

اثر عصاره گیاه بیلهر بر بروز پروتئین CD40 در آئورت سینه‌ای خرگوش‌های نر سفید تغذیه شده با رژیم پر کلسترول

دکتر غلامرضا دشتی^۱، احمد تیموری‌نژاد^۲، دکتر منصور صالحی^۱، دکتر سید ابراهیم سجادی^۳،
دکتر نکیسا ترابی‌نیا^۴

چکیده

مقدمه: بیماری‌های شریان کرونر به دلیل تجمع رگه‌های چربی در انتیمای عروق اتفاق می‌افتند. امروزه نقش داروهای گیاهی در درمان بیماری‌ها بسیار قابل توجه است. این مطالعه با هدف بررسی میزان توانایی عصاره هیدروالکلی گیاه بیلهر بر کاهش بیان پروتئین CD40 در مقایسه با داروی استاتین صورت گرفت.

روش‌ها: ۳۰ خرگوش نر سفید (۱۲۵۰ تا ۱۵۰۰ گرم) از انستیتو پاستور تهران خریداری گردیدند و به ۵ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. ۴ گروه رژیم غذایی کلسترول ۱ درصد و یک گروه رژیم معمولی بدون کلسترول دریافت کردند. یکی از ۴ گروه تنها کلسترول ۱ درصد و بقیه به ترتیب لووستاتین با دوز ۶ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، عصاره گیاه بیلهر با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و عصاره گیاه بیلهر با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند.

یافته‌ها: بررسی ۳۰ مقطع تهیه شده از آئورت سینه‌ای خرگوش‌های مورد مطالعه، میزان رنگ‌پذیری متفاوتی را در تمام گروه‌ها نشان داد. گروه دریافت کننده عصاره با دوز کم، تفاوت قابل توجهی با گروه دریافت کننده عصاره با دوز زیاد نداشت. گروه شاهد رنگ‌آمیزی بسیار ناچیز و در حد قابل چشم پوشی داشت.

نتیجه‌گیری: عصاره گیاه بیلهر اثرات قابل توجهی در کاهش تولید پروتئین CD40 داشت. این خاصیت گیاه بیلهر می‌تواند به خاطر وجود فلاونوئیدها و آنتی‌اکسیدان‌ها و سایر ترکیبات شناخته شده موجود در این گیاه نظیر فورانوکومارین‌ها باشد.

واژگان کلیدی: بیلهر، CD40، کلسترول، آترواسکلروز، لووستاتین.

مقدمه

مادرزادی قلب هستند (۲). بار اقتصادی ایجاد شده توسط این بیماری‌ها بسیار قابل توجه است و در سال ۲۰۰۶ هزینه‌های مستقیم و غیر مستقیم صرف شده به این دلیل بیش از ۴۰۰ بلیون دلار بوده است (۳). گذشته از بروز گسترده و هزینه‌های فراوانی که آترواسکلروز بر جوامع تحمیل می‌کند، دوره‌ی بالینی وابسته به این عارضه نیز مهم است. دوره‌ی بالینی

بیماری‌های قلبی عروقی علت اصلی و مهم مرگ و میر در تمام دنیا هستند (۱). در ایالات متحده بیشتر از ۷۰ میلیون از افراد بالغ به یک نوع یا بیشتر از بیماری‌های قلبی عروقی مبتلا هستند که عمده‌ترین آن‌ها بیماری‌های کرونری قلب (CHD یا Coronary heart disease)، نارسایی قلبی و نقایص

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۳۸۷۳۰۱ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

^۱ دانشیار، گروه علوم تشریحی و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۲ کارشناس ارشد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران

آستاذ، گروه فارماکونوزی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۴ استادیار، گروه پاتولوژی، دانشکده‌ی دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: ateimourinejad476@gmail.com

نویسنده‌ی مسؤول: احمد تیموری‌نژاد.

Low density lipoprotein) که از عوامل آغازکننده‌ی التهاب می‌باشد، اغلب در نواحی خاصی که وضعیت همودینامیک مناسبی ندارند بروز می‌کند (۹-۱۰).

CD40 یک پروتئین اینتگرال غشایی از خانواده‌ی گیرنده‌ی فاکتور نکروز توموری (TNF) یا Tumor necrotizing factor) است (۱۰)، که به دلیل نقش تعیین کننده در شروع و پیشرفت آترواسکلروز مورد توجه است (۱۱). بیان CD40 علاوه بر سلول‌های ایمنی در بعضی از سلول‌های غیر ایمنی از جمله سلول‌های عضلانی صاف جدار عروق و سلول‌های اندوتلیال ثابت شده است (۱۰، ۱۲). یافته‌ها نشان می‌دهند که LDL اکسید شده (OX-LDL) از طریق گیرنده‌ی خود (LOX-1) مسیر CD40-CD40L را فعال می‌کند که منجر به تحریک واکنش التهابی در سلول‌های اندوتلیال شریان‌های کرونر می‌شود (۱۳).

