مقاله پژوهشی

اثرات تیمول در مدل تجربی روماتوئید آرتریت

خدیجه گلبهاری، سید میثم ابطحی فروشانی*

گروه میکروب‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۱۱/۱۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۳/۱۸

چکیده

مقدمه و هدف: امروزه توجه زیادی به ترکیبات گیاهی باقابلیت درمانی شده است. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثرات تیمول در مدل حیوانی روماتوئید آرتریت (RA) است.

مواد و روش‌ها: بیماری RA با استفاده از تزریق ادجوانت فروند کامل در بالشتک کف پای رت‌های ویستار القاء شد. سپس رت‌ها به‌صورت تصادفی در سه گروه بدون تیمار، تیمار شده با تیمول (۱۰۰mg/kg-خوراکی) و یا درمان شده با پردنیزولون (۱۰mg/kg-خوراکی) قرار گرفتند. کلیه درمان‌ها از روز پنجم پس از القاء شروع شد. تغییر قطر ناحیه dorso-plantar دست و پای هر رت تا روز ۲۳ پس از القاء، یک روز در میان ثبت شد.

نتایج: میزان ادم و تورم کف پا در هر دو گروه رت‌های مبتلا و درمان شده با تیمول و یا پردنیزولون به‌صورت تقریباً برابر نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. سطح نیتریک اکسید و آنزیم میلوپراکسیداز سرمی، همزمان با شدت تکثیر لنفوسیت‌های طحالی و میزان تولید سایتوکاین‌های IL-1 و IL-6 در گروه‌های درمانی نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری یافت. میزان کاهش نیتریک اکسید سرمی در گروه دریافت‌کننده تیمول نسبت به گروه دریافت‌کننده پردنیزولون بیشتر بود. در عوض پردنیزولون موجب کاهش بیشتری در سطح سایتوکاین‌های IL-1 و IL-6 نسبت به رت‌های مبتلا و دریافت‌کننده تیمول شد.

نتیجه‌گیری: استفاده از تیمول ممکن است که به‌عنوان یک استراتژی سودمند در کنترل بیماری RA مطرح گردد.

کلمات کلیدی: تیمول، روماتوئید آرتریت، پاسخ‌های ایمنی

مقدمه

روماتوئید آرتریت (RA) یک بیماری خودایمن، به همراه التهاب مزمن در بافت سینوویال مفصل است که منجر به تخریب چندین مفصل و درنهایت ناتوانی شدید می‌گردد (۱). در دو دهه اخیر پیشرفت بیماری به نواحی خارج از مفاصل بخصوص رگ-های کرونر قلب و اختلالات قلبی عروقی به‌عنوان یکی از علل مرگ در بیماران روماتوئید آرتریت تشخیص داده شد (۲). حدود ۱ درصد جمعیت دچار اختلال خودایمنی روماتوئید آرتریت می-باشند (۳). در طول این بیماری طحال و دیگر اندام‌ها نیز متأثر می‌شوند (۴)؛ مانند دیگر بیماری‌های خودایمن، زنان حساس‌ترند (۵). سازوکار کنونی کنترل RA بر پایه استفاده از گلوکورتیکوئیدها و ضدالتهاب‌های غیراستروئیدی است که تأثیرات سوء بسیاری بر استخوان، معده، کلیه و دیگر اندام‌ها بخصوص در استفاده طولانی‌مدت، با دوز بالا دارد به‌طوری‌که مقوله درمان و جلوگیری از پیشرفت بیماری همچنان به‌عنوان یک چالش پیش رو مطرح است؛ بنابراین یافتن راهکارهای مفیدتر جهت تعدیل پاسخ‌های ایمنی و به‌تبع آن دست‌یابی به برنامه درمانی مؤثر در افراد مبتلابه RA ضروری است (۶).

در همین راستا امروزه توجه زیادی به مواد با منشأ گیاهی شده است. اگرچه این گیاهان نیز عاری از عوارض نیستند ولی در بسیاری از موارد ممکن است به دلیل داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی سمیت داروهای دیگر را کم کنند (۷). شایع‌ترین

***نویسنده مسئول: میثم ابطحی فروشانی**، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

Email: sm.abtahi@urmia.ac.ir

https://orcid.org/0000-0003-2579-6618

ترکیبات طبیعی زیست فعال، متابولیت‌های ثانویه گیاهی مانند ترکیبات فنولی هستند. این ترکیبات شامل انواع مختلفی از مواد، شامل هر دو نوع مواد فرار و غیر فرار هستند (۸). در میان ترکیبات غیر فرار اسید فنولیک، فلاونوئیدها و تانن‌ها شایع‌ترین ترکیبات هستند. از میان ترکیبات فرار نیز مشتقات فنولی ترپن‌ها مانند تیمول و ایزومر آن کارواکرول وجود دارد (۹). تیمول توسط فرآیند آروماتیزاسیون γ-terpinene به p-cymene و سپس هیدروکسیله کردن p-cymene بیوسنتز می‌شود (۱۰). تیمول (۲- ایزوپروپیل ۵- متیل فنول) از ترکیبات فنولی مونوترپنوئید اصلی در اسانس‌های روغنی گرفته‌شده از گیاهان متعلق به خانواده نعناییان مانند آویشن معمولی، ریحان و مرزنجوش و همچنین دیگر گیاهان مانند آن‌هایی که متعلق به خانواده شاه‌پسندیان، گل میمونیان، آلاله‌ها و چتریان هستند، است (۱۱). اسانس‌های روغنی حاصل از گونه‌های گیاهی فوق‌الذکر از زمان‌های قدیم در صنایع غذایی به‌عنوان طعم‌دهنده‌ها و مواد نگه‌دارنده به دلیل خواص ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها استفاده شده است (۱۲). تیمول همچنین در فرمولاسیون‌های تجاری برای خاصیت دورکنندگی و ایجاد دافعه برای حشرات استفاده می‌شود (۱۳). فعالیت‌ها و عملکردهای مختلف تیمول مانند خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، بی‌حسی موضعی، تشکیل زخم (Cicatrizing)، آنتی‌سپتیک و خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی آن نشان داده شده است (۱۴). همچنین تأثیر اسانس روغنی حاصله از آویشن معمولی و ترکیبات استحصال‌شده از آن، تیمول و کارواکرول، در مدل‌های آزمایشگاهی از قبیل ادم گوش، التهاب ذات الجنب القاء شده توسط کاراژینان و کموتاکسی در شرایط آزمایشگاهی موردمطالعه قرار گرفته است (۱۵). یافته‌های محققین در رابطه با نوتروفیل‌های انسانی به این موضوع دلالت دارد که تیمول یک آنتی‌اکسیدان بالقوه و عامل ضدالتهابی در سلول‌های انسانی است (۱۴). درنتیجه استفاده از تیمول به‌عنوان یک ماده دارای اثرات بالقوه ضدالتهابی قوی با منشأ گیاهی و با عوارض جانبی بسیار کمتر ممکن است که به‌عنوان روش درمانی جدیدی برای درمان روماتوئید آتریت مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

