اثر عصاره آبی بنه زعفران بر سیستم ایمنی هومورال در انسان

نجمه السادات آذری[۱] ،منیر حسین زاده نمین[۲] ، مهرزاد روغنی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۰۹
تاریخ تصویب: ۹۵/۰۳/۰۹

چکیده

زعفران از خانواده زنبقیان که از لحاظ تغذیه ای و دارویی ارزشمند است. این گیاه از طریق بنه (corm) تکثیر می شود. جهت بررسی اثر عصاره آبی بنه بر سیستم ایمنی انسان، عصاره آبی بنه توسط داوطلبین بصورت خوراکی مصرف شد. نمونه خون دردو نوبت قبل و بعد از مصرف گرفته شد. افراد بر اساس ماده مصرفی در فاصله دو خونگیری در ۳ گروه (بدون مصرف عصاره، مصرف آب، مصرف عصاره آبی بنه) قرار گرفتند. بررسی مقادیر C۳، IgM ، IgG و C٤در سرم با استفاده از پلیت های SRID انجام گرفت. نتایج نشان داد مقادیر C٤،C۳،IgM و IgGدر گروه شاهد و گروه مصرف کننده آب بطور مختصر افزایش یافت ولی در گروه سوم مصرف کننده عصاره بنه افزایش در مقادیر C۳، C٤وIgG و کاهش در مقدار IgM مشاهده شد. این بررسی های مقدماتی نشان داد که عصاره آبی بنه زعفران می تواند باعث تحریک سیستم ایمنی ذاتی و ایمنی هومورال شود.

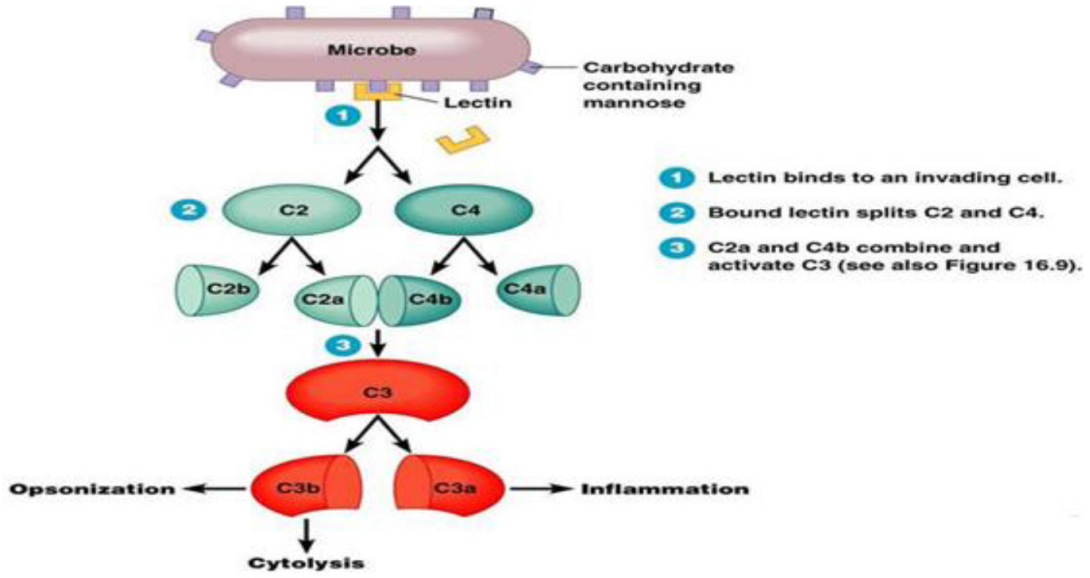
واژه های کلیدی: ایمنی هومورال، بنه زعفران، سیستم ایمنی، سیستم کمپلمان،

---

۱. کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران
۲. دانشیار، گروه فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران
(نویسنده مسئول: monirhosseinzade@yahoo.com)
۳.استادیار،گروه فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران

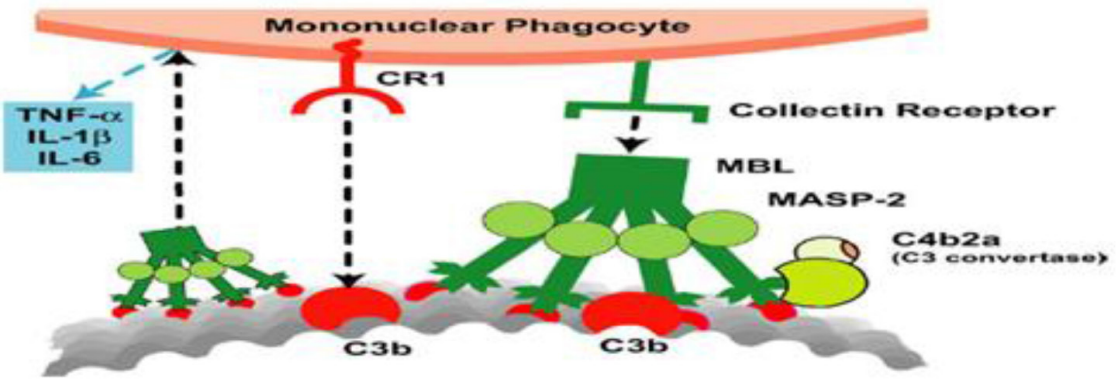
مقدمه

زعفران مزروعی (*Crocus sativus L.*) عضوی از خانواده Iridaceae است. این گیاه از زمان های قدیم به عنوان ادویه استفاده شده وکاربرد های داروئی محدودی داشت. امروزه زعفران از نظر کاربرد داروئی مورد توجه بیشتری قرار گرفته است. زعفران گیاهی تریپلوئید و عقیم است که از طریق بنه ها تکثیر می‌شود. بافت بنه از نشاسته و ترکیباتی از قبیل گلوکز، اسیدهای امینه، ساپونین، اسیدهای چرب، استرول و کروستین غنی می باشد (Moraga et al,.2011). پروتئومیکس بنه زعفران حضور یک لکتین متصل به منان به نام Mannose Binding Lectin (MBL)باوزن مولکولی ۱/۲۸۳۲۸ کیلودالتون و نقطه ایزوالکتریک (PI) ۵/۴۷ را نشان داده است(حسین زاده نمین، ۱۳۸۸) . MBL به مجموعه ای از ابر خانواده C-(super-family)typeLectin تعلق دارد و عملکردآن شناسایی الگوی کربوهیدرات ها در خط اول دفاع در ایمنی ذاتی است که می تواند باعث فعال کردن سیستم کمپلمان شود(ابراهیم زاده و همکاران ۱۳۹۳).MBL الگوی کربوهیدرات ها را در سطح تعداد زیادی از عوامل بیماریزا از جمله باکتریها، ویروسها، پروتوزئرها و قارچ ها مورد شناسایی قرار می دهد. اتصال MBL به این عوامل منجر به فعال شدن مسیر لکتین در سیستم کمپلمان می شود (Turner et al .,2003)(شکل۱).



شکل۱: فعال شدن سیستم کمپلمان در مسیر لکتین (Turner et al., 2003)

شواهدی وجود دارد که نشان میدهد این پروتئین حداقل دارای چهار عملکرد متفاوت است: ۱-فعال کردن سیستم کمپلمان ۲-افزایش فاگوسیتوز ۳-تعدیل التهاب ٤-افزایش آپوپتوز (Turner,2003) (شکل۲).