بیلهر (*Dorema aucheri*) از گیاهان تیره‌ی چتریان است که در اوایل فصل بهار در برخی استان‌ها مانند کردستان، چهار محال بختیاری، کهگیلویه و بویراحمد و فارس رویش دارد (۱۴). گیاهی علفی، پایا، پوشیده از تار و دارای ریشه است و دمبرگ‌های آن دارای غلاف پوشاننده و ساقه و برگ‌های پایینی شامل تقسیمات سه شاخه‌ای عمیق یا سه برگچه‌ای هستند. گل آذین کپه‌ای آن به صورت چتر ساده‌ی کروی و بدون گریبان است و یا برگ‌های گریبان آن بدون دوام هستند و خیلی زود می‌ریزند. گل‌های سفید یا زرد در گل آذین مجتمع هستند که در واقع نوعی خوشه‌ی بسیار گسترده است (۱۵). در گذشته از صمغ حاصل از گیاه در طب سنتی استفاده می‌شده است. همچنین از آن غذاهای محلی تهیه می‌نمودند؛ ولی امروزه بیشتر از این گیاه به عنوان چاشنی استفاده می‌شود. برخی نیز

وابسته به تغییرات آترواسکلروتیک ممکن است به صورت یک باره یا تدریجی اتفاق بیافتد. بعضی از بیماران تا چندین سال علامت بیماری را بروز نمی‌دهند و حتی گاهی مرگ ناگهانی اولین علامت بالینی این بیماران است (۴). این عارضه فرایندی بسیار پیچیده است و به تنهایی نمی‌توان یک عامل خطر را برای آن مشخص نمود؛ چرا که عوامل مختلف با هم درگیر می‌شوند (۵). در سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌تری بر آترواسکلروز صورت گرفته است که اغلب آن‌ها آترواسکلروز را به عنوان یک فرایند التهابی، پویا و در حال تغییر معرفی می‌کنند. در واقع می‌توان با دخالت عوامل پیش‌گیری کننده یا درمانی روند پیشرفت آترواسکلروز را تغییر داد (۶-۷). پلاک آترواسکلروز عبارت است از چربی‌ها، سلول‌های التهابی، اجزای بافت همبندی، سلول‌های عضله صاف و رسوب‌های کلسیم (۷-۸). در مرکز پلاک سلول‌های کف آلود (Foam cell) و قطرات چربی خارج سلولی هستند که یک هسته‌ای را که توسط سلول‌های عضله صاف و ماتریکس کلاژن احاطه شده‌اند درست می‌کنند. سلول‌های T، ماست سل‌ها و ماکروفاژها نیز به این ضایعات نفوذ می‌کنند که این نشاندهنده‌ی فعالیت پلاک است و منجر به تولید سیتوکین‌ها می‌شود (۷). آترواسکلروز اغلب در مکان‌های معینی درون درخت شریانی اتفاق می‌افتد و شرایط موضعی مانند استرس و جریان خون متلاطم در بروز آن نقش آفرینی می‌کنند (۸). همه‌ی شریان‌های اندازه‌ی متوسط و بزرگ شامل کرونر، کاروتید، شریان‌های مغزی و شریان‌های انتهایی بزرگ و آئورت و شاخه‌هایش تحت تأثیر قرار می‌گیرند (۷). تجمع ذرات لیپوپروتئین با دانسیته‌ی پایین (LDL-C) با

شناخته شده‌ی التهاب در ایجاد آترواسکلروز می‌باشد (۲۶). در مطالعات آزمایشگاهی از استاتین با مقادیر کمتر از ۱۰ میلی‌گرم بر حسب کیلوگرم وزن بدن در روز و به طور متوسط ۴-۶ میلی‌گرم بر حسب کیلوگرم وزن بدن در روز در خرگوش‌های دریافت کننده‌ی رژیم پرچرب استفاده شده است (۲۷-۲۸). این مطالعه با هدف بررسی میزان توانایی عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه بیلهر بر کاهش بیان پروتئین CD40 در مقایسه با داروی استاتین صورت گرفت.

روش‌ها

این مطالعه به روش تجربی صورت گرفت. تمام مراحل تحقیق از پایان سال ۱۳۸۷ تا نیمه‌ی سال ۱۳۸۸ و در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان صورت گرفت. در این مطالعه‌ی تجربی از تعداد ۳۰ سر خرگوش نر سفید در محدوده‌ی وزنی ۱۲۵۰ تا ۱۵۰۰ گرم استفاده گردید. خرگوش‌ها از انستیتو پاستور تهران خریداری شدند و در شرایط مطلوب آزمایشگاهی از نظر درجه‌ی حرارت، روشنایی و تاریکی نگهداری شدند. قبل از شروع خوراندن عصاره و رژیم غذایی پر کلسترول، حیوانات به مدت ۱۰ روز جهت سازگار شدن با محیط مطالعه با رژیم معمولی نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها به طور تصادفی به ۵ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. هر کدام از گروه‌ها رژیم غذایی و دارویی تعیین شده را دریافت کردند. گروه‌های مورد مطالعه شامل گروه‌های زیر بودند:

گروه ۱: غذای معمولی دریافت کردند.

گروه ۲: غذای پر کلسترول همراه با عصاره‌ی گیاه بیلهر به مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم بر حسب کیلوگرم وزن بدن در روز دریافت کردند.

گروه ۳: روزانه غذای پر کلسترول و ۴۰۰

عقیده دارند عصاره‌ی این گیاه در پایین آوردن فشارخون مفید است (۱۶). این گیاه سرشار از فلاونوئید است (۱۷). اندام هوایی این گیاه در بین اهالی بومی به عنوان خلط آور و ضد میکروب استفاده می‌شود (۱۸). مطالعاتی که بر روی گیاه دیگری از جنس *Dorema amoniacum* به نام *Dorema* صورت گرفته است، اثرات آنتی‌میکروبیال آن را ثابت کرده است (۱۹-۲۰).

مهم‌ترین ترکیبات موجود در خانواده‌ی چتریان شامل اسانس، رزین، انواع کومارین‌ها، فورانوکومارین‌ها، کرومونوکومارین‌ها، انواع ترین‌ها، ساپونین‌های تری تریپنئیدی و ترکیبات استیلن می‌باشند. در این خانواده آکالوئیدها به ندرت وجود دارد (۲۱). فورانوکومارین‌ها آکالوئید حلقوی حاوی خواص دارویی می‌باشند (۲۰). همچنین نشان داده شده است که فورانوکومارین‌ها میوکارد را در برابر لیپید پراکسیداسیون و آسیب غشایی حفظ می‌کنند (۲۲).