جامعه موردمطالعه و گروه‌های آزمایش و شاهد

جامعه موردمطالعه، شامل ۴۰ رأس رت نر ویستار با محدوده وزنی (۷±۱۵۰ گرم) بود که از حیوان خانه دانشکده دامپزشکی خریداری شد. این رت‌ها در شرایط استاندارد آب، غذا، دما و نور کافی بر اساس پروتکل‌های بین‌المللی استفاده از حیوانات آزمایشگاهی نگهداری شدند. پس از طی زمان موردنظر برای تطابق رت‌ها (۱ هفته)، حیوانات به‌صورت تصادفی و به ترتیب زیر تقسیم شد. گروه A (گروه شاهد) شامل ده رت سالم که تحت هیچ تیماری قرار نگرفت. این رت‌ها هم‌زمان با رت‌های گروه مبتلا پلاسبو (فسفات بافر سالین (PBS) حاوی ۳۰ درصد اتانول در حجم ۱ml) دریافت نمودند. سایر رت‌ها پس از القاء بیماری RA در آن‌ها، به‌صورت تصادفی و به‌صورت زیر تقسیم شدند. گروه B (گروه شاهد RA بدون درمان) رت‌های این گروه از روز پنجم بعد ایمن‌سازی به‌صورت روزانه و خوراکی بافر PBS حاوی ۳۰ درصد اتانول (در حجم ۱ ml) دریافت نمودند. گروه C (گروه RA، درمان تیمول) شامل ده رت بود که از روز پنجم بعد ایمن‌سازی به‌صورت روزانه و خوراکی تحت درمان با تیمول (۱۰۰ mg/kg، در حجم ۱ml در PBS حاوی ۳۰ درصد اتانول؛ شرکت سیگما-آمریکا) قرار گرفتند. گروه D (گروه RA و درمان شده با پردنیزولون؛ داروسازی ابوریحان-ایران) شامل ده رت بود که از روز پنجم بعد ایمن‌سازی به‌صورت روزانه و خوراکی تحت درمان با پردنیزولون (۱۰ mg/kg، در حجم ۱ml در PBS حاوی ۳۰ درصد اتانول) قرار گرفتند. انتخاب دوز تیمول و پردنیزولون بر مبنای مطالعات قبلی در مدل‌های التهابی در رت‌های ویستار بود (۱۶، ۱۷).

القای RA در رت‌های نژاد ویستار: به این منظور ۰/۱ml ادجوانت کامل فروند (Sigma Aldrich - آمریکا) که محتوی ۱۰mg/kg پیکره کشته مایکوباکتریوم به داخل بالشتک کف پای رت‌ها تزریق شد (۱۸). تغییر قطر ناحیه dorso-plantar دست و پای هر رت از روزهای پنجم تا بیست و سوم بعد از ایمن‌سازی، یک روز در میان ثبت شد.

تهیه کشت سلولی طحال و سنجش سایتوکاین‌ها در سوپ رویی کشت طحال

در روز تا بیست و سوم بعد از ایمن‌سازی و پس از خون‌گیری از رت‌ها، طحال آن‌ها تحت شرایط استریل خارج شد. سپس بافت طحال در ۵ ml محیط RPMI-1640 (ایالات‌متحده Sigma;) حاوی ۱۰ درصد FBS (آلمان Gibco;) قطعه‌قطعه و له‌شده و از توری سیمی به قطر ۰/۰۲ml عبور داده شد و سوسپانسیون سلولی حاصل، به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ

گردید. روی رسوب سلولی حاصل ml ۵ بافر لیز کننده RBC افزوده شد. پس از ۵ دقیقه، با افزودن ml۱۰ محیط کشت دوباره ۱۰ دقیقه در دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس رسوب سلولی در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد FBS به حالت سوسپانسیون درآمد. به دنبال شمارش سلول‌ها، سوسپانسیونی حاوی ۱×۱۰^{۶}cell/ml تهیه شد و µl۱۰۰ از آن در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته شد. سلول‌ها در حضور µl۵۰ از محلول فیتوهماگلوتینین (mg/ml ۱) به مدت ۷۲ ساعت کشت شدند (۱۹، ۲۰). پس از طی این مدت مایع رویی آن‌ها جمع‌آوری شد. برای سنجش سایتوکاین‌های TNF-α و IL-1 از کیت‌های الایزای مربوطه (شرکت Peprotech – بریتانیا) و بر طبق دستورالعمل مندرج در دفترچه راهنمای هرکدام از آن‌ها اقدام گردید. به‌منظور اطمینان از حصول نتیجه مناسب، برای هر نمونه ۳ خانه در نظر گرفته شد. ملاک موردنظر جهت اطمینان صحت کار عدم اختلاف بیش از ۲۰٪ هر یک از تکرار نمونه‌ها با میانگین محاسبه شده بود.

بررسی میزان تکثیر لنفوسیت‌های موجود در بین جمعیت سلول‌های طحالی با روش MTT

پس از طی مراحلی که در بالا توضیح داده شد، به دنبال شمارش سلول‌ها، سوسپانسیونی حاوی ۱×۱۰^{۶}cell/ml تهیه شد و µl ۱۰۰ از آن در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته شد. برای هر نمونه سه تکرار در حضور µl۵۰ از محلول فیتوهماگلوتینین (mg/ml ۱) 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 در گرمخانه دارای ۵ درصد CO_2 به هر چاهک µl۲۵ محلول MTT (mg/ml ۵ در PBS) افزوده‌شده، به مدت ۴ ساعت دیگر گرمخانه گذاری گردید. در این مدت احیاء ماده MTT (۳- (۴، ۵- دی متیل تیازول- ۲-ایل)-۲، ۵- دی فنیل تترازولیوم بروماید) توسط سلول‌های زنده و در حال تکثیر سبب تشکیل کریستال‌های فورمازون گردید که با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به حالت محلول در آمد. سپس شدت رنگ در طول‌موج nm۴۹۰ تعیین و ایندکس تحریک بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید (۲۱):

$$\text{ایندکس تحریک} = \frac{\text{بلانک OD– در حضور } ODPHA}{\text{بلانک OD– درعدم حضور ODPHA}}$$