شکل۲:تسهیل عمل فاگوسیتوز به وسیله(MBL Turner et al., 2003)

مطالعات محدودی در رابطه با اثرات ایمنولوژیک بنه زعفران انجام شده است. در یک مطالعه مشاهده شد استفاده عصاره اتانولی کلاله زعفران به صورت خوراکی در موش‌های تیمار شده میزان تولید IgM و IgE را افزایش داد و نیز عصاره اتانولی گلبرگ زعفران باعث افزایش سطح IgG نسبت به کنترل گردیده است (Babaei et al,.2013). آپوکاروتنوئیدهای زعفران‌عملکرد سلول های ایمنی را از طریق حفاظت آنها در برابر تخریب ناشی از واسطه های فعال اکسیژن واکنشگر تنظیم می نمایند.آپوکاروتنوئیدها ممکن است این عمل را بوسیله تعدیل سیالیت غشای سلول از طریق جلوگیری از آغاز اکسیداسیون اسیداراشیدونیک توسط رادیکال های آزاد انجام دهند (Chew et al,.1995). فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره بنه زعفران در مواجه با تنش ها نشان داده شده است (Ghamsariet al,.2007).هدف از مطالعه حاضربررسی اولیه اثرعصاره آبی بنه زعفران بر سیستم ایمنی انسان می باشد که طی آن اثر اولیه عصاره بر عملکرد سیستم ایمنی هومورال انسان از طریق بررسی تغییرات مقادیر IgG,IgM,C4 ,C3 صورت گرفته است.

مواد و روش ها تهیه عصاره آبی ۸ گرم بنه تر درهاون سرد با ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر در دمای ٤°C هموژنه شد. محلول هموژنه حاصل با دور rpm8000 به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ (Hettich Germany-EBA20)شد.روشناور جمع آوری و به عنوان عصاره آبی در یخچال در دمای٤°Cنگهداری شد.

اعمال تیمارها

تعداد۷ نفرواجد شرایط (از لحاظ سن و نیز تغذیه یکسان حداقل ٢٤ ساعت قبل از نمونه گیری) از بین داوطلبین انتخاب شدند.از تمامی افراد در دو نوبت و در هر نوبت به میزان ٥ میلی لیتر و با فاصله زمانی ۲۰ دقیقه خونگیری صورت گرفت (جهت جلوگیری از لخته شدن خون ماده ضد انعقاد به خون گرفته شده اضافه گردید).افراد بر حسب ماده مصرفی، در فاصله دو خونگیری در سه گروه قرار گرفتند. گروه اول افرادی که در فاصله دو نوبت خونگیری هیچ ماده ای مصرف نکردند(کنترل). گروه دوم افرادی که در فاصله دو خونگیری آب نوشیدند و گروه سوم افرادی که در فاصله دو خون گیری ۷۰ میلی لیتر عصاره آبی بنه (٦/١%) مصرف کردند.

تهیه پلاسمای خون

۲/٥ میلی لیتر از خون هر داوطلب در هر نوبت جهت جداسازی پلاسما استفاده شد. ابتدا خونهای هر داوطلب با دور 5000rpm و به مدت ١٥دقیقه سانتریفوژ گردید و سپس پلاسمای آن جداسازی شد. پلاسمای استخراج شده بعد از انتقال به اپندروف های ۰/٥ میلی لیتری جهت انجام آزمایشات در دمای ۲۰C- نگهداری گردید.

اندازه گیری مقادیر C3، C4، IgG و IgM

غلظت سرمی C3، C4،IgG و IgM به روش انتشار ایمنی شعاعی منفرد(Single Radial Immune Diffusion: SRID) به وسیله کیت های مربوطه(شرکت بهارافشان تهران)بررسی واندازه گیری شدند.