اثرات استاتین بر روی آترواسکلروز طی تحقیقات متعددی انجام شده است. به صورت تیپیک درمان با استاتین می‌تواند کاهش LDL-C را به میزان ۳۰ تا ۴۰ درصد القا کند که منجر به کاهش مرگ و میر ۲۵ تا ۳۰ درصدی می‌شود (۲۳). نتایج آزمایشات نشان داده است که استاتین علاوه بر عمل کاهش دادن کلسترول اثرات مفیدی بر التهاب و پایداری پلاک دارد (۲۴). استاتین کاهش دهنده‌ی حوادث عروقی و مرگ و میر ناشی از این حوادث است (۲۵). ارتباط محکمی بین آترواسکلروز و استاتین وجود دارد. دلایل شناخته شده‌ی این ارتباط شامل اثر کاهش دهندگی کلسترول توسط استاتین و در نتیجه کاهش تشکیل آتروما و اثر مهار کنندگی التهاب توسط استاتین با توجه به نقش

میلی‌گرم بر حسب کیلوگرم وزن بدن عصاره‌ی گیاه بیلهر دریافت کردند.

گروه ۴: غذای پر کلسترول و استاتین به مقدار ۶ میلی‌گرم بر حسب کیلوگرم وزن بدن در روز دریافت کردند.

گروه ۵: غذای پر کلسترول (۱ درصد) دریافت کردند.

خرگوش‌ها، قبل از رژیم درمانی وزن شدند و برای ساخت رژیم غذایی کلسترول دار ۱ درصد، یک گرم پودر کلسترول به ۴ سی‌سی روغن زیتون اضافه گردید و با کمی حرارت به طور کامل حل شد. سپس این مخلوط به ۱۰۰ گرم غذای حیوان اضافه شد.

ساقه‌های گیاه بیلهر استفاده شده جهت این مطالعه، از منطقه‌ی دشت روم در جنوب غربی یاسوج گردآوری شد و بعد از تهیه‌ی هرباریوم و تأیید آن، در سایه و در معرض هوای آزاد خشک گردید. سپس مقدار ۲ کیلوگرم از گیاه خشک شده به وسیله‌ی آسیاب برقی خرد و در اندازه‌ی مناسب الک شد. پس از آن عصاره‌گیری انجام گردید. عصاره‌گیری توسط حلال اتانل/آب به نسبت ۷۰ به ۳۰ درصد و به روش خیساندن انجام شد. در این روش پودر گیاه را در ظرف‌های مخصوص ریخته و هشت برابر پودر بر اساس کیلوگرم، الکل رقیق شده اضافه شد. این مخلوط به مدت ۲۴ ساعت به صورت متناوب توسط همزن ترکیب شد. عصاره‌ی به دست آمده در پایان این مرحله رقیق بود و باید تا حد امکان غلیظ می‌شد تا عصاره‌ی مورد نظر خارج گردد. این مرحله با کمک دستگاه تقطیر در خلأ و پس از آن Freeze dryer صورت گرفت. بعد از محاسبه‌ی مقدار دقیق عصاره، میزان مورد نیاز روزانه در آب مقطر رقیق شده و به

صورت گاوآژ به حیوانات داده شد (۲۹).

طول مدت مطالعه ۶ هفته بود. در مدت زمان دریافت رژیم و به فاصله‌ی هر ۱۵ روز به منظور تعیین دوز مجدد دارو، خرگوش‌ها وزن می‌شدند. در پایان رژیم غذایی و تجویز دارو با تزریق وریدی پنتوباریتال به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر حسب کیلوگرم وزن بدن، حیوانات بیهوش و قربانی گردیدند. سپس قلب خرگوش‌ها با شکافتن قفسه‌ی سینه خارج گردید و آنورت‌های سینه‌ای خرگوش‌ها جداسازی شدند.

نمونه‌ها در فرمالین بافر جهت فیکس شدن قرار داده شدند و پس از ۳ ساعت فرمالین تعویض شد. فرمالین با اتصال متقاطع با پروتئین‌ها، تا حدود زیادی بافت را برای ایمونوهیستوشیمی نزدیک به حد طبیعی حفظ می‌کند تا آنتی‌ژن‌ها بتوانند با آنتی‌بادی واکنش بدهند. سپس آب‌گیری با درجات افزایشی الکل به ترتیب ۷۰، ۸۰ و ۹۰ درصد هر کدام یک ساعت و الکل ۱۰۰ درصد به مدت ۲ ساعت انجام شد. پس از آن، برای شفاف‌سازی بافت، نمونه‌ها در گزین قرار داده شدند. نمونه‌ها در ظرف پارافین مذاب به طور متوالی در دو ظرف اول به مدت ۱/۵ ساعت و در ظرف دوم ۲ ساعت قرار گرفتند. سپس قالب‌گیری در قالب‌های L مانند انجام شد و پس از آن قالب‌های حاوی نمونه‌ی آنورت در فریزر گذاشته شدند تا جهت مقطع‌گیری آماده شدند. به وسیله‌ی میکروتوم (Leitz-Germany) مقاطعی با ضخامت ۴ میکرون تهیه گردید. مقاطع به دست آمده در آب و الکل ۴۰ درصد قرار داده شدند. سپس مقاطع در ظرف آب ولرم (بن ماری ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد) قرار داده شدند تا چروکیدگی آن‌ها به طور کامل حذف شود. نمونه‌ها بر روی لام چسب‌دار انتقال داده شدند. برای

دیگر به HRP متصل است که قادر است دی‌آمینوبنزیدین (DAB) را اکسید کند. نتیجه‌ی این واکنش تولید یک رسوب غیر محلول قهوه‌ای رنگ است که در زیر میکروسکوپ قابل دیدن می‌باشد. سلول‌هایی که حاوی پروتئین CD40 باشند، رنگ قهوه‌ای را از خود نشان می‌دهند که در زیر میکروسکوپ قابل دیدن می‌شوند (۳۰)

رنگ آمیزی زمینه‌ی لام‌ها با همتوکسیلین به مدت ۳ ثانیه انجام شد، در این رنگ آمیزی، هسته به رنگ آبی در می‌آید و سپس با آب معمولی شستشو داده شدند. این عمل برای حذف رنگ‌های اضافی انجام گرفت.