سنجش نیتریک اکسید

میزان تولید نیتریک اکسید توسط روش رنگ سنجی گریس (Griess) و استفاده از منحنی استاندارد نیتریت سدیم تعیین گردید. به‌طور خلاصه، پس از اخذ سرم از رت‌های موردمطالعه در روز ۲۳ پس از ایمن‌سازی، µL۱۰۰ ازسرم به‌صورت دوتایی به داخل چاهک‌های پلت ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته شد. سپس µL ۱۰۰ از محلول ۱ درصد سولفانیل آمید (شرکت Sigma - آمریکا) به چاهک‌ها اضافه شد. پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق نگاه‌داری شد. آنگاه به تمام حفره‌ها µL۱۰۰ از محلول ۱ درصد N-۱-۱- نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدرو کلراید (شرکت Sigma) اضافه شد و بار دیگر به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق نگاهداری شد. درنهایت جذب نوری نمونه در طول‌موج ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا نگار قرائت گردید. هم‌زمان با استفاده از غلظت‌های مختلف نیتریت سدیم منحنی استاندارد ترسیم‌شده و از طریق رگرسیون و معادله خطی، غلظت نیتریت موجود در نمونه‌ها تعیین گردید (۲۲).

سنجش فعالیت میلوپراکسیداز (MPO) در سرم

در این روش مقدار آنزیم میلوپروکسیداز موجود در سرم با ۳،۳′،۵،۵′ تترا متیل بنزیدین (TMB) واکنش می‌دهد. طی این واکنش ۳،۳′،۵،۵′ تترا متیل بنزیدین به‌عنوان دهنده یون هیدروژن برای احیا H_2O_2 توسط میلوپروکسیداز عمل می‌کند. درنتیجه ۳،۳′،۵،۵′ تترا متیل بنزیدین به ۳،۳′،۵،۵′ تترا متیل بنزیدین دیمین تبدیل می‌گردد که باعث بروز یک رنگ آبی تا سبز می‌گردد. با افزودن اسیدسولفوریک واکنش متوقف می‌شود و رنگ محلول به زرد تا زرد کمرنگ تبدیل می‌گردد (۲۳). به‌طور خلاصه µL ۱۰ ازسرم با µL ۸۰ از H_2O_2 و ۰/۷۵ mM از محلول TMB ﴿TMB ۲/۹ mM در ۱۴/۵٪ DMSO و ۱۵۰ mM بافر فسفات با pH=5.4﴾ مخلوط شد. در ادامه پلیت به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شده و واکنش با افزودن µL ۵۰ از محلول ۲M اسیدسولفوریک به هر چاهک متوقف شد. درنهایت نمونه‌ها در طول‌موج nm ۴۵۰ توسط الایزا ریدر خوانده شد (۲۳).

تحلیل آماری

پس از اطمینان از توزیع نرمال داده‌ها (آزمون کولموگروف–اسمیرنف، Kolmogorov–Smirnov test) جهت مقایسه داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و Tukey's test استفاده شد. در تمام بررسی‌ها $p<۰/۰۵$ به‌عنوان سطح معنی‌دار

در نظر گرفته شد. کلیه بررسی‌های آماری در محیط نرم‌افزاری SPSS ویراست ۲۱ انجام شد و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel (ویراست ۲۰۱۷) استفاده شد. کلیه داده‌ها به‌صورت Mean±SD گزارش گردید.

نتایج

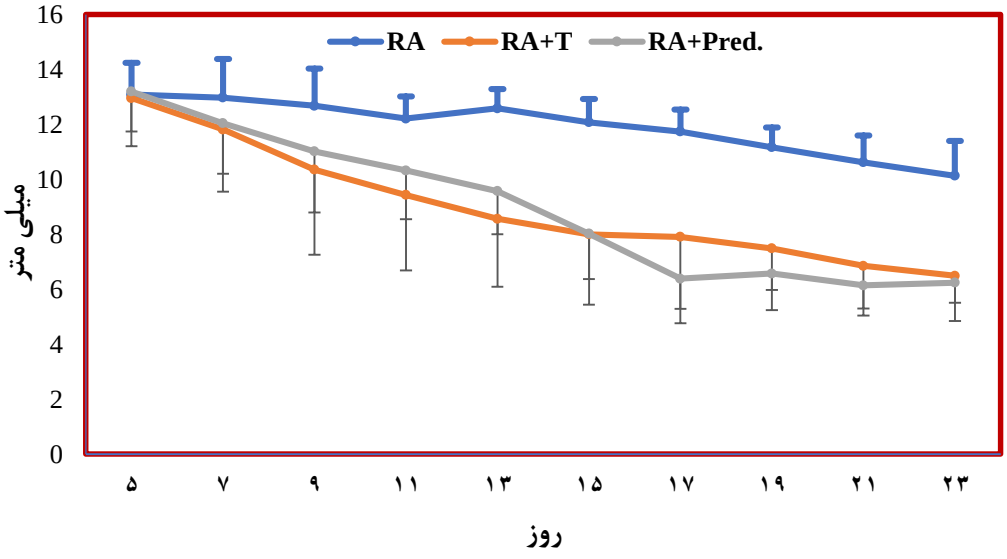
تزریق داخل بالشتک کف پا با ادجوانت کامل فروند منجر به افزایش قابل‌توجه و معنی‌دار در قطر ناحیه پنجه پای رت‌های ایمن شده و بدون تیمار گردید (شکل ۱).

بر اساس اطلاعات نمودار ۱ مشخص است دریافت تیمول یا پردنیزولون منجر به کاهش و معکوس شدن روند تغییرات متوسط قطر کف پای رت‌های مبتلا شد، به‌طوری‌که از روز ۱۳ پس از القاء این روند کاهشی کاملاً با گروه مبتلا و بدون درمان معنی‌دار بود. بااین‌حال تفاوت معنی‌داری در دو گروه درمان شده با تیمول یا پردنیزولون دیده نشد (نمودار ۱).