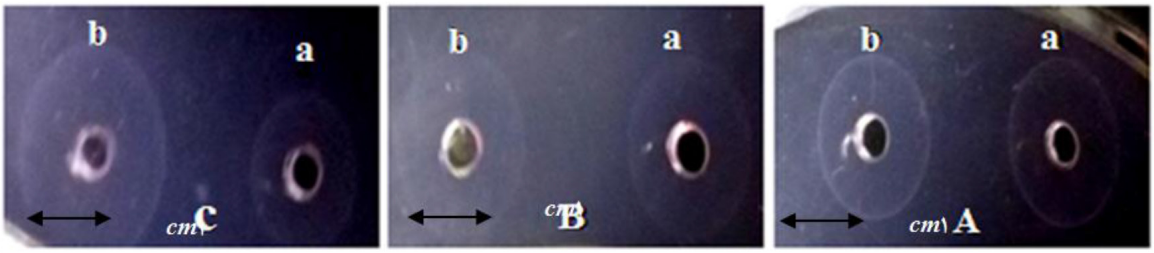
با استفاده ازاین کیت ها، قطر هاله های رسوبی تشکیل شده در محل چاهک های پلیتهای SRID توسط خط کش مخصوص SRID اندازه گیری شد. برای اندازه گیری قطر دایره های رسوبی به وسیله خط کش SRID، پلیت SRID را از پشت روی خط کش گذاشته و آنقدر آن را جابجا کرده تا محیط خارجی دایره رسوبی با دو خط مورب خط کش کاملا مماس شود و خط میانه درست از وسط چاهک بگذرد. در این حالت رقم پایین خط کوتاه عمودی که از وسط چاهک می گذرد، نشان دهنده قطر دایره رسوبی (d) است.

سپس بر روی محور افقی (X) غلظت کالیبراتورهای به کار گرفته شده و بر روی محور عمودی (Y) قطر دایره های رسوبی هر کالیبراتور(d) بطور جداگانه علامت گذاری شدند. نقاط بدست آمده از کالیبراتورها و قطر دایره های رسوبی هر کالیبراتور (d) را علامت گذاری کرده و سپس با اتصال آن نقاط به یکدیگر، منحنی استاندارد رسم شد. بهترین روش رسم منحنی خطی (linear) بوده که در بهترین حالت خود از میان نقاط ۱، ۲ و ۳ با فاصله مساوی عبور می کند. نقاط کالیبراتور که بیش از حد از خط مفروض دور شده را نباید در نظر گرفت.

نتایج

بررسی تغییر میزان C۳

بررسی میزان C3 نشان داد که مقدار آن در گروه شاهد (بدون مصرف ماده) ۳۹% اختلاف نشان داد در حالی که در گروه تحت تیمار (مصرف کننده آب) قبل و بعد از مصرف آب ۸% اختلاف و در گروه مصرف کننده عصاره آبی بنه ۶۲% اختلاف نشان دادند. به طور کلی اختلافی که در میزان C3 در بین مصرف کننده های عصاره آبی بنه و گروه شاهد دیده شد ۲۳% بود (اشکال۳و۶).



شکل ۳: هاله رسوبی ایجاد شده برای اندازه گیری C3.

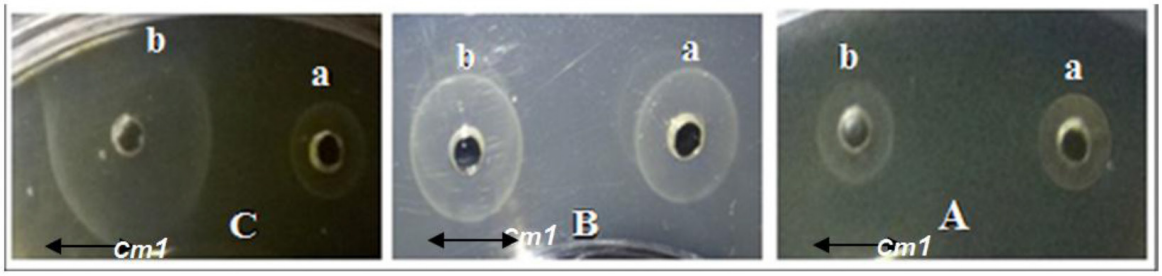
A: گروه شاهد (a : خون گیری اول. b : خون گیری دوم). B : گروه مصرف کننده آب (a : قبل از مصرف آب. b : بعد از مصرف آب). C : گروه مصرف کننده عصاره آبی بنه (a : قبل از مصرف عصاره. b : بعد از مصرف عصاره).

