



Research Article

Evaluation of the Anti-inflammatory Effect of Aqueous Extract of *Pistacia atlantica* Gum in an Experimental Model of Ulcerative Colitis

Shabnam Bahrami¹, Nahid Babaei^{1*}, Hadi Esmaeili Gouvarchin Ghaleh², Jaleh Mohajeri Borazjani³, Mahdieh Farzanehpour²

¹ Department of Cell and Molecular Biology, Bushehr Branch, Islamic Azad University, Bushehr, Iran

² Applied Virology Research Center, Baqiyatullah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Department of Fisheries and Natural Resources, Bushehr Branch, Islamic Azad University, Bushehr, Iran

* **Corresponding author:** Nahid Babaei, Department of Cell and Molecular Biology, Bushehr Branch, Islamic Azad University, Bushehr, Iran. Email: nahid.babaei@iau.ac.ir

DOI: [10.32592/cmja.14.1.3](https://doi.org/10.32592/cmja.14.1.3)

How to Cite this Article:

Bahrami Sh, Babaei N, Esmaeili Gouvarchin Ghaleh H, Mohajeri Borazjani J, Farzanehpour M. Evaluation of the Anti-inflammatory Effect of Aqueous Extract of *Pistacia atlantica* Gum in an Experimental Model of Ulcerative Colitis. *Complement MedJ*. 2024;14(1): 3-12. DOI: [10.32592/cmja.14.1.3](https://doi.org/10.32592/cmja.14.1.3)

Received: 13 Nov 2023

Accepted: 22 Jan 2024

Keywords:

Baneh plant
Inflammation
Inflammatory cytokines
Mesalazine
Ulcerative colitis
© 2024 Arak University of Medical Sciences

Abstract

Introduction: Ulcerative colitis is a chronic inflammatory bowel disease. Immunosuppressive drugs and various salicylates improve the disease activity index in individuals with ulcerative colitis. Nonetheless, drug resistance and the side effects of these medications drive researchers toward designing studies to find complementary alternatives. Natural compounds, especially derivatives from medicinal plants, hold a special place as supplements. This study aimed to assess the anti-inflammatory effects of the aqueous extract of *Pistacia atlantica* gum in an experimental model of ulcerative colitis.

Materials and Methods: In this study, 20 male BALB/c mice were assigned to four equal groups. The first group served as the healthy control (negative control), the second group represented untreated colitis (positive control), the third group underwent treatment with the aqueous extract of *Pistacia atlantica* gum, and the fourth group was treated with mesalazine. Ulcerative colitis was induced in all treatment groups except the negative control by using 100 microliters of 4% acetic acid administered intrarectally. The treatment regimen was initiated on the 10th day of post-ulcerative colitis induction and the manifestation of disease symptoms. A week after the final treatment, the mice were euthanized, and various parameters, including levels of myeloperoxidase, nitric oxide, interleukin-1beta, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, and genes, such as iNOS and COX-2, were evaluated.

Results: The results indicated that treatment with the aqueous extract of *Pistacia atlantica* gum significantly decreased the activity of myeloperoxidase ($P < 0.01$), nitric oxide ($P < 0.05$), splenic cell proliferation ($P < 0.05$), expression, and production of inflammatory cytokines, ($P < 0.05$) for IL-1 β , ($P < 0.01$) for IL-6, and ($P < 0.01$) for TNF- α compared to the positive control group (untreated colitis).

Conclusion: As evidenced by the results of this study, it appears that the aqueous extract of *Pistacia atlantica* gum possesses desirable anti-inflammatory properties that could potentially reduce the disease activity index and inflammatory parameters in the experimental model of ulcerative colitis. Therefore, following further supplementary experiments, it could potentially serve as a complementary therapeutic agent alongside conventional medications for the treatment of patients suffering from ulcerative colitis.

INTRODUCTION

Ulcerative colitis, a chronic inflammatory condition, affects various age groups. Inflammation in colonic mucosa leads to the release of cells, causing lipid peroxidation, increased permeability, and inflammation to spread. The induction of colitis in rodents through acetic acid injection mirrors the acute phase in humans. Current treatments, such as corticosteroids and aminosalicylates, have severe side effects. Mesalazine, a frontline treatment, inhibits inflammatory mediators. Nevertheless, some patients do not respond well and have an increased risk of colorectal cancer. Research focuses on finding effective drugs with minimal side effects and exploring herbal remedies, such as *Pistacia atlantica* resin.

METHODS

Using 20 BALB/c mice, the enzyme myeloperoxidase activity was assessed by combining 100 microliters of tetramethyl benzidine solution (pH 5) with 10 microliters of homogenized samples and 80 microliters of 0.75 mM H₂O₂. Absorbance was measured at 450nm after halting the reaction with 50 microliters of 2 molar H₂SO₄. A Griess reagent was used to evaluate nitric oxide activity in colon tissue. A mixture of 50 microliters of Griess reagent and 50 microliters of homogenized colon tissue was prepared, and absorption at 540nm was measured after the addition of 2/1 molar hydrochloric acid. The isolation of spleen cells and evaluation using Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) were conducted with 20 BALB/c mice. The cells were exposed to a PHA solution, and absorbance at 550 nanometers was measured after adding DMSO. The analysis of inflammatory cytokines, IL-1 β , TNF- α , and IL-6 in spleen cells, as well as gene expression in colon tissue (COX-2, iNOS, IL-1 β , IL-6, TNF- α), was performed as previously described. Statistical analysis used one-way ANOVA. All data are presented as mean \pm standard deviation, and statistical significance was considered for p-values less than 0.05. The analyses were conducted using SPSS software (version 24).

RESULTS

Using 20 BALB/c mice, disease activity increased significantly in untreated colitis compared to healthy mice (P<0.0001). Aqueous extract of *P. atlantica* gum and Mesalazine reduced disease activity, with Mesalazine displaying the most significant decrease (P<0.0001). Myeloperoxidase and nitric oxide activity increased in untreated colitis, and both *P. atlantica* gum extract and Mesalazine reduced these activities significantly. Spleen cell proliferation was higher in untreated colitis, reduced by *P. atlantica* gum extract and Mesalazine (P<0.0001). Cytokine levels (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) increased in untreated colitis, and both interventions significantly lowered cytokine activity, with Mesalazine being the most effective (P<0.0001). Gene expression (IL-1 β , IL-6, TNF- α , iNOS, and COX-2) was significantly reduced by *P. atlantica* gum extract and

Mesalazine compared to untreated colitis (P<0.0001).

CONCLUSION

In the untreated colitis model, the aqueous extract of *P. atlantica* gum and Mesalazine significantly reduced nitric oxide, managing crucial indicators of inflammation. For instance, myeloperoxidase, indicative of neutrophil density in inflamed tissue, decreased with the administration of *P. atlantica* gum extract and Mesalazine, signifying a reduction in inflammation in the inflamed tissue. Moreover, phenolic compounds in *P. atlantica*, such as alpha-pinene and beta-pinene, recognized as the main active constituents in the gum extract, contributed to the attenuation of colitis inflammatory markers, including the reduction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF- α), and the expression of COX-2 and iNOS genes.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

All the steps of this research are in compliance with ethical principles. This study has been registered in Baqiyatullah University of Medical Sciences (code of ethics: IR.BMSU.AEC.1400.001).