ماده MTT توسط لنفوسیت‌ها برداشت‌شده و براثر فعالیت میتوکندریایی سلول‌های لنفوسیت به کریستال‌های آبی‌رنگ فورمازان تبدیل می‌گردد که به دنبال آن با افزودن دی متیل



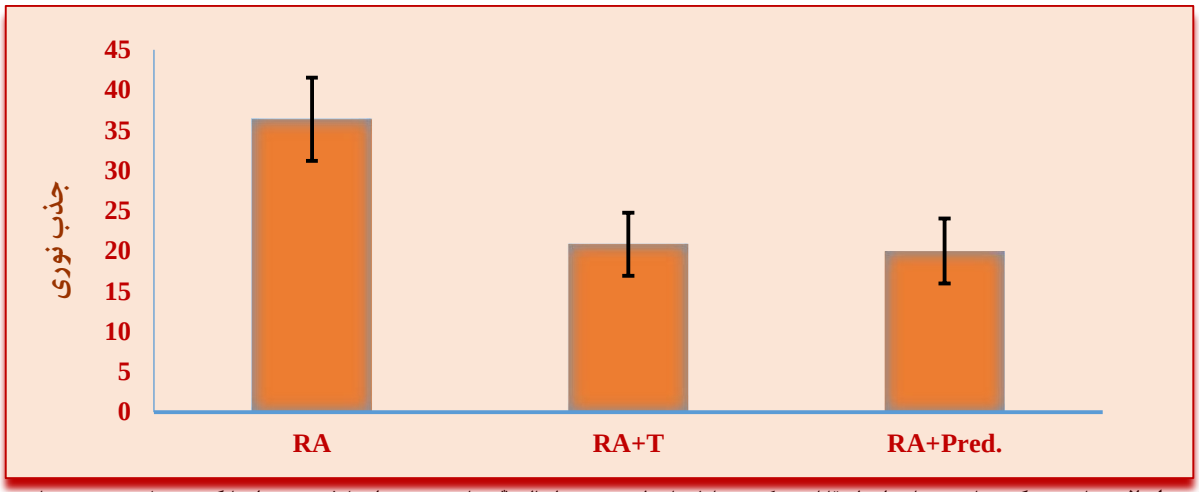
شکل ۱- تورم مفصل مشاهده شده در روز هفتم پس از القاء بیماری در گروه مبتلا و بدون درمان



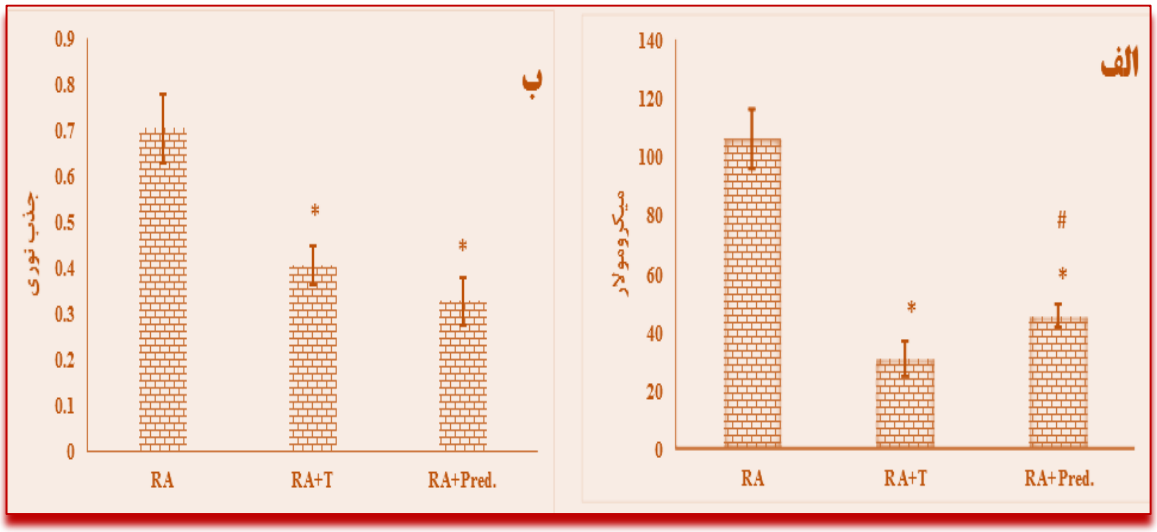
نمودار ۱- ارزیابی تغییرات محیط تارسوس بین گروه‌ها.* نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه مبتلا و بدون درمان در سطح ($P<0.05$) است. (RA: گروه مبتلا و بدون درمان، RA+T مبتلا و درمان شده با تیمول، .RA+Pred مبتلا و درمان شده با پردنیزولون).

سولفوکساید کریستال‌ها آزادشده و میزان جذب نوری که متناسب با میزان تشکیل کریستال‌ها خواهد بود؛ بنابراین هرچقدر که قابلیت تکثیر لنفوسیت بیشتر باشد درنهایت میزان فورمازان بیشتر و جذب نوری بیشتری ایجاد خواهد شد (۲۴). مطابق نمودار ۲، کلیه درمان‌ها موجب کاهش معنی‌دار قابلیت تکثیر لنفوسیتی در سلول‌های طحال شده بود. در اینجا

تست گریس یک ارزیابی کلی از میزان تولید نیتریک اکسید (واسطه فعال نیتروژن) توسط سلول‌های ایمنی ذاتی طحال را ارائه می‌دهد (۲۲). نتایج حاصله نشان داد که هر دو درمان موجب کاهش معنی‌دار سطح نیتریک اکساید سرمی نسبت به گروه شاهد شدند، هرچند که میزان کاهش در گروه دریافت‌کننده تیمول نسبت به گروه درمان شده با پردنیزولون



نمودار ۲- مقایسه‌ی گروه‌های مختلف ازنظر قابلیت تکثیر سلول‌های لنفوسیت طحالی. * نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه مبتلا و بدون درمان در سطح (P<0.001) است. (RA: گروه مبتلا و بدون درمان، RA+T مبتلا و درمان شده با تیمول، RA+Pred. مبتلا و درمان شده با پردنیزولون).



نمودار ۳- مقایسه‌ی گروه‌های مختلف ازنظر میزان سطح نیتریک اکساید سرمی (الف) و میزان فعالیت میلوپراکسیداز سرمی (ب). * نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه مبتلا و بدون درمان در سطح (P<0.001) است. # نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه مبتلا درمان شده با تیمول در سطح (P<0.01) است. (RA: گروه مبتلا و بدون درمان، RA+T مبتلا و درمان شده با تیمول، RA+Pred. مبتلا و درمان شده با پردنیزولون).