بررسی تغییر میزان C4

مقایسه میزان C4 نیز به مانند مورد C3 انجام شد. در گروه شاهد در فاصله دو خون گیری ۳/۳ % اختلاف مشاهده شد در حالی که در گروه مصرف کننده آب ۲/۹% و در گروه مصرف کننده عصاره آبی بنه زعفران ۶/۵% اختلاف مشاهده شد (شکل ۶).

بررسی تغییر میزان IgG

مقایسه مقدار IgG در گروه شاهد ۴/۹% و در گروه مصرف کننده آب ۴/۵ % اختلاف نشان داد در حالی که در گروه مصرف کننده عصاره بنه در میزان IgG ۱۱% اختلاف وجود داشت (اشکال۳و۶).

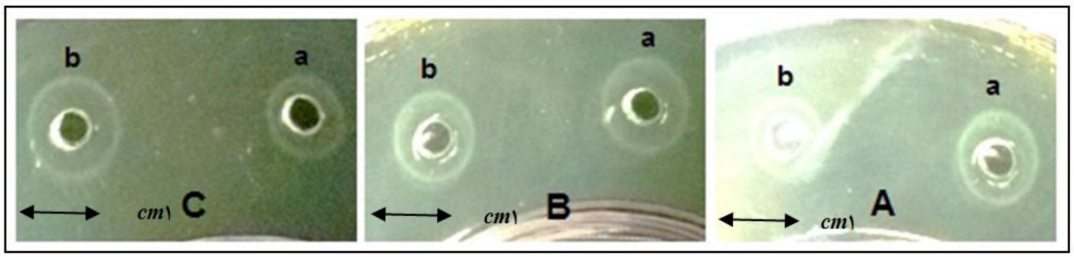


شکل ٤: هاله رسوبی ایجاد شده در پلیت.

A : گروه شاهد (a : خون گیری اول. b : خون گیری دوم). B: گروه مصرف کننده آب (a : قبل از مصرف آب. b: بعد آب). C : گروه مصرف کننده عصاره آبی بنه (a : قبل از مصرف عصاره. b : بعد از مصرف عصاره).