Funding

There is no funding support.

Authors' Contributions

The authors contributed equally to the conceptualization and writing of the article. All of the authors approved the content of the manuscript and agreed on all aspects of the work.

Conflict of Interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgments

The present article was extracted from a doctoral thesis submitted by Shabnam Bahrami. The authors would like to thank those who assisted us in this research project.



بررسی اثرات ضدالتهابی عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه در مدل تجربی کولیت اولسراتیو

شبنم بهرامی^۱ ID، ناهید بابایی^{۱*} ID، هادی اسمعیلی گورچین قلعه^۲ ID، ژاله مهاجری برازجانی^۳ ID، مهدیه فرزانه پور^۲ ID

^۱ گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، واحد بوشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، بوشهر، ایران
^۲ مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران
^۳ گروه شیلات و منابع طبیعی، واحد بوشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، بوشهر، ایران

* نویسنده مسئول: ناهید بابایی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، واحد بوشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، بوشهر، ایران
ایمیل: nahid.babaei@iau.ac.ir

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۲

واژگان کلیدی:

التهاب
کولیت اولسراتیو
گیاه بنه
مزالازین
سایتوکاین‌های التهابی

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی اراک محفوظ است.

مقدمه: کولیت اولسراتیو نوعی بیماری التهابی مزمن روده است. داروهای سرکوب‌کننده‌ی سیستم ایمنی و انواع سالیسیلات‌ها موجب بهبود معیار فعالیت بیماری در افراد مبتلا به کولیت اولسراتیو می‌شوند، اما مقاومت‌های دارویی و عوارض داروهای مذکور محققان را به سمت طراحی مطالعات به‌منظور یافتن مکمل سوق می‌دهد. در این بین، ترکیبات طبیعی، به‌ویژه ترکیبات مشتق از گیاهان دارویی، جایگاه ویژه‌ای را به‌عنوان مکمل به خود اختصاص داده است. این مطالعه به بررسی اثرات ضدالتهابی عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه در مدل تجربی کولیت اولسراتیو می‌پردازد.

مواد و روش کار: در این مطالعه از ۲۰ سر موش نر نژاد BALB/C استفاده شد که به ۴ گروه مساوی تقسیم شدند. گروه اول: سالم (کنترل منفی)؛ گروه دوم: کولیت بدون درمان (کنترل مثبت)؛ گروه سوم: درمان با عصاره‌ی آبی صمغ بنه؛ گروه چهارم: درمان با مزالازین. با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر اسیداستیک ۴ درصد، کولیت اولسراتیو به‌صورت داخل‌رکتومی در همه‌ی گروه‌های درمانی به‌جز گروه کنترل منفی القا شد. برنامه‌ی درمانی در روز دهم پس از القای کولیت اولسراتیو و ظهور علائم بیماری شروع شد. یک هفته پس از آخرین درمان، موش‌ها آسان‌کشی شدند و پارامترهای مختلف، از جمله سطوح میلیوپراکسیداز، نیتریک اکساید، اینترلوکین-۱بتا، اینترلوکین-۶، فاکتور نکروزدهنده‌ی تومور آلفا و ژن‌های با iNOS و COX-2 ارزیابی شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که درمان با عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه به‌طور معناداری موجب کاهش فعالیت میلیوپراکسیداز ($P < 0.01$)، نیتریک اکساید ($P < 0.05$)، تکثیر سلول‌های طحالی ($P < 0.05$) و بیان و تولید سایتوکاین‌های التهابی ($P < 0.01$) برای اینترلوکین-۱بتا و $P < 0.01$ برای اینترلوکین-۶ و $P < 0.01$ برای فاکتور نکروزدهنده‌ی تومور آلفا نسبت به گروه کنترل مثبت (کولیت بدون درمان) می‌شوند.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج مطالعه‌ی حاضر، به نظر می‌رسد که عصاره‌ی آبی صمغ بنه دارای ویژگی‌های ضدالتهابی مطلوبی است که می‌تواند معیار فعالیت بیماری و پارامترهای التهابی را در مدل تجربی کولیت اولسراتیو کاهش دهد؛ بنابراین، پس از انجام آزمایش‌های تکمیلی می‌تواند به‌عنوان مکمل درمانی به همراه داروهای مصرفی در درمان بیماران مبتلا به کولیت اولسراتیو به کار رود.

التهاب استفاده می‌شود. کنترل التهاب و کاهش اثرات جانبی داروها از اهداف مهم درمان کولیت اولسراتیو است و درمان‌های سنتی با استفاده از گیاهان دارویی می‌توانند به حل این مشکل کمک کنند (۷). گیاه *Pistacia atlantica* که در ایران به نام «بنه» و «سقر» شناخته شده است، به دلیل توزیع وسیع، اهمیت زیادی دارد (۸). از این گیاه صمغی استخراج می‌شود که دارای اثرات فراوان و مفیدی است (۹). این مطالعه به بررسی اثرات ضدالتهابی عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه در مدل تجربی کولیت اولسراتیو می‌پردازد.

روش کار

مواد مصرفی

اسیداستیک، محیط کشت DMEM، MTT، FBS، بافر لیزکننده‌ی RBC و DMSO از شرکت کالایست تهیه شد. مزالازین از شرکت داروسازی آریا خریداری شد. کیت استخراج RNA و کیت سنتز cDNA از شرکت پارس توس و کیت سنجش سایتوکاین IL-1 β و IL-6 و TNF- α از شرکت Peprotech تهیه شد. بافر HTAB از شرکت Sigma و کیت سنجش میلوپراکسیداز و نیتریک اکساید از شرکت توند سلامت تهیه شد.

فرایند استخراج از صمغ گیاه بنه

صمغ گیاه بنه با کد هراریوم ۱۱۸۵۴-HKS از گروه فارماکوگنوزی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) تهیه شد. بعد از شست‌وشو و خشک کردن، صمغ آسیاب شد و به‌صورت پودر درآمد و در خلأ خشک شد. سپس، پودر حاصل به مدت ۴۸ ساعت در آب‌مقطر حل شد و پس از آن، فیلتراسیون برای تهیه‌ی عصاره‌ی صمغ گیاه بنه انجام شد. سوسپانسیون حاصل در دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه و تقطیر بیشتر انجام شد. عصاره‌ی به‌دست‌آمده تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد (۱۰).