پردنیزولون به میزان متوسط ۴۶ درصد و تیمول نیز توانست به میزان ۴۴ درصد موجب کاهش تکثیر لنفوسیت‌های طحالی شد. بااین‌حال بین دو گروه درمانی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (نمودار ۲، p=0.41).

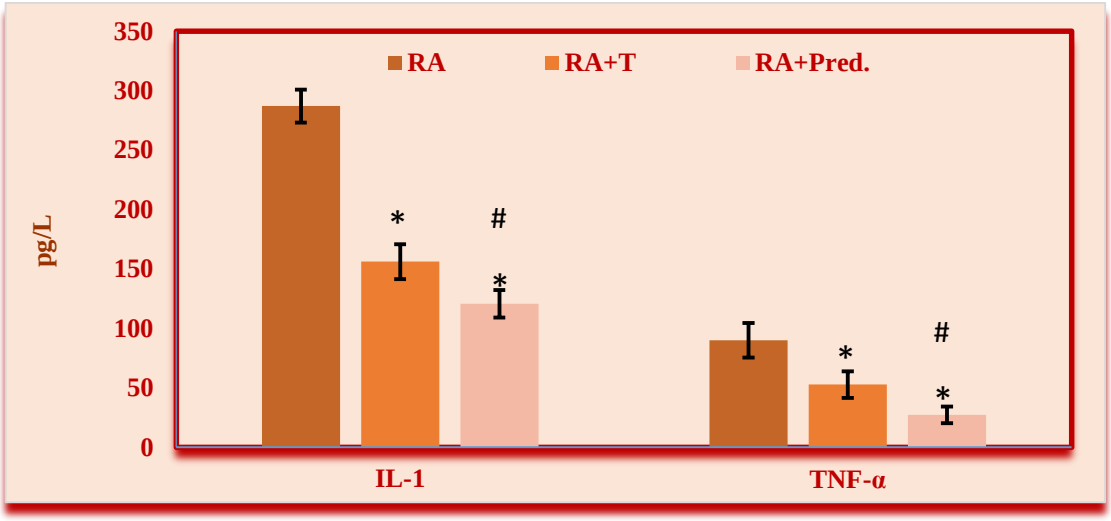
بیشتر بود (نمودار ۳-الف). مقدار میلوپراکسیداز سرمی در رت-های مبتلا و تحت درمان نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (نمودار ۳-ب). باوجودی که میانگین میزان کاهش

در گروه پردنیزولون از گروه دریافت‌کننده تیمول بیشتر بود، ولی تغییر یاد شد ازنظر آماری معنی‌دار نبود (نمودار ۴، p=0.12).

درنهایت هر دو درمان موجبات کاهش سطح سایتوکاین‌های IL-1 و TNF-α نسبت به گروه شاهد شد (نمودار ۴). البته در اینجا، کاهش هر دو سایتوکاین در گروه درمان شده با پردنیزولون نسبت به گروه تیمول به‌طور معنی‌دار بیشتر بود.

غذایی باعث کاهش بیان ژن‌های مرتبط با التهاب مانند ماتریکس متالوپروتئیناز-۹، IL-1β، IL-6، TNF-α، TNF-β در خرگوش‌های مبتلابه هایپرلیپیدمی القاشده با کلسترول شده است (۲۸).

در مطالعات قبلی افزایش سطح سایتوکاین‌های التهابی از قبیل IL-1، IL-12 وTNF-α در سرم موش‌های مبتلابه روماتوئید



نمودار ۴- مقایسه‌ی گروه‌های مختلف ازنظر میزان تولید سایتوکاین‌های IL-1 و TNF-α در مایع رویی کشت سلول‌های طحالی.* نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه مبتلا و بدون درمان در سطح (P<0.001) است. # نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه مبتلا درمان شده با تیمول در سطح (P<0.01) است. (RA: گروه مبتلا و بدون درمان،RA+T مبتلا و درمان شده با تیمول، .RA+Pred مبتلا و درمان شده با پردنیزولون).

بحث

RA القایی با ادجوانت به‌عنوان یک مدل جهت ارزیابی فرایند التهاب مزمن یا تحت مزمن در رت‌ها استفاده شده است. استفاده این مدل راهکار مناسبی جهت ارزیابی ترکیبات جدید دارای خاصیت ضدالتهابی و یا ضد درد است (۲۵، ۲۶). بر اساس یافته‌های به‌دست‌آمده به نظر می‌رسد که تیمول به‌صورت تقریباً همپا با پردنیزولون توانسته است که موجبات کاهش مهم‌ترین علائم بالینی در روماتوئید آرتریت القایی با ادجوانت که همان ادم و تورم ناحیه بالشتک کف‌پایی است را فراهم دارد. اثرات ترمیم‌کننده و بهبودی بخش تیمول درگذشته به‌صورت محدودی در شرایط درون تنی موردمطالعه قرار گرفته است. به‌طور مثال نشان داده شده است که دوز ۱۰۰ mg/kg تیمول باعث کاهش شاخص زخم و مساحت کل ضایعه در مدل تجربی زخم معده القاء شده با اسیداستیک یا اتانول در رت‌ها شده است (۲۷). همچنین نشان داده شده است که تیمول به‌عنوان یک مکمل

آرتریت القایی با ادجوانت و همچنین بیماری RA در انسان نشان داده شده است (۲۹). گزارش‌شده است که افزایش بیان سایتوکاین‌های التهابی TNF-α و IL-1β همزمان با افزایش سطح آن در ناحیه مفصل به‌صورت متناسب با آن در سرم افراد مبتلابه RA نیز اتفاق می‌افتد. TNF-α و IL-1β موجب افزایش تکثیر فیبروبلاست‌ها و تحریک تولید پروستاگلاندین E2 و در تحریک تولید سایر سایتوکاین‌ها و همچنین تولید کلاژن توسط سلول-های سینوویال می‌شود و بدین ترتیب در فرایند تخریب غضروف و استخوان در ناحیه مفصل عمل می‌کند (۳۰). امروزه استفاده از ترکیبات گران‌قیمتی ازجمله گیرنده‌های محلول این سایتوکاین‌ها و یا آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد این سایتوکاین‌ها در امر درمان RA موردتوجه قرار گرفته است (۳۰، ۳۱). خوشبختانه داده‌های ما حاکی از کاهش سطح این دو سایتوکاین به‌صورت معنی‌دار نسبت به گروه شاهد توسط تیمول بود. در

همین راستا قلیجانی و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که تیمول باعث کاهش بیان ژن سایتوکاین‌های IL-1β، TNF-α و فاکتورهای نسخه‌برداری NF-κB، NFAT-1، NFAT-2، c-Fos و c-Jun در ماکروفاژهای فعال‌شده با LPS به‌صورت وابسته به غلظت می‌شود (۳۲).