کوپلین‌های حاوی نمونه‌ها در محلول آب آمونیاک ۲۵ صدم درصد (۲۵ میکرولیتر از محلول آمونیاک خالص با ddH₂O ۱۰۰ میلی‌لیتر) فرو برده شدند، هدف از این مرحله، تشدید رنگ آبی زمینه‌ای بود که در مرحله‌ی قبلی با همتوکسیلین ایجاد شده بود. لام‌ها در محیط آزاد به مدت ۱۰ دقیقه خشک شدند. سپس مانع کردن لام‌ها صورت گرفت. برای این کار ابتدا چسب هیستومانت روی لام‌ها چکانده شد و سپس لامل بر روی آن‌ها قرار داده شد. لام‌های آماده شده به وسیله‌ی میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ و ۴۰۰ برابر مشاهده گردیدند. در هر لام، چند ناحیه‌ی غیر همپوشانی شونده مشاهده شد و شمارش سلول‌های رنگ گرفته انجام شد. محاسبه‌ی میانگین نواحی مشاهده شده در هر لام به عنوان میزان رنگ پذیری آن تعیین شد. درصد سلول‌های رنگ گرفته در هر نمونه به این ترتیب گزارش شدند: اگر تعداد سلول‌های رنگ گرفته کمتر از ۱۰ درصد بود - یا عدم بروز پروتئین، اگر بین ۱۰ تا ۳۵ درصد بود + یا خفیف، اگر بین ۳۵ تا

پارافین‌زدایی، لام‌های حاوی نمونه به مدت ۴۵ دقیقه در فور ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد گذاشته شدند. شفاف‌سازی در سه ظرف گزین به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. با استفاده از الکل‌های نزولی ۱۰۰، ۹۰، ۸۰، ۷۰ و ۵۰ درصد و آب مقطر، آب‌دهی انجام گردید. پس از خشک شدن لام‌ها در دمای اتاق، کوپلین حاوی لام‌ها در بافر سیترات با PH = ۶ قرار داده شد. بافر سیترات خالص قبل از استفاده کردن به نسبت یک به ۲۰ رقیق گردید. پس از آن برای عمل ماسک‌زدایی، نمونه‌ها که در داخل کوپلین و ظرف بافر سیترات بودند در دستگاه ماکروویو قرار داده شدند و پس از ۵ دقیقه دوباره ظرف محتوی نمونه‌ها از بافر سیترات پر شد. به مدت ۲۰ دقیقه این مرحله انجام گرفت. لازم به ذکر است که طی روند فیکساسیون و یا پردازش بافتی ممکن است محل‌های اپی‌توپ بافتی که باید با آنتی‌بادی واکنش بدهند دچار پوشش شوند که با استفاده از ماکروویو با درجه‌ی حرارت ۹۵-۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد عمل ماسک‌زدایی صورت می‌گیرد تا واکنش بهتری در مراحل بعدی با آنتی‌بادی انجام بگیرد. بر روی هر لام دو قطره آب اکسیژنه (0.9 cc H₂O₂ + 9.1 ddH₂O 0.9% H₂O₂) چکانده شد. این عمل برای مهار کردن پراکسیدازهای آندوژن بافتی انجام شد. سپس نمونه‌ها در بافر فسفات سالین (PBC) با pH = ۷/۲ (pBS 1 cc + 19 cc ddH₂O) قرار گرفتند. نمونه‌ها با آنتی‌بادی مونوکلونال CD40 (Zymed usA) و پس از شستشو با آنتی‌بادی ثانویه، انکوبه شدند. دو قطره محلول استرپتوآویدین بر روی هر یک از لام‌ها چکانده شد. استرپتوآویدین به خاطر وجود آویدین تمایل زیادی به بیوتین دارد و از طرف

کمی نیز در حد متوسط رنگ پذیری داشت (شکل‌های ۳-۱). سلول‌های عضلانی ناحیه‌ی زیر ضایعه نیز در رنگ آمیزی مثبت شد.

بحث

در نتایج به دست آمده در این مطالعه تفاوت قابل توجهی بین گروه دریافت کننده‌ی کلسترول با سایر گروه‌ها مشاهده شد. گروه دریافت کننده‌ی استاتین با گروه شاهد بسیار شبیه بود و همچنین اختلاف قابل توجهی بین گروه‌های دریافت کننده‌ی عصاره‌ی کم و زیاد وجود نداشت. درصد رنگ پذیری لام‌های آماده شده از نمونه‌های دریافت کننده‌ی عصاره در تمام لام‌ها کمتر از دریافت کننده‌های کلسترول بود و این میزان در نمونه‌های دریافت کننده‌ی استاتین کمتر از دریافت کننده‌های عصاره بود.

همچنین نتایج به دست آمده از گروه دریافت کننده‌ی کلسترول که هیچ دارویی دریافت نکرده بودند، نشان داد که بیان CD40 به عنوان یک عامل پیش برنده‌ی التهاب و القا کننده‌ی مواد پیش التهابی، به هنگام دریافت غذای پر کلسترول افزایش می‌یابد (۳۱).