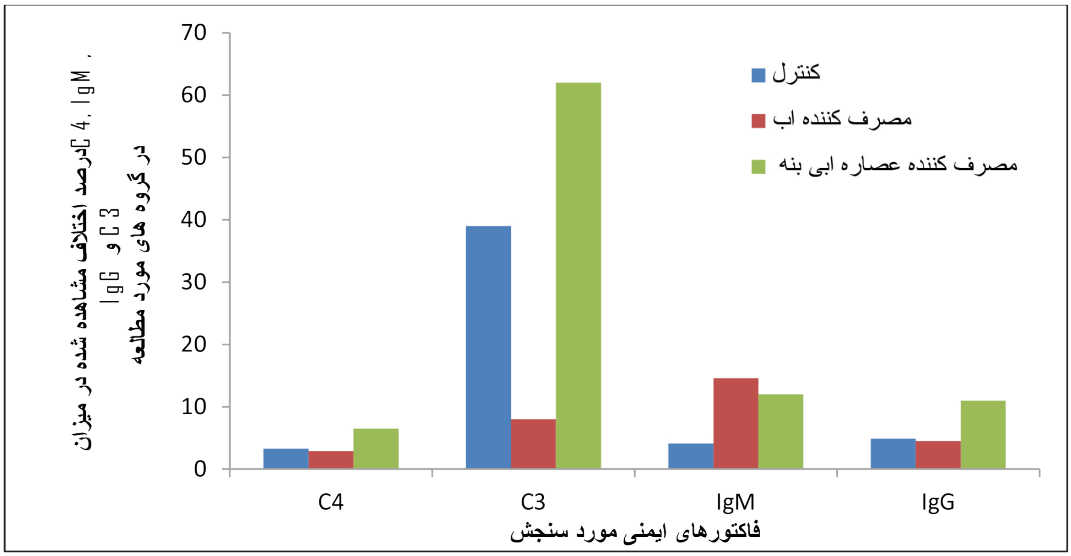
بررسی تغییرمیزان IgM

میزان IgM در نمونه های گروه شاهد اختلاف ٤/١%را نشان داد.در گروه مصرف کننده آب ١٤/٦% و در گروه مصرف کننده عصاره بنه در حدود ١٢ % اختلاف مشاهده شد.میزان IgM در افراد مصرف کننده عصاره بنه نسبت به گروه شاهد ٧/٩% افزایش اما نسبت به گروه مصرف کننده آب ٢/٦% کاهش داشت (اشکال٥و٦).



شکل ٥: هاله رسوبی ایجاد شده در پلیت

A : گروه شاهد (a : خون گیری اول. b : خون گیری دوم). B: گروه مصرف کننده آب (a : قبل از مصرف آب. b: بعد از مصرف آب). C : گروه مصرف کننده عصاره آبی بنه (a : قبل از مصرف عصاره. b : بعد از مصرف عصاره).



شکل٦: مقایسه درصد اختلاف مقادیر C3، C4، IgG و IgM در فاصله دو خونگیری در افراد مورد مطالعه.

بحث

در پژوهش حاضر تغییر در مقادیر C3، C4، IgG و IgM در نمونه سرمی افراد مورد مطالعه قبل و بعد از مصرف عصاره آبی بنه زعفران نسبت به شاهد مشاهده شد. به استثنای IgM افزایش در غلظت C3، C4، IgG در افراد مصرف کننده عصاره بنه نسبت به گروه مصرف کننده آب مشاهده شد. بیشترین درصد اختلاف قبل و بعد از مصرف عصاره بنه زعفران

نسبت به شاهد در مورد C3 مشاهده شد. حسین زاده نمین (۱۳۸۸) لکه های پروتئینی موجود در بنه را از طریق پروتئومیکس مورد شناسائی قرار داده و وجود لکه MBL که نقش ساختاری و القایی دارد را گزارش کرده است. MBL متعلق به مجموعه ای از ابر خانواده C-type Lectin میباشد. در مطالعه حاضر افزایش در میزان C3 پس از مصرف عصاره مشاهده شد که تایید کننده نقش MBL موجود در بنه زعفران در افزایش این واسطه سیستم کمپلمان می باشد. MBL یک جز اصلی سیستم ایمنی ذاتی و یکی از ۳۰ پروتئین مهم سیستم کمپلمان است که به خانواده هایی از پروتئین ها به نام Collectin تعلق داشته (Fujita,2002) و دارای یک قلمرو کلاژن و یک قلمرو لکتین است (Eddie Ip et al,.2009). این پروتئین باعث فعال کردن مسیر لکتین سیستم کمپلمان می شود.لکتین با واسطه اتصال MBL به بنیان های مانوز گلیکوپروتئین ها یا کربوهیدارت های سطوح میکروارگانیسم ها فعال می شود. سلولهای انسانی به طور طبیعی دارای بنیان های اسید سیالیک می باشند که گروه های قندی شناسایی شونده توسط MBL را می پوشانند و اهدافی برای اتصال نمی باشند. فعال شدن سیستم کمپلمان از طریق همکاری سرین پروتئازها (MASP-1,MASP-2) و MBL انجام میشود (Endo et al ,.2006). برای فعال کردن سیستم کمپلمان، MBL و MASP تشکیل کمپلکس می دهند که اتصال بین MASP و MBL از طریق قلمرو کلاژن MBL صورت میگیرد (Dahl et al,.2001). طی فعال شدن سیستم کمپلمان،2-MASP باعث شکستن C4 میشود. جز C4 یک پروتئین اصلی در مسیر کلاسیک و لکتین در سیستم کمپلمان است. در طول فعال شدن سیستم کمپلمان C4 به دو قطعه C4a (9KD) و C4b (195KD) شکسته می شود (Mortensenetal., 2015). قطعه اصلی C4b به صورت کووالان به سطح پاتوژن متصل شده و می تواند به عنوان یک اپسونین عمل کند، همچنین می تواند به عنوان یک واسطه در تشکیل C3b(شکل ۱) عمل کند (Mortensen et al ,.2015).