شناسایی ترکیبات فعال گیاه

ترکیبات موجود در صمغ گیاه بنه با دستگاه گاز کروماتوگرافی مدل Shimadzu GC-۱۷A متصل به طیف‌سنج جرمی Quadruple-MS مدل Shimadzu QP۵۰۵۰ شناسایی شد. ترکیبات موجود در عصاره‌ی آبی صمغ گیاه با استفاده از یک ستون موئین سیلیس به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۲ میلی‌متر جدا شد و ستون با یک فیلم ۰/۲۵ میکرومتری از (Shimadzu) BP-۵ پوشیده شد. برای تزریق، از یک انژکتور اسپلیت یا بدون شکاف با یک آستر شیشه‌ای داخلی یک‌میلی‌متری استفاده شد. گاز حامل هلیوم بود و ولتاژ یونیزاسیون روی ۷۰ الکترون‌ولت تنظیم شد. دمای انژکتور در ۲۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد حفظ شد، درحالی‌که دمای رابط روی ۲۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تنظیم شده بود. تجزیه‌وتحلیل جرم در محدوده‌ی ۳۵ تا ۴۵۰ واحد جرم اتمی (amu) انجام شد. برای شناسایی ترکیبات عصاره، از شاخص‌های ماندگاری در شرایط برنامه‌ریزی‌شده و n-alkanes (C۲۰-C۸) به‌عنوان ترکیبات مرجع استفاده شد. ترکیبات موجود در صمغ گیاه با استفاده از یک ستون DB-۵ تحت شرایط کروماتوگرافی یکسان آنالیز شد. برای شناسایی ترکیبات ژنوتیپ، طیف جرمی آن‌ها با طیف جرمی موجود در کتابخانه‌ی مرجع داخلی (NIST ۰۸ و ۹۰۰ Wiley) مقایسه شد (۱۱).

طراحی مطالعه

تعداد ۲۰ سر موش نر Balb/c با سن ۶ تا ۸ هفته و وزن ۲۵ تا ۳۰ گرم از مرکز نگهداری حیوانات دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) خریداری شدند. موش‌ها در محیط کنترل شده با دمای ۲۳±۲، رطوبت ۵۵±۵ درصد و چرخه

زخم روده‌ی بزرگ بیماری مزمنی است که افراد با سنین مختلف را تحت تأثیر قرار می‌دهد. عوامل التهابی و رادیکال‌های آزاد در ایجاد این بیماری اهمیت بسیاری دارند (۱). این بیماری یکی از دلایل شایع درگیری‌های دستگاه گوارش در کشورهای درحال توسعه و توسعه‌یافته است. اغلب، التهاب در رکتوم و نواحی انتهایی کولون رخ می‌دهد؛ اما این امکان وجود دارد که کل کولون تحت تأثیر قرار گیرد. از علائم این عارضه ارتشاح سلول‌های التهابی، به‌ویژه ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها، به بافت مخاطی روده با آزاد کردن رادیکال‌های آزاد، نظیر یون سوپراکسید و رادیکال هیدروکسید و پراکسید هیدروژن، باعث پراکسیداسیون لیپیدها، افزایش نفوذپذیری رگ‌های خونی، افزایش ورود نوتروفیل‌ها به بافت مخاطی و گسترش التهاب می‌شوند (۲). آزاد شدن واسطه‌های التهابی و آنزیم‌ها باعث تخریب دیواره‌ی روده، ایجاد زخم، خون‌ریزی و اسهال می‌شود. رادیکال‌های آزاد همچنین باعث کاهش عوامل آنتی‌اکسیدانت و افزایش شدت بیماری می‌شوند. القای کولیت با تزریق درون رکتومی اسیداستیک انجام می‌گیرد و روشی استاندارد برای ایجاد مدل تجربی کولیت اولسراتیو است. این مدل تجربی شباهت زیادی به مرحله‌ی حاد کولیت اولسراتیو در انسان دارد؛ به‌گونه‌ای که عواملی مانند افزایش نفوذپذیری رگ‌ها، ارتشاح طولانی‌مدت نوتروفیل‌ها و افزایش واسطه‌های التهابی که در شروع کولیت انسانی نقش دارند، در ایجاد کولیت در این مدل نیز دخالت می‌کنند. تزریق اسیداستیک به درون کولون موش‌های آزمایشگاهی موجب پاسخ‌های حاد و شدید التهابی می‌شود که با تغییرات ماکروسکوپی و آسیب‌های میکروسکوپی دیواره‌ی کولون، زخم، ادم ساب‌موکوزا و کاهش تعداد سلول‌های گابلت مشخص می‌شود (۳). در مدل‌های کولیت اولسراتیو، استفاده از اسیداستیک به اختلال در سد روده‌ای و تحریک التهاب منجر می‌شود. این اثرات شامل افزایش نفوذپذیری روده، فعال شدن سلول‌های ایمنی و افزایش سایتوکاین‌های پیش‌التهابی است (۴). کنترل التهاب از اهداف مهم درمان زخم روده است (۲).

بهترین راه درمان بیماری کولیت اولسراتیو استفاده از داروهایی همچون کورتیکواستروئیدها و آمینوسالیسیلات‌ها و ازاتیوپرین‌ها است؛ اما اثرات جانبی شدید این داروها باعث محدودیت‌ها در مصرف بلندمدت می‌شود. بسیاری از این داروها اثرات جانبی شدیدی از جمله اسهال، استفراغ، اختلالات کبدی، اختلالات کلیوی، پانکراتیت و زخم‌های دستگاه گوارش ایجاد می‌کنند.

مزالازین با نام مسالامین یا آمینو سالیسیلیک اسید خط اول درمان بیماری‌های التهابی روده است و اصلی‌ترین درمان برای کولیت اولسراتیو خفیف تا متوسط به شمار می‌رود و با مکانیسم مهار واسطه‌های لیپوآکسیژناز و سیکلواکسیژناز، اینترلوکین-۱، اینترلوکین-۲ و فاکتور نکروزکننده‌ی آلفا در کنترل التهاب فعال و حفظ بهبود بافت روده اثرگذار است (۵).

همچنین، بسیاری از بیماران به این نوع درمان جواب مناسبی نمی‌دهند. افراد مبتلا به کولیت اولسراتیو در صورت عدم کنترل التهاب، در خطر ابتلا به سرطان روده‌ی بزرگ قرار می‌گیرند (۶). به همین دلیل، تحقیقات گسترده‌ای برای یافتن داروهای مؤثر با اثرات جانبی کم در حال انجام است. از این‌رو، مطالعات جامع برای کنترل و پیشگیری از بیماری در دستور کار قرار گرفته است و از روش‌های درمان طبیعی مانند استفاده از گیاهان دارویی و پروبیوتیک برای کاهش آسیب‌های ناشی از

کیت تجاری ساخت شرکت نوند سلامت تعیین شد. ۵۰ میکرولیتر از معرف گریس که حاوی ۰/۱ درصد سولفانیلامید، ۳ درصد اسید فسفریک و ۰/۱ درصد نفتیل اتیلن دی آمین بود، با ۵۰ میکرولیتر از بافت کولون همگن شده تهیه شد. پس از افزودن ۱/۲ مولار هیدروکلراید و یک دوره انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۶).