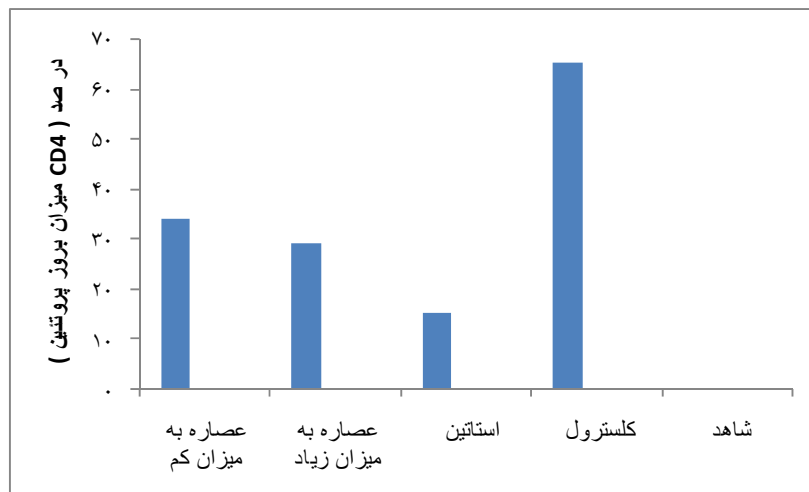
۵۵ درصد بود ++ یا متوسط و اگر بالاتر از ۵۵ درصد بود +++ یا شدید در نظر گرفته شد (۳۰). داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

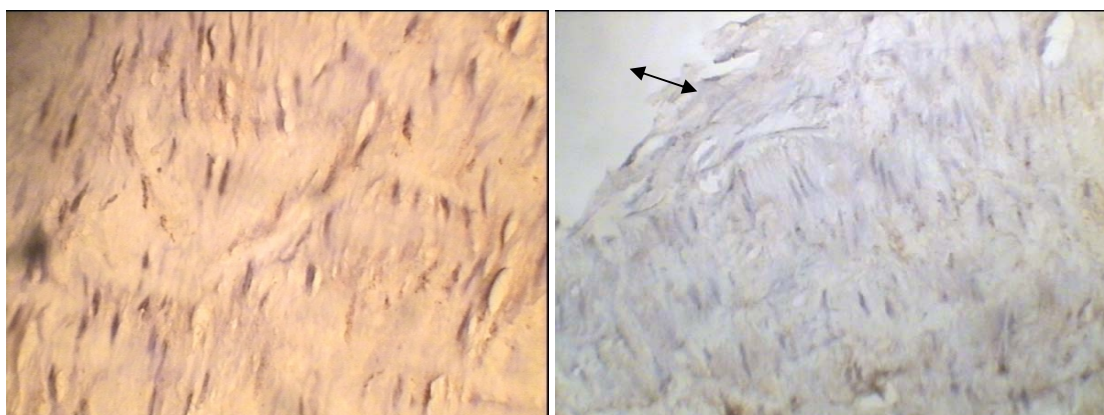
مطالعه بر روی ۳۰ قطعه از بافت‌های آئورت سینه‌ای در مقاطع طولی و عرضی صورت گرفت. در نمودار ۱ درصد رنگ پذیری گروه‌ها آمده است. گروه شاهد یا فاقد بیان CD40 در سلول‌های جدار رگ بود یا میزان رنگ پذیری آن خیلی جزئی بود. در گروه دریافت کننده‌ی عصاره به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مقادیر متفاوتی از رنگ پذیری مشاهده شد و در مجموع تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های دریافت کننده‌ی عصاره به میزان کم و زیاد وجود نداشت ($P < 0/05$).

در گروه دریافت کننده‌ی استاتین نیز اکثر نمونه‌ها در طبقه‌ی خفیف قرار گرفت.

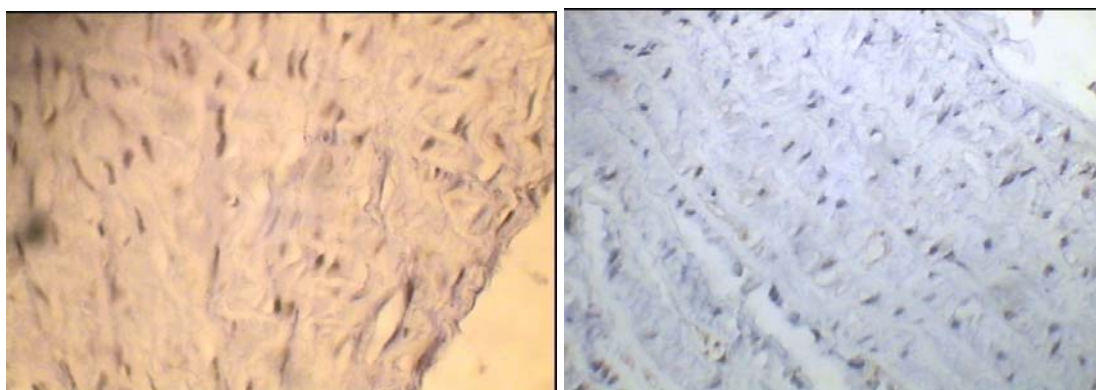
در خرگوش‌هایی که تنها کلسترول دریافت کرده بودند، اغلب لام‌های تهیه شده در حد زیاد و تعداد