افزایش غیر اختصاصی IgG ممکن است به علت تحریک ترشح سایتوکاینها از سلول های T کمک کننده باشد. IL4، IL5، IL6، IL-13 و INFγ از جمله سایتوکاین های هستند که باعث تغییر کلاس سلول های B جهت تولید IgG می شوند (Kianbakht and Ghazavi et al ,.2011).

IL-6 یکی از سایتوکاین هایی است که در نتیجه عملکرد MBL در تعدیل فرایندهای التهابی ایجاد می شود و می تواند منجر به افزایش تولید IgG شود (Turner et al,.2003).

در پژوهش حاضر کاهش ۲/٦ %اختلاف درمیزان IgM در افراد مصرف کننده عصاره آبی بنه نسبت به گروه مصرف کننده آب مشاهده شد. غفاری (۱۳۸۳) اثرات مصرف کلاله زعفران بر ایمنی هومورال مردان را مورد بررسی قرار داد. طی این مطالعه کلاله زعفران همراه با شیر به صورت خوراکی مصرف و مشاهده شده که پس از گذشت ۳ هفته، در گروه مورد مطالعه غلظت IgM سرم کاهش معنی‌داری پیدا کرده است. در پایان هفته ششم، غلظت IgM تفاوت‌معنی‌داری با سطح اولیه و گروه شاهد نداشته است. وی چنین بیان کرده که کاهش IgM سه هفته پس از مطالعه نیز احتمالا ناشی ازاثر مهاری زعفران بر سلولهای B ترشح کننده IgM می‌باشد(غفاری،۱۳۸۳). در پژوهش حاضر گر چه کاهش IgM معنی دار نیست اما کاهش آن در برابر افزایش IgG، می تواند دال بر سویچ ایزوتیپی (تغییر کلاس ایمونوگلوبولین) باشد.

در مطالعه ای دیگر (Babaei et al ,.2013)، اثر عصاره اتانولی گلبرگ زعفران در غلظتهای ۷۵، ۱۵۰، ۲۲۵ و ٤٥٠ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن روی پاسخ آنتی بادی، هماتولوژی و هیستولوژی طحال در موشهای صحرایی بررسی شد. در این مطالعه عصاره اتانولی گلبرگ زعفران به موش های صحرایی تزریق شده و از نمونه های خونی برای ارزیابی گلبول های قرمز و سفید خون و سایر فاکتورهای خونی، همچنین تعیین سطح IgG استفاده شد. نتایج تفاوت معنی داری بین تعداد گلبول های قرمز، هموگلوبین ، هماتوکریت و پلاکت نشان داده است. سطح IgG در غلظت ۷۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم در مقایسه با گروه کنترل به طور قابل توجهای افزایش یافته در حالی که نمونه های هیستولوژی طحال نرمال بوده اند که نشان دهنده افزایش در پاسخ انتی بادی بدون تغییر در پارامترهای هماتولوژی و هیستولوژی طحال می باشد (Babaeiet al ,.2013).