بررسی شاخص سلول‌های طحال

پس از جداسازی طحال موش‌ها، نمونه‌ها در محیط کشت استریل که شامل Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) با Fetal Bovine Serum (FBS) ۱۰ درصد بود، با استفاده از تهرنگ پنج‌میلی‌لیتری له شدند. برای حذف گلبول‌های قرمز، نمونه‌ها با بافر لیزکننده گلبول‌های قرمز (ACK-RBC) تیمار شدند. نمونه‌ها با تراکم 10^5 سلول در هر میلی‌لیتر آماده شدند و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور قرار گرفتند. سپس، در پلیت‌های ۲۴ چاهکی با ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محلول PHA (۱۷) به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور CO_2 قرار گرفتند و پس از آن، مایع رویی جمع‌آوری شد. برای ارزیابی تکثیر سلولی، سوسپانسیون سلولی در پلیت ۹۶ چاهکی با محلول MTT و غلظت ۵ (mg/ml) در PBS به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. با افزودن ۵۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک، جذب در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

بررسی سایتوکاین‌های التهابی سلول‌های طحال

سطوح $IL-1\beta$ ، $TNF-\alpha$ و $IL-6$ در کشت سلولی طحال با استفاده از کیت‌های ELISA و طبق دستورالعمل‌های شرکت سازنده (Peprotech) تجزیه و تحلیل شدند (۱۸).

ارزیابی بیان ژن‌های التهابی و سایتوکاین‌ها در نمونه‌های بافت کولون

استخراج RNA از بافت کولون با استفاده از کیت پارس توس و طبق پروتکل‌های شرکت سازنده انجام گرفت. غلظت RNA با استفاده از اسپکتروفتومتر NanoDrop NABI اندازه‌گیری شد. متعاقباً سنتز cDNA انجام شد. برای طراحی توالی‌های پرایمر Forward و Reverse ژن‌های $IL-1\beta$ ، $IL-6$ ، $COX-2$ ، $TNF-\alpha$ و $iNOS$ ، از نرم‌افزار Oligo7 استفاده شد و جایگاه جفت شدن پرایمرها از طریق سایت NCBI بررسی شد. توالی پرایمرها در جدول ۲ آورده شده است. برای نرمال‌سازی از GAPDH به‌عنوان استاندارد مرجع و برای ارزیابی بیان ژن‌های هدف از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد. برنامه‌ی RT-PCR شامل یک مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود و به دنبال آن، ۴۰ سیکل PCR انجام شد (طبق جدول ۳).

جدول ۲: توالی پرایمرهای استفاده‌شده برای تکثیر ژن‌ها و طول محصول تکثیرشده

ژن هدف	توالی پرایمر Forward	توالی پرایمر Reverse
$COX-2$	CTTCGGGAGCACAACAG AGT	AAGTGGTAACCGCTCA GGTG
$iNOS$	CACCTTGGAGTTCACCC AGT	ACCACTCGTACTTGGG ATGC
$IL-1\beta$	GCCACCTTTTGACAGTG ATGAG	AAGGTCCACGGGAAAG ACAC
$IL-6$	CAACGATGATGCACTTG CAGA	TGTGACTCCAGCTTAT CTCTTG
$TNF-\alpha$	AGGCACTCCCCAAAAG ATG	CCACTTGGTGGTTTGT GAGTG
GAPDH	GGGTCCCAGCTTAGGTT CAT	CATTCTGGGCCTTGAC TGTTG

نوراتاریکی ۱۲ ساعت نگهداری شدند و به طور آزاد به غذا و آب دسترسی داشتند. موش‌ها به مدت یک هفته قبل از شروع آزمایش با شرایط محل نگهداری سازگار شدند. در این مطالعه، تنها موش‌های نر وارد آزمایش شدند تا اثر بالقوه هورمون‌های جنسی کاهش یابد. پروتکل و آزمایشات حیوانی با رعایت قوانین کمیته اخلاق حیوانی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) طراحی و اجرا شد.

برای القای کولیت اولسراتیو، موش‌ها پس از طی دوره‌ی ناشتایی ۳۶ ساعته با دسترسی به آب، تحت تزریق داخل‌رکتومی اسیداستیک قرار گرفتند. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول اسیداستیک ۴ درصد به رکتوم تزریق شد و موش‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در موقعیت مایل قرار گرفتند تا اطمینان حاصل شود که اسید به‌طور کامل در رکتوم حفظ شده است. در گروه کنترل منفی، از حجم مساوی محلول نرمال سالین به‌جای محلول اسیداستیک استفاده شد (۱۲). گروه‌های مختلف درمانی به‌ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر حلال عصاره‌ی آبی صمغ بنه برای کنترل منفی و مثبت، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه (۲۰۰ mg/kg) (۱۰) و ۱۰۰ میکرولیتر مزالازین (۳۰ mg/kg) (۱۳) روزانه به مدت یک ماه دریافت کردند. یک هفته پس از آخرین تزریق، موش‌ها آسان‌کشی شدند و بخش انتهایی رودی آن‌ها جدا شد. پس از حذف مدفوع و چربی، مقدار مناسب بافر HTAB به نسبت ۱۲/۵ (mg/ml) بر اساس وزن بافت، به آن‌ها افزوده شد. پس از حذف مدفوع و چربی، نمونه‌ها با دستگاه هموژنیزاتور Ultra-Turrax به مدت ۴ دقیقه هموژنیزه گردید. سپس نمونه‌های بافتی را به مدت ۱۰ دقیقه با دور بالا ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی جمع‌آوری و در دمای $-70^{\circ}C$ نگهداری شد. (۱۴).

معیار فعالیت بیماری

بر اساس ثبت روزانه‌ی خون در مدفوع، قوام مدفوع و خون‌ریزی مقعدی، با استفاده از جدول ۱، معیار فعالیت بیماری ارزیابی شد. امتیاز معیار فعالیت بیماری با جمع‌بندی نمرات پارامترها محاسبه شد (۱۴).

جدول ۱: سیستم امتیازدهی معیار فعالیت بیماری

امتیاز	قوام مدفوع	خون در مدفوع
۰	نرمال	نرمال
۱	نرم	قرمز
۲	بسیار نرم	قرمز تیره
۳	اسهال	سیاه

ارزیابی فعالیت میلیوپراکسیداز

پس از همگن کردن بافت کولون، ۲۰ میلی‌گرم از بافت در ۱ میلی‌لیتر بافر X1 حاوی ۰/۵ درصد هگزادسیل تری متیل آمونیوم بروماید هموژن شد. پس از سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی حاصل برای تجزیه و تحلیل بیشتر جمع‌آوری شد. برای سنجش میزان فعالیت آنزیم میلیوپراکسیداز، از محلول رویی نمونه بافت کولون هموژن شده و کیت تجاری استفاده شد. به‌طور خلاصه، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول تترا متیل بنزیدین (TMB) در pH = ۵ با ۱۰ میکرولیتر نمونه هموژنیزه شده و ۸۰ میکرولیتر از H_2O_2 ۰/۷۵ میلی مولار ترکیب شد. واکنش با افزودن ۵۰ میکرولیتر H_2SO_4 ۲ مولار متوقف شد. سپس جذب نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۵).