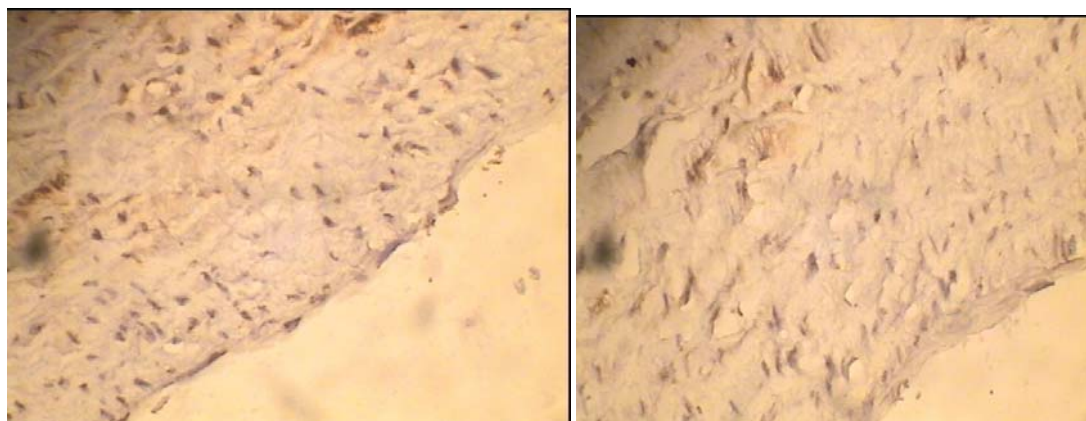
نمودار ۱. میانگین میزان بروز پروتئین CD40 در آئورت سینه‌ای خرگوش‌ها در گروه‌های مختلف



شکل ۱. رنگ آمیزی ۷۰ درصدی به روش ایمنوهیستوشیمی با بزرگ‌نمایی $100\times$. پلاک در تصویر سمت راست (پیکان دو طرفه ضخامت رگه‌ی چربی را نشان می‌دهد) نیز مشاهده می‌شود (لام تهیه شده از خرگوش شماره‌ی ۲۸).



شکل ۲. مقاطع تهیه شده از نمونه شماره‌ی ۴ از گروه شاهد منفی در سمت راست و نمونه‌ی شماره‌ی ۲۰ از گروه دریافت‌کننده‌ی استاتین که به ترتیب عدم بروز و بروز ۱۰ درصدی پروتئین CD40 را نشان می‌دهند ($100\times$).



شکل ۳. لام‌های تهیه شده از نمونه شماره‌ی ۵ (دریافت‌کننده‌ی عصاره با دوز پایین) و نمونه‌ی شماره‌ی ۱۵ که به ترتیب بروز ۵۰ و ۳۰ درصدی پروتئین CD40 را نمایش می‌دهند.

اکسیداسیون LDL است. ماکروفاژهایی که در انتیما تجمع کرده‌اند این لیپوپروتئین اکسید شده را می‌بلعند و رفته رفته به سلول‌های کف آلود تبدیل می‌شوند (۳۶). به دنبال اتصال CD40 به لیگاندها، تحریک ماکروفاژها و تولید فاکتورهای نظیر ۱۵ لیپوآکسیژناز و یون سوپراکسید صورت می‌گیرد که در اکسید شدن LDL مشارکت دارند (۳۷). اثر استاتین در روند کنترل آترواسکلروز همراه با کاهش بیان CD40 است (۳۸-۳۹) در واقع استاتین‌ها علاوه بر کاهش سنتز کلسترول و نقشی که در پایین آوردن چربی خون دارند اثر ضد التهابی نیز در کنترل فرایند آترواسکلروز از خود بروز می‌دهند که بخشی از آن نتیجه‌ی مهار CD40 توسط این دارو است (۴۰). آنتی اکسیدان‌ها در مهار اکسیداسیون لیپوپروتئین‌ها و در نتیجه کاهش قدرت آسیب‌زایی آن‌ها نقش برجسته‌ای دارند و گیاهان گوناگون به ویژه گیاهان تیره‌ی چتریان به خاطر دارا بودن فلاونوئیدها می‌توانند به خوبی اثرات آنتی‌اکسیدان داشته باشند (۱۷).

در مورد اثرات پایین آورنده‌ی چربی گیاهان تیره‌ی چتریان مطالعاتی صورت گرفته است که از جمله مهم‌ترین آن‌ها مطالعه روی اثرات گیاه شوید است. در این مطالعه اثر کاهش دهنده‌ی چربی توسط این گیاه اثبات شده است (۴۱). در مطالعه‌ی دیگری، عصاره‌ی گیاه بیلهر توانست میزان کلسترول و تری‌گلیسریدها را در موش‌های صحرایی به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش دهد (۴۲). به نظر می‌رسد فورانوکومارین‌ها و فلاونوئیدهای موجود در ترکیبات گیاه بیلهر محافظت‌کننده‌ی سیستم قلبی عروقی در مقابل عوامل آسیب‌رسان باشند که از جمله مهم‌ترین آن‌ها LDL اکسید شده است.