از طرف دیگر تیمول موجبات اثرات ضد تکثیری لنفوسیتی بیشتری نسبت به پردنیزولون نگردید. تاکنون داروهای زیادی با اثرات ضد تکثیر لنفوسیتی از قبیل آزاتیوپرین و سیکلو فسفامید جهت کنترل RA استفاده شده است. اثرات جانبی فراوانی از قبیل تضعیف شدید سیستم ایمنی و افزایش حساسیت به عفونت‌ها و بدخیمی‌ها هستند (۳۰، ۳۱). به نحو قابل‌توجهی نتایج تست MTT پس از تحریک لنفوسیت‌ها با فیتوهماگلوتینین (یک میتوژن عمومی) نشان داد که تیمول نسبت به پردنیزولون دارای اثرات ضد تکثیری و درنهایت ایمونو ساپرسیو بیشتری نسبت به ترکیب شناخته شده پردنیزولون نیست.

رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن توسط فاگوسیت‌ها نقش مهمی در حذف عوامل بیماری‌زا بازی می‌کند. بااین‌حال زمانی که میزان تولید این رادیکال‌ها بیش‌ازحد باشد و یا تولید آن‌ها در شرایط نامناسب مانند خودایمنی صورت گیرد، این رادیکال-های آزاد منجر به ایجاد و گسترش آسیب‌های بافتی خواهند شد (۳۳). در واکنش‌های ازدیاد حساسیت نوع سوم از قبیل روماتوئید آرتریت، کمپلکس‌های ایمنی تشکیل‌شده ناشی از خود پادتن‌ها و تثبیت کمپلمان موجب فراخوانی سلول‌های فاگوسیتیک و تولیدکننده رادیکال‌های آزاد بالقوه آسیب‌رسان به بافت می‌گردند (۳۴). رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن که در اثر ابتلای بیماری روماتوئید آرتریت تولید می‌گردند علاوه بر ایجاد آسیب بافتی موجب پیشبرد فرایند سیترولینه شدن پروتئین‌های موجود در محیط مفصلی می‌گردد. سیترولینه شدن پروتئین‌ها منجر به بروز اپی‌توپ‌های جدیدی بر روی پروتئین‌های موجود در محیط مفصلی از قبیل کلاژن می‌گردد. این اپی‌توپ‌های جدید موجبات گسترش و تشکیل لنفوسیت‌های خودواکنشگر و تولید اتو آنتی‌بادی علیه پروتئین‌های موجود در ناحیه مفصلی می‌شود (۳۵). در ادامه کمپلکس‌های ایمنی تشکیل‌شده در ناحیه مفصلی به گیرنده‌های FCγ سطح سلول‌های فاگوسیت نفوذ کرده به ناحیه مفصل متصل شده و از طریق پیام‌های تیروزین کینازی موجبات تشکیل تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن را فراهم می‌آورد و بدین ترتیب سیکل معیوبی ایجادشده که منجر به تشکیل بیماری خواهد شد (۳۵). درگذشته به‌خوبی نشان داده شده است که ترکیبات فنولی از قبیل تیمول خواص آنتی‌اکسیدانی داشته و نقش مهمی را در جذب و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن و پروکسی‌نیتریت (۱۴) ایفا می‌کنند.

به نحو قابل‌توجهی نشان داده شده است سلول‌های نوتروفیل و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی مانند منوسیت‌ها حتی قبل از مهاجرت به ناحیه مفصلی فعال‌تر از نوتروفیل‌ها و منوسیت‌های افراد سالم است. این نوتروفیل و منوسیت‌های فعال‌شده نقش مهمی در تولید و افزایش سطوح NO و MPO سرمی در مبتلایان به RA بازی می‌کند (۳۵، ۳۶). این امر ممکن است به دلیل حضور سایتوکاین‌های التهابی در خون محیطی و همچنین حضور اتو آنتی‌بادی‌های سیترولینه‌ی کمپلکس شده با آنتی‌ژن‌های خودی از قبیل کلاژن در خون محیطی باشد (۳۶).

نیتریک اکسید (NO) ازجمله بازیگران مهم در بیماری RA است. درگذشته مطالعات Weinberg و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داده است که بین میزان سطح سرمی NO و شدت بیماری در مبتلایان به RA ارتباط مستقیمی وجود دارد (۳۷). البته به‌صورت قابل‌توجهی نشان داده شده است که سطح سرمی NO در مبتلایان به RA هیچ‌گونه ارتباطی با مصرف ترکیبات حاوی نیترات توسط مبتلایان نداشته است (۳۸)؛ بنابراین کاهش سطح نیتریک اکسید سرمی در فرد یا حیوان مبتلابه RA می‌تواند که به‌عنوان شاخص مناسبی از کاهش شدت بیماری در نظر گرفته شود. بر مبنای نتایج ما تیمول در این زمینه حتی قوی‌تر از پردنیزولون عمل نمود و موجب کاهش بیشتری در سطح NO سرمی شد.

آنزیم میلوپروکسیداز (MPO) یکی از آنزیم‌های پروکسیداز است که در انسان توسط ژن MPO در کروموزوم شماره ۱ کد می‌شود و نقش مهمی در تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارد. درواقع MPO یک پروتئین لیزوزومیک است که در گرانول‌های آزروفیلیک یا اولیه ذخیره‌شده و در صورت تحریک نوتروفیل به علت برخورد با آنتی‌ژن یا التهاب از گرانول‌ها تخلیه می‌شود؛ بنابراین این آنزیم به‌عنوان یکی از شاخص‌های التهاب در نظر گرفته می‌شود (۲۳). مقالات متعددی درگذشته نشان داده‌اند که بین شدت بیماری در مبتلایان به RA و سطح فعالیت سرمی آنزیم میلوپراکسیداز ارتباط منطقی وجود دارد (۳۹). در این زمینه نیز تیمول همپا با پردنیزولون موجب کاهش سطح سرمی

MPO شد. هم‌راستا با نتایج ما چاووهان و کانگ، ۲۰۱۵ نشان دادند که تیمول در دوز ۱۰۰mg/kg باعث کاهش فعالیت آنزیم میلوپرکسیداز (MPO) در بافت هموژنایز شده معده رت‌های مبتلابه زخم معده القاشده با اتانول شده است (۴۰).