ارزیابی فعالیت نیتریک اکساید

غلظت نیتریک اکساید بافت کولون با استفاده از معرف گریس و

جدول ۳: پروتکل دمایی برای تکثیر ژن

دماى Denaturation اولیه	دماى Denaturation	دماى Annealing	دماى Extension	ژن
(۹۵°C)	(۳۰ ثانیه)	(۲۰ ثانیه)	(۲۰ ثانیه)	
	۴۰ سیکل			
	۹۵ °C	۶۱ °C	۷۲ °C	COX-۲
	۹۵ °C	۶۱ °C	۷۲ °C	iNOS
یک سیکل	۹۵ °C	۶۲/۵ °C	۷۲ °C	IL-۱β
	۹۵ °C	۶۰/۵ °C	۷۲ °C	IL-۶
	۹۵ °C	۶۰ °C	۷۲ °C	TNF-α
	۹۵ °C	۶۱/۵ °C	۷۲ °C	GAPDH

تحلیل آماری

همه‌ی داده‌ها به صورت مقادیر میانگین \pm انحراف معیار ارائه می‌شوند. برای ارزیابی معنی‌داری آماری در هر پارامتر در بین گروه‌های مختلف، آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) انجام شد. از آزمون توکی برای مقایسه‌های چندگانه استفاده شد. P -value کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. تمامی

تجزیه و تحلیل‌ها با SPSS (نسخه‌ی ۲۴) انجام شد.

یافته‌ها

آنالیز GC-MS عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه

آنالیز GC-MS عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه در جدول ۴ نمایش داده شده است.

جدول ۴: غلظت (%). ترکیبات مختلف در عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه

ترکیب	RI	مقدار (%)	ترکیب	RI*	مقدار (%)
Alpha-Pinene	۹۳۹	۷۷/۷	Linalool	۱۱۰۳	۰/۰۸
Camphene	۹۵۳	۰/۸۷	Chrysanthenone	۱۱۴۶	۰/۰۹
Verbenene	۹۶۷	۰/۴۳	Rans-Limonene-Oxide	۱۱۴۹	۰/۵۹
Beta-Pinene	۹۸۰	۳/۶۶	Pinocarveol	۱۱۵۲	۱/۸
Beta-Myrcene	۹۹۱	۶/۲۷	Cis-Sabinol	۱۱۴۹	۱/۹۲
Delta-۳-carene	۱۰۱۱	۰/۲۳	Isopinocamphone	۱۱۸۱	۰/۱۴
Alpha-Terpinene	۱۰۱۸	۰/۰۳	Pinocarpone	۱۱۶۲	۰/۰۶
P-Cymene	۱۰۲۶	۰/۳	P-Mentha-۱,۵-dien-۸-ol	۱۱۸۵	۱/۰۴
L-Limonene	۱۰۳۱	۰/۷۷	Terpinene-۴-ol	۱۱۹۰	۰/۲۳
۱,۸-Cineole	۱۰۳۳	۰/۱۴	P-Cymen-۸-ol	۱۱۹۹	۰/۵۵
Trans-beta-Ocimene	۱۰۵۰	۰/۱۸	Myrtenol	۱۱۹۰	۰/۶۶
Gamma-Terpinene	۱۰۶۲	۰/۰۷	Verbenone	۱۲۰۴	۰/۲۵
Terpinolene	۱۰۸۸	۰/۲۱	Cis-Carveol	۱۲۴۱	۰/۱۴
Verbenol	۱۰۹۸	۰/۲۳	Isobornyl acetate	۱۳۰۲	۰/۲

RI* Value: Relative inhibition

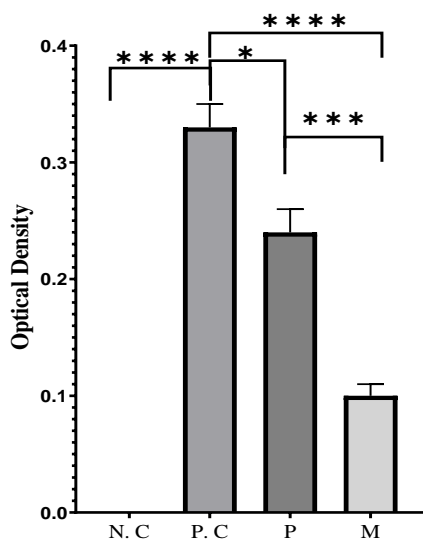
معیار فعالیت بیماری

معیار فعالیت بیماری در گروه کولیت بدون درمان (کنترل مثبت) افزایش معناداری را نسبت به گروه سالم (کنترل منفی) نشان داد ($P < 0/0001$). همچنین، نتایج نشان داد که عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه ($P < 0/05$) و مزالازین موجب کاهش معنادار معیار فعالیت بیماری نسبت به گروه کولیت بدون درمان می‌شود. بین گروه کولیت دریافت‌کننده‌ی مزالازین و عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه تفاوت آماری معناداری مشاهده شد ($P < 0/001$) و گروه کولیت دریافت‌کننده‌ی مزالازین بیشترین کاهش معیار فعالیت بیماری را نسبت به گروه کولیت بدون درمان نشان داد ($P < 0/0001$) (نمودار ۱).

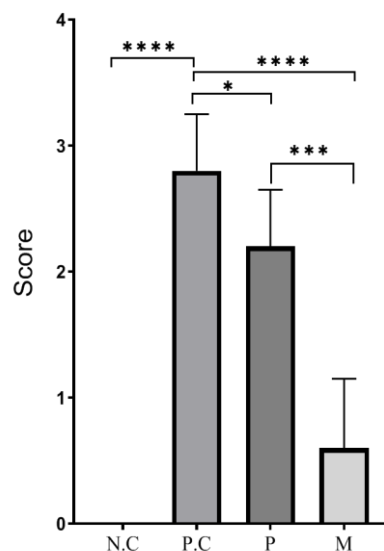
اندازه‌گیری فعالیت میلوپراکسیداز و نیتریک اکساید

مطابق نمودار ۲A، تولید آنزیم میلوپراکسیداز در گروه کولیت بدون درمان (کنترل مثبت) افزایش معناداری را نسبت به گروه سالم (کنترل منفی) نشان داد ($P < 0/0001$). علاوه بر این، نتایج حاکی از آن بود که

عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه ($P < 0/0001$) و مزالازین سبب کاهش معنادار تولید آنزیم میلوپراکسیداز نسبت به گروه کولیت بدون درمان می‌شود. میان گروه کولیت دریافت‌کننده‌ی مزالازین و عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه تفاوت آماری معناداری مشاهده شد ($P < 0/0001$). همان‌طور که انتظار می‌رفت، گروه کولیت دریافت‌کننده‌ی مزالازین کمترین میزان تولید آنزیم میلوپراکسیداز را نسبت به گروه کولیت بدون درمان به خود اختصاص داد ($P < 0/0001$). بر اساس نمودار ۲B، افزایش معنادار تولید آنزیم نیتریک اکساید در گروه کولیت بدون درمان (کنترل مثبت) در مقایسه با گروه سالم (کنترل منفی) دیده شد ($P < 0/0001$). همچنین، نتایج نشان‌دهنده‌ی آن بود که گروه کولیت دریافت‌کننده‌ی مزالازین و عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه سبب کاهش معنادار تولید آنزیم نیتریک اکساید نسبت به گروه کولیت بدون درمان می‌شود ($P < 0/05$). بین گروه کولیت دریافت‌کننده‌ی مزالازین و عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه تفاوت آماری معناداری دیده شد ($P < 0/0001$) و گروه کولیت دریافت‌کننده‌ی مزالازین بیشترین کاهش تولید آنزیم نیتریک اکساید را نسبت به گروه کولیت بدون درمان نشان داد ($P < 0/0001$).