نتیجه گیری

نتایج آزمایشات ایمنولوژیک نشان داد که ترکیبات بنه زعفران با تقویت پاسخ ایمنی ممکن است نقش مهمی در بهبود پاسخ آنتی بادی های اختصاصی در شرایط تضعیف دستگاه ایمنی داشته باشد. این پژوهش برای اولین بار نشان داد که مصرف عصاره آبی بنه زعفران می تواند باعث افزایش فعالیت سیستم کمپلمان و افزایش تولید IgG شده و از این طریق قادر به تقویت سیستم ایمنی انسان باشد. البته مطالعات بیشتر و عمیق تر با استفاده از تکنیک های بررسی دقیق تر شامل الیزا می تواند اطلاعات بیشتری در زمینه این پروسه پیچیده ایمنی به ما بدهد.

منابع

ابراهیم زاده،ح ؛حسین زاده نمین، شریفی،گ، ملکی،م، وطنخواه،ا. (۱۳۹۳) زعفران ایران جلددوم. انتشارات دانشگاه تهران،تهران.

حسین زاده نمین، م.(۱۳۸۸) بررسی نقش پروتئین ها و نوکلئیک اسیدها در تمایز کلاله نوپدید زعفران (*Crocus sativus L.*) ایران. رساله دکتری، گرایش فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران.

غفاری، ز، مهری،م. (۱۳۸۳) بررسی اثرات زعفران بر سیستم ایمنی هومورال مردان. رساله دکتری رشته پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان مرکزی.

Babaei, A. Arshami, J; Haghparast, A. Daneshmesgaran, M. (2013) Effects of saffron. (Crocus sativus) petal ethanolic. extract on hematology. antibody response, and spleen histology in rats . Avicenna Journal of Phytomedicine 4(2):103-9.

Chew, B.P. (1995) Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. J.Nutr 1995.125:18045-85.

Dahl, M.R;(2001) MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. Immunity 2001;15:127–135.

Deng, Y. Gvo, Z.G Crocus.; Zeng, Z.L. (2002) Studies on the pharmacological effect of saffron (*crocus sativusL*;).Zhongguozhongyaoza ahi 27(8):265-68

Dyle, R.M. (2001) Nursing herbal medicine handbook, Springhouse corporation, Pennsylvania 377-78.

Eddie,I.p.; Takahashi, K; Alan Ezekowitz, R. M; Stuart, L; (2009) Mannose-binding lectin and innate immunity .Immunological Reviews 0105-2896.

Fujita, T.(2002) Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity .Nat. Rev. Immunol 2, 346–353.

Ghamsari,L;Keyhani, E;Golkhoo, S.h. (2007) Kinetics Properties of Guaiacol Peroxidase Activity in Crocus sativusL. Corm during Rooting. Iranian Biomedical Journal 11 (3): 137-146 (July 2007).

Ghiran, I; Barbashov, S.F; Klickstein, L.B; Tas, S.W; Jensenius, J.C; Nicholson-Weller, A.(2000) "Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin". J. Exp. Med. 192, 1797–1807.

Ji, X; Gewurz, H; Spear, G.T; (2005) Mannose binding lectin (MBL) and HIV .Mol.Immunol ,42(2):145-52.

Kianbakht, s. and Ghazavi, A. (2011) Immunomodulatory Effects of Saffron: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial.Pysiology research

PHytother. Res. 25: 1801–1805.

Matsushita, M; Thiel, S; Jensenius, JC; Terai, I; Fujita, T. (2000) Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease .JImmunol2000;165:2637–2642.

Mortensen, S; Kidmose, RT;Petersen ,SV;Szilágyi ,Á; .Prohászka ,Z;Andersen, GR.(2015) Structural Basis for the Function of Complement Component C4 within the Classical and Lectin Pathways of Complement.The Journal of Immunology Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.

Rubio-Moraga, A; Gómez-Gómez, L;Trapero, A; Castro-Díaz, N; Ahrazem, O. (2013) Saffron corm as a natural source of fungicides: The role of saponins in the underground. Industrial Crops and ProductsVolume 49, Pages 915–921.