درمجموع داده‌های این تحقیق نشان داد که تیمول با توجه به ماهیت ذاتی آنتی‌اکسیدانی خود درزمینه کاهش فاکتور NO به نحو قابل‌توجهی بهتر از پردنیزولون عمل نمود، درحالی‌که پردنیزولون تا حدودی در کاهش سایتوکاین‌های التهابی IL-1 و TNF-α موفق‌تر بود. درمجموع با توجه به اثرات جانبی کم مرتبط با تیمول برخلاف اثرات جانبی گسترده منتسب به ترکیبات گلوکوکورتیکوئیدی به نظر می‌رسد که ممکن است استفاده از تیمول به‌عنوان یک راهکار مناسب برای کنترل بیماری RA مدنظر قرار بگیرد. به‌هرحال مطالعه‌ی حاضر یک مطالعه مقدماتی بوده و لازم است که در آینده مطالعات بیشتری در این زمینه صورت پذیرد.

نتیجه‌گیری

در کل با توجه به نتایج به‌دست‌آمده به نظر می‌رسد که استفاده از تیمول به‌صورت همپا و درمواردی حتی بهتر از پردنیزولون در کاهش علائم روماتوئید آرتریت در مدل تجربی ما مؤثر بوده است؛ بنابراین یافته‌های این تحقیق ممکن است که افق جدیدی را در امر درمان در بیماری‌های التهابی گشوده باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه خانم خدیجه گلبهاری در مقطع کارشناسی ارشد ایمنی‌شناسی (کد ثبت پایان‌نامه: ۹۸۷-۲د، کد اخلاق:۴۵۶/پد/۳) است که با مساعدت دانشگاه ارومیه تهیه شده است. نویسندگان این مقاله از کارشناس محترم آزمایشگاه ایمنی‌شناسی دانشکده دامپزشکی، جناب آقای علیاری نهایت تشکر را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Okamoto H, Koizumi K, Kamitsuji S, Inoue E, Hara M, Tomatsu T, et al. Beneficial action of statins in patients with rheumatoid arthritis in a large observational cohort. The Journal of rheumatology. 2007;34(5):964-8.
2. Georgiadis AN, Voulgari PV, Argyropoulou MI, Alamanos Y, Elisaf M, Tselepis AD, et al. editors. Early treatment reduces the cardiovascular risk factors in newly diagnosed rheumatoid arthritis patients. Seminars in arthritis and rheumatism. 2008;38(1):13-9.
3. Giudetti AM, Gnoni GV. Short-term effect of dexamethasone on fatty acid and cholesterol synthesis in isolated rat hepatocytes. IUBMB Life. 1998;44(3):515-21.
4. Yamanaka H, Sugiyama N, Inoue E, Taniguchi A, Momohara S. Estimates of the prevalence of and current treatment practices for rheumatoid arthritis in Japan using reimbursement data from health insurance societies and the IORRA cohort (I). Modern rheumatology. 2014;24(1):33-40.
5. Zhang W, Zhang J, Zhang M, Nie L. Protective effect of Asarum extract in rats with adjuvant arthritis. Experimental and therapeutic medicine. 2014;8(5):1638-42.
6. Ahmed YM, Messiha BA, Abo-Saif AA. Protective Effects of Simvastatin and Hesperidin against Complete Freund's Adjuvant-Induced Rheumatoid Arthritis in Rats. Pharmacology. 2015;96(5-6):217-25.
7. Zirak Marangalu H, Khezri S, Abtahi M. Improvement in the Function of rat Peripheral Blood Monocytes Following Oral Administration of Curcumin. The Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences. 2017;25(3):171-82.
8. Abbaszadeh S, Sharifzadeh A, Shokri H, Khosravi AR, Abbaszadeh A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. Journal de mycologie medicale. 2014;24(2):e51-6.