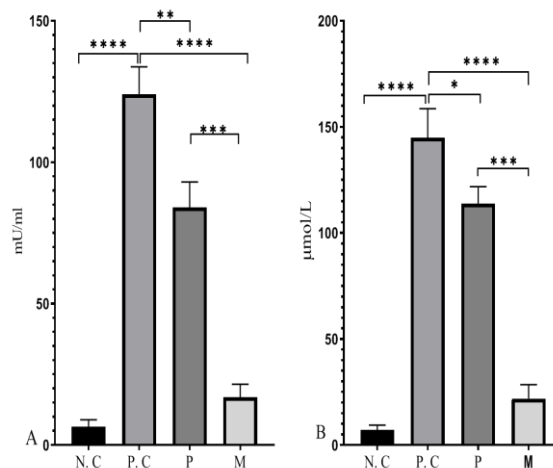
نمودار ۲: میزان تکثیر سلول‌های طحال در گروه‌های مختلف مورد مطالعه (* نشان‌دهنده $P < 0.05$, ** نشان‌دهنده $P < 0.01$, *** نشان‌دهنده $P < 0.001$, **** نشان‌دهنده $P < 0.0001$) و (=N.C) Positive Control =P.C، (=M) Mesalazine =M، (=P) *Pistacia atlantica*



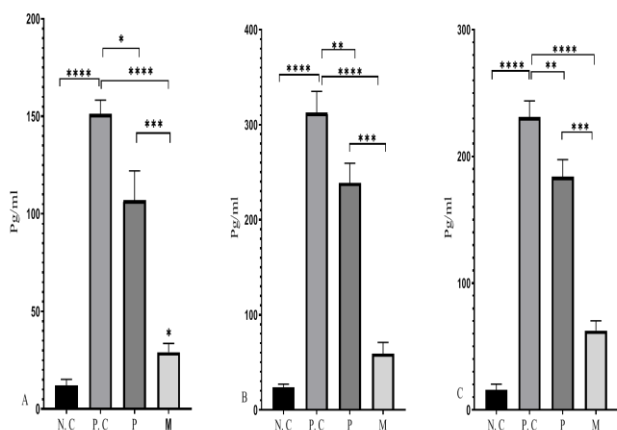
نمودار ۱: معیار فعالیت بیماری در گروه‌های مورد مطالعه (* نشان‌دهنده $P < 0.05$, ** نشان‌دهنده $P < 0.01$, *** نشان‌دهنده $P < 0.001$, **** نشان‌دهنده $P < 0.0001$) و (=N.C) Positive Control =P.C، (=M) Mesalazine =M، (=P) *Pistacia atlantica*

تغییرات سایتوکاین‌های التهابی در مایع رویی سلول‌های طحال

نمودار ۴A-C میزان تولید سایتوکاین‌های IL-1 β ، IL-6 و TNF- α را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که میزان فعالیت هر سه سایتوکاین در گروه کولیت بدون درمان (کنترل مثبت) افزایش معناداری نسبت به گروه سالم (کنترل منفی) یافته است ($P < 0.0001$). همچنین، عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه (به ترتیب در نمودار A، $P < 0.0001$ ؛ در نمودار B، $P < 0.01$ ؛ در نمودار C، $P < 0.05$) و مزالازین سبب کاهش فعالیت سایتوکاین‌ها نسبت به گروه کولیت بدون درمان شد. میان گروه کولیت دریافت‌کننده‌ی مزالازین و عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه تفاوت آماری معناداری مشاهده شد ($P < 0.001$). کولیت دریافت‌کننده‌ی مزالازین کمترین میزان تکثیر سلول‌های طحالی را نسبت به گروه کولیت بدون درمان نشان داد ($P < 0.0001$).



نمودار ۲: (A) میزان فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز و (B) میزان فعالیت آنزیم نیتریک اکساید (* نشان‌دهنده $P < 0.05$, ** نشان‌دهنده $P < 0.01$, *** نشان‌دهنده $P < 0.001$, **** نشان‌دهنده $P < 0.0001$) و (=N.C) Negative Control =N.C، (=M) Mesalazine =M، (=P) *Pistacia atlantica* =P، (=P.C) Positive Control =P.C



نمودار ۴: (۴A) میزان تولید سایتوکاین IL-1 β ، (۴B) میزان تولید سایتوکاین IL-6 و (۴C) میزان تولید سایتوکاین TNF- α در گروه‌های مختلف مورد مطالعه (* نشان‌دهنده $P < 0.05$, ** نشان‌دهنده $P < 0.01$, *** نشان‌دهنده $P < 0.001$, **** نشان‌دهنده $P < 0.0001$) و (=N.C) Negative Control =N.C، (=P.C) Positive Control =P.C، (=M) Mesalazine =M، (=P) *Pistacia atlantica*

بررسی میزان تکثیر سلول‌های طحال (MTT)

مطابق نمودار ۳، میزان تکثیر سلول‌های طحال در گروه کولیت بدون درمان (کنترل مثبت) افزایش معناداری را نسبت به گروه سالم (کنترل منفی) نشان داد ($P < 0.0001$). همچنین، نتایج نشان داد که عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه ($P < 0.05$) و مزالازین سبب کاهش معنادار تکثیر سلول‌های طحالی نسبت به گروه کولیت بدون درمان می‌شود. میان گروه کولیت دریافت‌کننده‌ی مزالازین و عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه تفاوت آماری معناداری مشاهده شد ($P < 0.001$). کولیت دریافت‌کننده‌ی مزالازین کمترین میزان تکثیر سلول‌های طحالی را نسبت به گروه کولیت بدون درمان نشان داد ($P < 0.0001$).

مونوسیت‌ها و ماکروفاژها به میزان کمتری وجود دارد که به‌طور مستقیم بیانگر دانسیته‌ی نوتروفیل‌های موجود در بافت ملتهب است؛ لذا پارامتری برای درجه‌بندی عفونت حاد به شمار می‌رود (۲۱). نیتریک اکساید ارتباط تنگاتنگی با وضعیت التهابی دارد و به‌عنوان میانجی کلیدی التهاب عمل می‌کند و چهارچوب اصلی رادیکال‌های آزاد نیتروژن را تشکیل می‌دهد و به دنبال وقوع التهاب، سلول‌های ایمنی آن را تولید می‌کنند (۲۲). نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه سبب کاهش فعالیت آنزیم نیتریک اکساید می‌شود. تست MTT یا سنجش تکثیر سلول‌های طحالی تستی بر اساس رنگ‌سنجی است که بیانگر میزان فعالیت متابولیک سلول است. بر همین اساس، آنزیم داخل‌سلولی میزان فعالیت سلول‌های ایمنی را نشان می‌دهد. در مطالعه‌ی حاضر، کاهش معنادار تکثیر سلولی در گروه کولیت دریافت‌کننده‌ی عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه دیده شد.