نکته‌ی مهم دیگر این که بیان پروتئین CD40 در سلول‌های عضله‌ی صاف جدار رگ همان گونه که پیش از این نیز به اثبات رسیده است، مشاهده گردید (۳۱). با توجه به این که آترواسکلروز واجد مشخصه‌ی بیماری‌های التهابی مزمن است می‌توان گفت که بخشی از این التهاب حاصل عملکرد اتصال‌ی CD40 است. بیان CD40 منجر به آغاز یک سری فرایندهای مرتبط با آترواسکلروز می‌گردد (۳۲) که از جمله‌ی این فرایندها، تولید سیتوکین‌هایی مانند فاکتور نکروز توموری آلفا و اینترلوکین-۱ بتا و اینترلوکین-۶ و اینترلوکین-۸ می‌باشد (۳۳). اینترلوکین-۱ بتا و فاکتور نکروز تومور آلفا به طور متقابل بیان CD40 را در سلول‌های مرتبط با ضایعه افزایش می‌دهند (۳۴). به دنبال بیان CD40 در اندوتلیوم، بیان مولکول‌های چسبنده‌ی E-Selectin و مولکول چسبنده‌ی سلول عروقی-۱ (VCAM-1) و مولکول چسبنده‌ی بین سلولی (ICAM-1) افزایش می‌یابد (۳۵). و راه را برای ورود بیش از پیش سلول‌های التهابی به جدار رگ هموار می‌کند. بیان CD40 باعث تحریک سلول‌های عضلانی جدار رگ نیز می‌شود که نتیجه‌ی آن ترشح سیتوکین‌های پیش التهابی و بیان مولکول‌های چسبنده توسط این سلول‌ها می‌باشد (۳۵). در طی فرایند آتروژنیک (فرایند آتروژنیک شامل تمام مراحل پیچیده‌ای است که منجر به تجمع چربی در ناحیه‌ی زیر اندوتلیوم عروق می‌شود و ابتدا به صورت نقطه‌های چربی خود را نشان می‌دهد. با پیوستن این ذرات چربی به هم رگ‌های چربی تشکیل می‌شوند. و با پیشرفت این روند، بافت فیبرو نیز به آن اضافه شده، پلاک را تشکیل می‌دهد) پروتئین CD40 به مقدار زیادی بیان می‌شود که در ارتباط با

نتیجه‌گیری

کاهش بیان CD40 در نمونه‌های دریافت کننده‌ی عصاره ممکن است به دلیل مشابهت عملکردی آن با استاتین، یعنی پایین آوردن سطح لیپوپروتئین‌های پلاسما و مهار التهاب باشد.

تشکر و قدردانی

این طرح به شماره‌ی ۳۸۷۳۰۱ با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام گردید که بدین‌وسیله از این معاونت تشکر می‌نماییم.

References

1. American Heart Association (AHA): Heart disease, diet and nutrition [Online]. 2006; Available from: URL: <http://www.heart.Orgl-presenter.org/>.
2. American Heart association (AHA): Primary prevention [Online]. 2006; Available from: URL: <http://www.heart.Orgl-presenter.org/>.
3. American Dietetic Association (ADA).analysis library on hyperlipidemia [Online]. 2006; Available From: URL: <http://www.eat.right.org/>.
4. Athyros VG, Ganotakis ES, Elisaf MS, Liberopoulos EN, Goudevenos IA, Karagiannis A. Prevalence of vascular disease in metabolic syndrome using three proposed definitions. *Int J Cardiol* 2007; 117(2): 204-10.
5. Aygun AD, Gungor S, Ustundag B, Gurgoze MK, Sen Y. Proinflammatory cytokines and leptin are increased in serum of prepubertal obese children. *Mediators Inflamm* 2005; 2005(3): 180-3.
6. Badimon L, Martinez-Gonzalez J, Llorente-Cortes V, Rodriguez C, Padro T. Cell biology and lipoproteins in atherosclerosis. *Curr Mol Med* 2006; 6(5): 439-56.
7. Barter PJ, Rye KA. The rationale for using apoA-I as a clinical marker of cardiovascular risk. *J Intern Med* 2006; 259(5): 447-54.
8. Bartolucci AA, Howard G. Meta-analysis of data from the six primary prevention trials of cardiovascular events using aspirin. *Am J Cardiol* 2006; 98(6): 746-50.
9. Basu A, Devaraj S, Jialal I. Dietary factors that promote or retard inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(5): 995-1001.
10. Lin R, Liu J, Gan W, Yang G. C-reactive protein-induced expression of CD40-CD40L and the effect of lovastatin and fenofibrate on it in human vascular endothelial cells. *Biol Pharm Bull* 2004; 27(10): 1537-43.
11. Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM, et al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 1992; 357(6373): 80-2.
12. Schonbeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res* 2001; 89(12): 1092-103.
13. Li D, Liu L, Chen H, Sawamura T, Mehta JL. LOX-1, an oxidized LDL endothelial receptor, induces CD40/CD40L signaling in human coronary artery endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(5): 816-21.
14. Zargari A. Pharmaceutical plants. Tehran: Tehran University Press; 1997. p. 212-21. [In Persian].
15. Ghahraman A. Iran choromophites, Umbrella plants. Tehran: Tehran university center publisher; 1999. p. 682-684. [In Persian]
16. Wollenweber E, Dörr M, Rustiyan A. Dorema aucheri, the first umbelliferous plant found to produce exudate flavonoids. *Phytochemistry* 1995; 38(6): 1417-27.
17. Hsiao G, Shen MY, Lin KH, Lan MH, Wu LY, Chou DS, et al. Antioxidative and hepatoprotective effects of Antrodia camphorata extract. *J Agric Food Chem* 2003; 51(11): 3302-8.
18. Sajadi E, Jafari A. Collection, Identificate and primary phytochemical assessment of selected plants from eastern Dena Mountain. Isfahan: Isfahan University of Medical Sciences; 2007. p. 90. [In Persian].
19. Syed M, Khalid MR, Chaudhary FM, Bhatti MK. Antibacterial activity of Umbelliferae. *Carum carvi, Petroselinum crispum and Dorema ammoniacum oils. PJSIR* 1987; 30: 106-10.
20. Rajani M, Saxena N, Ravishankara MN, Desai N, Padh H. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Ammoniacum Gum from Dorema ammoniacum. *Pharmaceutical Biology* 2002; 40(7): 534-41.
21. Afshari-poor S. Treitz & evans pharmacognosy. Isfahan: Medical university of Isfahan; 2007. p. 115-240. [In Persian].
22. Ceska O, Chaudhary SK, Warrington PJ, Ashwood-Smith MJ. Photoactive furocoumarins in fruits of some umbellifers. *Phytochemistry* 1986; 26(1): 165-9.
23. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344(8934): 1383-9.
24. Sukhova GK, Williams JK, Libby P. Statins reduce inflammation in atheroma of nonhuman