9. Nabavi SM, Marchese A, Izadi M, Curti V, Daglia M, Nabavi SF. Plants belonging to the genus Thymus as antibacterial agents: from farm to pharmacy. Food chemistry. 2015;173:339-47.
10. Poulose A, Croteau R. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of γ-terpinene to p-cymene and thymol in Thymus vulgaris L. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1978;187(2):307-14.
11. Mancini E, Senatore F, Del Monte D, De Martino L, Grulova D, Scognamiglio M, et al. Studies on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of five Thymus vulgaris L. essential oils. Molecules. 2015;20(7):12016-28.
12. Lee SJ, Umano K, Shibamoto T, Lee KG. Identification of volatile components in basil (Ocimum basilicum L.) and thyme leaves (Thymus vulgaris L.) and their antioxidant properties. Food Chemistry. 2005;91(1):131-7.
13. Park B-S, Choi W-S, Kim JH, Kim KH, Lee SE. Monoterpenes from thyme (Thymus vulgaris) as potential mosquito repellents. Journal of the American Mosquito Control Association. 2005;21(1):80-3.
14. Braga PC, Dal Sasso M, Culici M, Galastri L, Marceca MT, Guffanti EE. Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems. Pharmacology. 2006;76(2):61-8.
15. Fachini-Queiroz FC, Kummer R, Estevao-Silva CF, Carvalho MDdB, Cunha JM, Grespan R, et al. Effects of thymol and carvacrol, constituents of Thymus vulgaris L. essential oil, on the inflammatory response. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012; 20(12):12016-29.
16. Ribeiro AR, Diniz PB, Pinheiro MS, Albuquerque-Júnior RL, Thomazzi SM. Gastroprotective effects of thymol on acute and chronic ulcers in rats: The role of prostaglandins, ATP-sensitive K^+ channels, and gastric mucus secretion. Chemico-Biological Interactions. 2016;244:121-8.
17. Verhoeven F, Totoson P, Maguin-Gate K, Prigent-Tessier A, Marie C, Wendling D, et al. Glucocorticoids improve endothelial function in rheumatoid arthritis: a study in rats with adjuvant-induced arthritis. Clinical and experimental immunology. 2017;188(2):208-18.
18. Wang X, He X, Zhang C-F, Guo CR, Wang CZ, Yuan CS. Anti-arthritic effect of berberine on adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017;89:887-93.
19. 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. Immunological investigations. 2014;43(1):54-68.
20. Abtahi Froushani SM, gouvarchin Galee HE, Khamisabadi M, Lotfallahzade B. Immunomudulatory effects of hydroalcoholic extract of Hypericum perforatum. Avicenna Journal of Phytomedicine. 2015;5(1):62.
21. Froushani SMA, Zarei L, Ghaleh HEG, Motlagh BM. Estragole and methyl-eugenol-free extract of Artemisia dracunculus possesses immunomodulatory effects. Avicenna journal of phytomedicine. 2016;6(5):526.
22. Shushtari N, Froushani SMA. Caffeine Augments The Instruction of Anti-Inflammatory Macrophages by The Conditioned Medium of Mesenchymal Stem Cells . Cell Journal (Yakhteh). 2017;19(3):415.
23. Pulli B, Ali M, Forghani R, Schob S, Hsieh KL, Wojtkiewicz G, et al. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. PloS one. 2013;8(7):e67976.
24. Jahangiri S, Froushani SMA, Delirezh N. Combination immunotherapy with extract of heated 4T1 and naloxone in mouse model of breast cancer. Turkish journal of medical sciences. 2016;46(2):518-23.
25. Butler SH, Godefroy F, Besson J-M, Weil-Fugazza J. A limited arthritic model for chronic pain studies in the rat. Pain. 1992;48(1):73-81.
26. Besson J, Guilbaud G. The Arthritic Rat as a Model of Chronic Pain. Elsevier, Amsterdam; 1988.
27. Hartmann RM, Martins MI, Tieppo J, Fillmann HS, Marroni NP. Effect of Boswellia serrata on antioxidant status in an experimental model of colitis rats induced by acetic acid. Digestive diseases and sciences. 2012;57(8):2038-44.
28. Yu Y-M, Chao T-Y, Chang W-C, Chang MJ, Lee M-F. Thymol reduces oxidative stress, aortic intimal thickening, and inflammation-related gene expression in hyperlipidemic rabbits. journal of food and drug analysis. 2016;24(3):556-63.
29. Liu Y, Lin H, Zou R, Wu J, Han R, Raymond LN, et al. Suppression of complete Freund's adjuvant-induced adjuvant arthritis by cobratoxin. Acta Pharmacologica Sinica. 2009;30(2):219.
30. Okamoto H, Koizumi K, Kamitsuji S, Inoue E, Hara M, Tomatsu T, et al. Beneficial action of statins in patients with rheumatoid arthritis in a large observational cohort. The Journal of rheumatology. 2007;34(5):964-8.
31. Georgiadis AN, Voulgari PV, Argyropoulou MI, Alamanos Y, Elisaf M, Tselepis AD, et al. editors. Early treatment reduces the cardiovascular risk factors in newly diagnosed rheumatoid arthritis patients. Seminars in arthritis and rheumatism; 2008: Elsevier.
32. Gholijani N, Gharagozloo M, Farjadian S, Amirghofran Z. Modulatory effects of thymol and carvacrol on inflammatory transcription factors in lipopolysaccharide-treated macrophages. Journal of immunotoxicology. 2016;13(2):157-64.
33. Fairhurst AM, Wallace PK, Jawad AS, Goulding NJ. Rheumatoid peripheral blood phagocytes are primed for activation but have impaired Fc-mediated generation of reactive oxygen species. Arthritis research and therapy. 2007;9(2):R29.

34. Strober S, Holoshitz J. Mechanisms of immune injury in rheumatoid arthritis: evidence for the involvement of T cells and heat-shock protein. Immunological reviews. 1990;118:233-55.
35. Darrah E, Andrade F. Rheumatoid arthritis and citrullination. Current opinion in rheumatology. 2018;30(1):72-8.
36. Murphy D, Mattey D, Hutchinson D. Anti-citrullinated protein antibody positive rheumatoid arthritis is primarily determined by rheumatoid factor titre and the shared epitope rather than smoking per se. PLoS One. 2017;12(7):e0180655.
37. Weinberg JB, Lang T, Wilkinson WE, Pisetsky DS, St Clair EW. Serum, urinary, and salivary nitric oxide in rheumatoid arthritis: complexities of interpreting nitric oxide measures. Arthritis research & therapy. 2006;8(5):R140.
38. St Clair E, Wilkinson WE, Lang T, Sanders L, Misukonis MA, Gilkeson GS, et al. Increased expression of blood mononuclear cell nitric oxide synthase type 2 in rheumatoid arthritis patients. Journal of Experimental Medicine. 1996;184(3):1173-8.
39. Wang W, Jian Z, Guo J, Ning X. Increased levels of serum myeloperoxidase in patients with active rheumatoid arthritis. Life sciences. 2014;117(1):19-23.
40. Chauhan AK, Kang SC. Therapeutic potential and mechanism of thymol action against ethanol-induced gastric mucosal injury in rat model. Alcohol. 2015;49(7):739-45.

Oiginal Article

Investigating the Effects of Thymol on Animal Model of Rheumatoid Arthritis Thymol and Rheumatoid Arthritis

Golbahari KH, Abtahi Froushani SM*

Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 04 Feb 2018 Accepted: 08 Jun 2018

Abstract

Background & Objectives: Nowadays, attention to natural products with therapeutic potential has been increased. This study was carried out to investigate the effect of Thymol on the animal model of Rheumatoid arthritis (RA).

Materials & Methods: RA was induced by injection of complete Freund's adjuvant into the footpad of Wistar rats. Then, rats were allocated in 3 groups: treated with Thymol (100 mg/kg-orally), treated with Prednisolone (100 mg/kg-orally) and un-treated group. All treatments were initiated at the 5th day after induction. The change in the dorso-plantar diameter of hands and legs of each rat were recorded every other day until 23 days after induction.

Results: The edema and swelling of the soles of the feet of RA rats that received Thymol or prednisolone, were significantly decreased in a similar manner compared to RA rat without treatment. The serum levels of nitric oxide and myeloperoxidase correlated with the proliferation of spleen lymphocytes and the levels of IL-1 and IL-6 production were significantly decreased in treatment groups compared to control group rats. The level of decrease in the level of serum nitric oxide was higher in the thymol group compared to the prednisolone-induced group. Conversely, prednisone caused more decrease in the levels of IL-1 and IL-6 cytokines compared to RA rats that received thymol.

Conclusion: Thymol may be considered as a useful strategy to control RA disease.

Keywords: Thymol, Rheumatoid Arthritis, Immunity Responses

***Corresponding Author: Seyyed Meysam Abtahifroushani,** Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
Email: sm.abtahi@urmia.ac.ir
https://orcid.org/0000-0003-2579-6618

Journal of Fasa University of Medical Sciences 8 (2018): 890-900