TNF- α سایتوکاینی التهابی است که فعالیت لوکوسیت‌ها و تجمع بافتی آن‌ها را نشان می‌دهد و نقشی مهم در بیماری‌های التهابی مثل کولیت اولسراتیو ایفا می‌کند. نقش مهم TNF- α در سلول‌های التهابی القای چسبندگی مولکولی و بیان سایتوکاین‌ها است (۲۳). افزایش سطح TNF- α می‌تواند سد اپی تلیالی روده را مختل کند و باعث آپوپتوز سلول‌های اپیتلیال و ترشح کموکاین شود (۲۴، ۲۵).

IL-6 را سلول‌های متفاوتی تولید می‌کنند و اثر پلی‌تروفیک روی ارگان‌های مختلف دارد و در بیماری‌های التهابی مختلف مانند کولیت اولسراتیو حضور این واسطه‌ی التهابی تشخیص داده شده است (۲۴). تولید بیش از حد IL-6 و IL-1 β به التهاب روده منجر می‌شود (۲۶، ۲۷). در مطالعه‌ی حاضر، عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه سبب کاهش معنادار تولید و بیان سایتوکاین‌های IL-1 β ، IL-6، TNF- α و ژن‌های iNOS و COX-2 در کولیت اولسراتیو شد.

مطالعات مختلف گزارش کرده‌اند که التهاب کولونی به‌علت ترشح بیش از حد سایتوکاین‌های پیش‌التهابی از سلول‌های غیرمعمول روده‌ای است. به‌طور مشخص، اتصال TNF- α و IL-6 به سلول‌های روده‌ای پاسخ ایمنی را به‌وسیله‌ی تکثیر سلول‌های T، انفیلتراسیون لکوسیت‌ها و افزایش اتصال بین‌سلولی افزایش می‌دهد (۲۸).

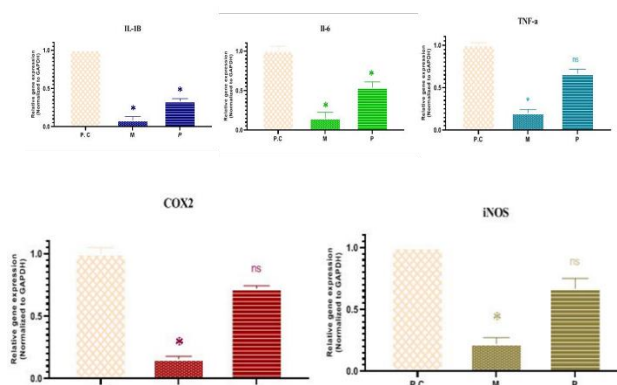
مطالعه‌ی غرضی و همکاران نشان داد که صمغ گیاه بنه سبب کاهش MPO، TNF- α و IL-6 در سطح کولون می‌شود و بهبود التهاب و زخم کولون را به همراه دارد (۲۹). نتایج مطالعه‌ی استوان و غلامی نشان داد که صمغ گیاه بنه سبب کاهش درخور توجهی در علائم کولیت می‌شود و همچنین، فعالیت آنزیم MPO در گروه‌های تحت درمان با صمغ گیاه بنه را کاهش می‌دهد که به بهبود قوام مدفوع، نمرات هیستوپاتولوژیک و نشانگرهای هیستوپاتولوژیکی منجر می‌شود (۳۰، ۳۱). نتایج مطالعه‌ی هومور و ژو نشان داد که سطوح MPO بالا در گروه‌های درمان‌نشده، نشان‌دهنده‌ی فعال شدن سلول‌های پرواکسیداتیو و پیش‌التهابی است و درمان با صمغ گیاه بنه کاهش فعالیت MPO را به‌دلیل خواص ضدالتهابی صمغ گیاه بنه نشان داد که با نتایج مطالعه‌ی حاضر همخوانی دارد (۳۲، ۳۳).

مینائیان و همکاران، اثرات ضدالتهابی عصاره‌ی صمغ گیاه بنه را در بیماری التهابی کولیت ناشی از اسیداستیک در موش‌ها مطالعه کردند. این محققان گزارش کردند که تجویز عصاره‌ی بنه باعث کاهش میزان MPO به‌عنوان نوعی نشانگر التهابی و آسیب پاتولوژیک بافت روده می‌شود. آن‌ها بیشتر عصاره‌ی صمغ را با استفاده از GC/MS تجزیه‌وتحلیل کردند و گزارش کردند که ترکیبات روغنی فرار ۹۰ درصد از عصاره را تشکیل می‌دهند (۴۱/۲۳) درصد α -پینن، ۶/۸۵ درصد β -پینن، و ۳۹/۵ درصد ترانس ورنبول (۳۴).

مطالعات مختلف نشان داد که IL-1 β ، IL-6، TNF- α نقش کلیدی در فراخوانی سلول‌های التهابی و آسیب بافتی در بیماری‌های التهابی روده ایفا

اندازه‌گیری سطح بیان سایتوکاین‌های IL-1 β ، IL-6، TNF- α و ژن‌های iNOS و COX-2

سطح بیان ژن‌های IL-1 β ، IL-6، TNF- α همراه با iNOS و COX-2 در گروه‌های مطالعه با استفاده از تکنیک RT-PCR ارزیابی شد. بر اساس نمودار ۵، میزان بیان سایتوکاین IL-1 β در گروه کولیت دریافت‌کننده‌ی عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه ۲/۹۶ برابر و در گروه کولیت دریافت‌کننده‌ی مزالازین ۱۲/۳۴ برابر کاهش نسبت به گروه کولیت بدون درمان نشان داد. میزان بیان سایتوکاین IL-6 در گروه کولیت دریافت‌کننده عصاره آبی صمغ گیاه بنه، ۱/۸۴ برابر و در گروه کولیت دریافت‌کننده مزالازین، ۶/۸۰ برابر کاهش را نسبت به گروه کنترل مثبت نشان می‌دهد. میزان بیان ژن‌های COX-2 و iNOS در گروه کولیت دریافت‌کننده‌ی عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه، به‌ترتیب ۱/۳۸ و ۱/۴۹ برابر و در گروه کولیت دریافت‌کننده‌ی مزالازین، به‌ترتیب ۶/۳۲ و ۴/۴۸ برابر نسبت به گروه کنترل مثبت کاهش داشت.



نمودار ۵: بیان نسبی ژن‌های IL-1 β ، IL-6، TNF- α ، COX-2، iNOS در گروه‌های مطالعه نسبت به گروه کولیت بدون درمان (کنترل مثبت) (* نشان‌دهنده‌ی $P < 0.05$ و ^{ns} نشان‌دهنده‌ی not significant)

بحث

گیاهان دارویی نقش کلیدی در حفظ سلامت افراد و جوامع ایفا می‌کنند. ارزش دارویی این گیاهان به ترکیب شیمیایی آن‌ها بستگی دارد که اثرات فیزیولوژیک خاصی بر سیستم بدن انسان می‌گذارد. مواد مهم فعال در این گیاهان، آکالوئیدها، تانن‌ها، فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی هستند. بیشتر گیاهان دارویی منابع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند که دفاع آنتی‌اکسیدانی را تقویت می‌کنند و میزان بروز برخی بیماری‌ها از جمله سرطان، بیماری‌های قلبی و سکنه را کاهش می‌دهند (۱۹). صمغ گیاه بنه که منبعی غنی از ترکیبات فنلی است، در پزشکی سنتی به‌عنوان داروهای ضد میکروبی، ضدقارچی، ضدالتهابی، ضدویروسی و ضدسرطانی به کار می‌روند (۲۰).