- primates independent of effects on serum cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(9): 1452-8.
25. Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, et al. Primary Prevention of Acute Coronary Events With Lovastatin in Men and Women With Average Cholesterol Levels. *JAMA* 1998; 279(20): 1615-22.
 26. Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nature Medicine* 2000; 6: 1399-402.
 27. Chang WC, Yu YM, Hsu YM, Wu CH, Yin PL, Chiang SY, et al. Inhibitory effect of *Magnolia officinalis* and lovastatin on aortic oxidative stress and apoptosis in hyperlipidemic rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 47(3): 463-8.
 28. Zhu BQ, Sun YP, Sievers RE, Isenberg WM, Moorehead TJ, Parmley WW. Effects of etidronate and lovastatin on the regression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Cardiology* 1994; 85(6): 370-7.
 29. Samsam Shariat SH. Extraction of the Effective Material in Plants and Route to Evaluate them. [Thesis]. Isfahan: Isfahan University of Medical Sciences; 1992: p. 15-6. [In Persian].
 30. Hakkinen T, Karkola K, Ylä-Herttuala S. Macrophages, smooth muscle cells, endothelial cells, and T-cells express CD40 and CD40L in fatty streaks and more advanced human atherosclerotic lesions. Colocalization with epitopes of oxidized low-density lipoprotein, scavenger receptor, and CD16 (Fc gammaRIII). *Virchows Arch* 2000; 437(4): 396-405.
 31. Schonbeck U, Mach F, Libby P. CD154 (CD40 ligand). *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32(7): 687-93.
 32. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature* 1998; 394(6689): 200-3.
 33. Robertson AK, Hansson GK. T cells in atherogenesis: for better or for worse? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(11): 2421-32.
 34. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, et al. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(5): 1931-6.
 35. Wagner AH, Guldenzoph B, Lienenluke B, Hecker M. CD154/CD40-mediated expression of CD154 in endothelial cells: consequences for endothelial cell-monocyte interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(4): 715-20.
 36. Schonbeck U, Gerdes N, Varo N, Reynolds RS, Horton DB, Bavendiek U, et al. Oxidized low-density lipoprotein augments and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors limit CD40 and CD40L expression in human vascular cells. *Circulation* 2002; 106(23): 2888-93.
 37. Laman JD, de Smet BJ, Schoneveld A, van MM. CD40-CD40L interactions in atherosclerosis. *Immunol Today* 1997; 18(6): 272-7.
 38. Ylä-Herttuala S. Is oxidized low-density lipoprotein present in vivo? *Current Opinion in Lipidology* 1998; 9(4): 337-44.
 39. Mulhaupt F, Matter CM, Kwak BR, Pelli G, Veillard NR, Burger F, et al. Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) reduce CD40 expression in human vascular cells. *Cardiovasc Res* 2003; 59(3): 755-66.
 40. Diomedede L, Albani D, Sottocorno M, Donati MB, Bianchi M, Fruscella P, et al. In vivo anti-inflammatory effect of statins is mediated by nonsterol mevalonate products. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(8): 1327-32.
 41. Yazdanpanah K. Effects of dill juice on serum low density lipoprotein, triglyceride and high density lipoprotein in patients with hyperlipidemia. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences* 2001; 5(3): 1-4. [In Persian].
 42. Sadeghi H, Mirzaee A, Delaviz H. Antihyperlipidaemic and antihypercholesterolaemic effects of *Dorema aucheri*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2004; 3(1): 59. [In Persian].

The Effect of Hydroalcoholic Extract of *Dorema Aucheri* on CD40 Protein Expression in Thoracic Aorta of Male White Rabbits Fed with Hypercholesterolemic Diet

Gholam Reza Dashti PhD¹, Ahmad Teimourinejad MSc², Mansour Salehi PhD¹,
Seyyed Ebrahim Sajadi PhD³, Nakisa Torabinia MD⁴

Abstract

Background: Coronary artery disease (CAD) is caused by the accumulation of fatty streaks in the intima of vessels leading to atherosclerosis. Nowadays, medicinal herbs are attracting much attention in this field. Hence, the aim of the present research was to compare the effects of hydroalcoholic extract of the *Dorema Aucheri* and statins on CD40 protein expression.

Methods: Thirty white male rabbits (1250-1500 grams) were purchased from the Pasteur Institute of Tehran. The animals were housed in clean metal hutches and acclimatized on rabbit chow for two weeks prior to the commencement of the experiment. The animals were subsequently randomly divided into five groups, each containing six rabbits. The feeding experiment was conducted at room temperature of 28°C. After two weeks, four groups of rabbits were fed with a diet containing 1% cholesterol (hypercholesterolemic diet), hypercholesterolemic diet plus 6 mg/kg lovastatin, hypercholesterolemic diet plus 200 mg *Dorema Aucheri* extract, and hypercholesterolemic diet plus 400 mg *Dorema Aucheri* extract for 45 days. The fifth group only received a normal diet without cholesterol.

Findings: Different levels of staining were observed in the 30 sections taken from the thoracic aorta of the rabbits. However, the two groups that received the extract were not significantly different. The staining was completely inconsiderable in the control.

Conclusion: *Dorema Aucheri* extract had a significant effect on decreasing CD40 proteins formation. This property might be due to the presence of flavonoids, antioxidants and other compounds such as furanocoumarins that have been identified in the plant extract.

Keywords: *Dorema aucheri*, CD40, Cholesterol, Atherosclerosis, Lovastatin.

* This paper is derived from a MSc thesis No. 387301 in Isfahan University of Medical Sciences.

¹ Associate Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

² Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran

³ Perofessor, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Pathology, School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Ahmad Teimourinejad MSc, Email: ateimourinejad476@gmail.com