaghi R, Mosayebi G. Synergistic effects of atorvastatin and all-trans retinoic acid in ameliorating animal model of multiple sclerosis. *Immunol Invest.* 2014; 43(1): 54-68.

17- Esmaili Gouvarchin galeh H, Delirezh N, Abtahi Froushani SM, Afzale Ahangaran N. Calcitriol modulates the effects of the supernatants of bone-marrow–derived mesenchymal stem cells on neutrophil functions. *Turk J Biol.* 2014; 38: 365-70.

18- Huang CF, Lin SS, Liao PH, Young SC, Yang CC. The immunopharmaceutical effects and mechanisms of herb medicine. *Cell Mol Immuno.* 2008; 5(1): 23-31.

19- Tiron A, Vasilescu C. Role of the spleen in immunity. Immunologic consequences of splenectomy. *Chirurgia.* 2008; 103(3): 255-63.

20- Bordbar N, Karimi MH, Amirghofran Z. The effect of glycyrrhizin on maturation and T cell stimulating activity of dendritic cells. *Cell Immunol.* 2012; 280(1): 44-9.

21- Raphael TJ, Kuttan G. Effect of naturally occurring triterpenoidsglycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilinon the immune system. *Phytomedicine.* 2003; 10: 483-9.

22- Soufy H, Yassein S, Ahmed AR, et al. Antiviral and immune stimulant activities of glycyrrhizin against duck hepatitis virus. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2012; 9(3): 389-95.

23- Kobayashi K, Kaneda K, Kasama T. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. *Microsc Res Tech.* 2001; 53(4): 241-5.

24- Zhang YH, Isobe K, Nagase F et al. Glycyrrhizin as apromoter of the late signal transduction of interleukin-2production by splenic lymhocytes. *Immunology.* 1993; 79: 528-534.

25- Saxena S.Glycyrrhiza glabra:Medicine over the millennium. review article. *J Nat Prod.* 2005; 454-458.

26- Teelucksingh S, Mackie AD, Burt D, McIntyre MA, Brett L,Edwards CR. Potentiation of hydrocortisone activityin skin by glycyrrhetinic acid. *Immunol.* 1990; 335: 1060-3.

27- Schleimer RP. Potential regulation of inflammation in thelung by local metabolism of

hydrocortisone. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1991; 4: 166-73.

28- Kroes BH, Beukelman CJ, Van Den Berg AJJ, Wolbink GJ, VanDijk H, Labadie RP. Inhibition of human complementby beta-glycyrrhetinic acid. *Immunol.* 1997; 90: 115-20.

29- Yang CL, Or TC, Ho MH, Lau AS. Scientific basis of botanical medicine as alternative remedies for rheumatoid arthritis. *Clin Rev Allergy.* 2013; 44(3): 284-300.

30- Puchner A, Hayer S, Niederreiter B, et al. Effects of 18β-glycyrrhetinic acid in hTNFtg mice – a model of rheumatoid arthritis. *Wien Klin Wochenschr.* 2012; 124(5-6): 170-6.

31- Song XH, Zan RZ, Yu CH, Wang F. Effects of modified HaizaoYuhu Decoction inexperimental autoimmune thyroiditis rats. *J Ethnopharmacol.* 2011; 135(2): 321-324.

32- Zhou T, Deng X, Qiu J. Antimicrobial activity of licochalcone E against Staphylococcus aureus and its impact on the production of staphylococcal alpha-toxin. *J Microbiol Biotechnol.* 2012; 22(6): 800-5.

33- Xiao Y, Xu J, Mao C, et al. 18Beta-glycyrrhetinic acid ameliorates acute Propionibacterium acnes-induced liver injury through inhibition of macrophage inflammatory protein-1alpha. *J Biol Chem.* 2010; 285(2): 1128-37.

34- Villinski JR, Bergeron C, Cannistra JC, et al. Pyrano-isoflavans from Glycyrrhiza uralensis with antibacterial activity against Streptococcus mutans and Porphyromonas gingivalis. *J Nat Prod.* 2014; 77(3): 521-6.

35- Snowden R, Harrington H, Morrill K, et al. A comparison of the anti-Staphylococcus aureus activity of extracts from commonly used medicinal plants. *J Altern Complement Med.* 2014; 20(5): 375-82.

36- Long DR, Mead J, Hendricks JM, Hardy ME, Voyich JM. 18beta-Glycyrrhetinic acid inhibits methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* survival and attenuates virulence gene expression. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(1): 241-7.

37- Chen JC, Ho TY, Chang YS, Wu SL, Li CC, Hsiang CY. Identification of *Escherichia coli* enterotoxin inhibitors from traditional medicinal herbs by in silico, in vitro, and in vivo analyses. *J Ethnopharmacol.* 2009; 121(3): 372-8.

Immunomodulatory Effects by Hydroalcoholic Liquorice Root Extracts

Abtahi Froushani SM[1], Esmaeili Gouvarchin Ghaleh H[1], Rezapor R[1], Mansori Motlagh B[1], Rostaei A[1]

[1]Dept. of Microbiology, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran.

Corresponding Author: Abtahi Froushani SM, Dept. of Microbiology, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran,

E-mail: meysamabtahi@hotmail.com

Received: 9 Dec 2013 **Accepted:** 12 Aug 2014

Background and Objective: The roots of *Glycyrrhiza glabra* (Liquorice) have long been used in traditional medicine to treat a variety of ailments from simple coughs to hepatitis and even more complexities such as cancers. This study was conducted to grasp the immunomodulatory properties of the roots of *Glycyrrhiza glabra* in NMRI-mice challenged with sheep red blood cells (SRBCs).

Materials and Methods: The study population consisted of 20 male mice that randomly divided into two equal groups and immunized with SRBC. Mice in the treatment group orally received 0.75 g/Kg hydroalcoholic extract of *Glycyrrhiza glabra* every day from the beginning of the study for 2 weeks.

Results: The results indicated a significant increase in the level of anti-SRBC antibody and simultaneously a significant decrease in the level of cellular immunity in the treatment group compared to the control group. Moreover, the level of the respiratory burst of phagocyte cells of splenocytes significantly decreased in the treatment groups, while the level of lymphocyte proliferation significantly increased in the treatment group as compared to the control group.

Conclusion: Hydroalcoholic root extract of *Glycyrrhiza glabra* may be used as a natural source in immune system.

Keywords: Glycyrhiza glabra L, Humoral immunity, Cellular immunity