طبق نتایج مطالعه‌ی حاضر، بیشترین مواد فعال در عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه آلفا پینن (۷۷/۷ درصد) و بتا پینن (۳/۶۶ درصد) بود. همچنین مشخص شد که عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه سطح تولید سایتوکاین‌های التهابی TNF- α و IL-1 β و IL-6، میزان بیان سایتوکاین‌های التهابی و ژن‌های iNOS و COX-2، فعالیت میلوپراکسیداز و نیتریک اکساید، میزان تکثیر سلول‌های طحالی و معیار فعالیت بیماری را نسبت به گروه کولیت بدون درمان (کنترل مثبت) کاهش می‌دهد. میلوپراکسیداز در نوتروفیل‌ها به مقدار زیاد و در

می‌دهد؛ بنابراین، استفاده از عصاره‌ی آبی صمغ گیاه بنه به‌عنوان مکمل درمانی برای کولیت اولسراتیو مزایای امیدوارکننده‌ای دارد که نیازمند انجام مطالعات تکمیلی است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از کسانی که ما را در این تحقیق یاری کردند تشکر می‌کنند. این طرح تحقیقاتی دارای کد اخلاق در پژوهش به شماره IR.BMSU.AEC.1400.001 می‌باشد.

حامی مالی

این مطالعه هیچ‌گونه حامی مالی نداشته است.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تضاد منافی را نویسندگان گزارش نمی‌کنند.

References

- Sandborn WJ, Ferrante M, Bhandari BR, Berliba E, Feagan BG, Hibi T, Tuttle JL, Klekotka P, Friedrich S, Durante M, Morgan-Cox M. Efficacy and safety of mirikizumab in a randomized phase 2 study of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2020;158(3):537-549. doi: 10.1053/j.gastro.2019.08.043 pmid: 31493397
- Lukin D, Faleck D, Xu R, Zhang Y, Weiss A, Aniwani S, Kadire S, Tran G, Rahal M, Winters A, Chablaney S. Comparative safety and effectiveness of vedolizumab to tumor necrosis factor antagonist therapy for ulcerative colitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2022;20(1):126-135. doi: 10.1016/j.cgh.2020.10.003
- Vaezi MF, Rustagi PK, Elson CO. Transient protein S deficiency associated with cerebral venous thrombosis in active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 1995;90(2). PMID: 7847309
- El Mahdy RN, Nader MA, Helal MG, Abu-Risha SE, Abdelmageed ME. Eicosapentaenoic acid mitigates ulcerative colitis-induced by acetic acid through modulation of NF- κ B and TGF- β /EGFR signaling pathways. *Life Sci*. 2023;327:121820. doi: 10.1016/j.lfs.2023.121820 pmid : 37263490
- Iacucci M, de Silva S, Ghosh S. Mesalazine in inflammatory bowel disease: a trendy topic once again?. *Can J Gastroenterol*. 2010; 24:127-133. doi: 10.1155/2010/586092 pmid: 20151072
- Bohm M, Xu R, Zhang Y, Varma S, Fischer M, Kochhar G, Boland B, Singh S, Hirten R, Ungaro R, Shmidt E. Comparative safety and effectiveness of vedolizumab to tumour necrosis factor antagonist therapy for Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2020;52(4):669-681. doi: 10.1111/apt.15921 pmid: 32656800
- Gourine N, Yousfi M, Bombarda I, Nadjemi B, Gaydou E. Seasonal variation of chemical composition and antioxidant activity of essential oil from *Pistacia atlantica* Desf. leaves. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2010; 87(2):157-166. doi:10.1007/s11746-009-1481-5
- Ahmed HM. Traditional uses of Kurdish medicinal plant *Pistacia atlantica* subsp. *kurdica* Zohary in Ranya, Southern Kurdistan. *Genet Resour Crop Evol*. 2017; 64(6):1473-84. doi: 10.1007/s10722-017-0522-4
- Tahmourespour A, Aminzadeh A, Salehifard I. Anti-adherence and anti-bacterial activities of *Pistacia atlantica* resin extract against strongly adherent *Streptococcus mutans* strains. *Dent Res J*. 2022;19. pmid: 35669603
- Shakarami Z, Ghaleh HE, Motlagh BM, Sheikhan A, Kondori BJ. Evaluation of the protective and therapeutic effects of *Pistacia atlantica* gum aqueous extract on cellular and pathological aspects of experimental asthma in Balb/c mice. *Avicenna J Phytomed*. 2019; 9(3):248. PMID: 31143692
- Falahi E, Delshadian Z, Ahmadvand H, Shokri Jekar S. Head space volatile constituents and antioxidant properties of five traditional Iranian wild edible plants grown in west of Iran. *AIMS Agriculture and Food*. 2019: 26.
- Palla AH, Iqbal NT, Minhas K, Gilani AH. Flaxseed extract exhibits mucosal protective effect in acetic acid induced colitis in mice by modulating cytokines, antioxidant and

anti-inflammatory mechanisms. *Int Immunopharmacol*. 2016 ;38:153-166. doi: 10.1016/j.intimp.2016.04.043 pmid: 27280586

واکنش‌دهنده‌ی فاز حاد در بیماری کرون، پس از درمان با عصاره‌ی صمغ گیاه بنه، به‌طور درخور توجهی کاهش می‌یابد (۳۵). در مطالعات گوناگون، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی صمغ گیاه بنه به توکوفرول‌ها، توکوترینول‌ها و α -پینین نسبت داده شده است (۳۴، ۳۷، ۳۶).

نتیجه‌گیری

طبق نتایج مطالعه‌ی حاضر، ترکیبات α -پینین و β -پینین موجود در صمغ گیاه بنه دارای اثرات ضدالتهابی است و به‌طور مؤثر معیار فعالیت بیماری و میزان تولید واسطه‌های فعال التهاب را در مدل تجربی کولیت اولسراتیو ناشی از اسیداستیک کاهش می‌دهد. فرایند استخراج آسان و سریع صمغ گیاه بنه فرصت‌های جدیدی را برای استفاده از طب سنتی در درمان بیماری‌های التهابی ایجاد می‌کند و به‌طور بالقوه، نیاز به دوزهای بالای مزالازین و عوارض جانبی مرتبط با آن را کاهش

- anti-inflammatory mechanisms. *Int Immunopharmacol*. 2016 ;38:153-166. doi: 10.1016/j.intimp.2016.04.043 pmid: 27280586
- Gheibi S, Hashemi SR, Karimipour M, Motlagh BM, Ghaleh HE. Synergistic effects of hydro extract of jujube fruit in combination with Mesalazine (orally) and Asacol (intra-colonic) administration in ameliorating animal model of ulcerative colitis. *Journal of Coloproctology*. 2018 ;38:275-282.
- Park YH, Kim N, Shim YK, Choi YJ, Nam RH, Choi YJ, Ham MH, Suh JH, Lee SM, Lee CM, Yoon H. Adequate dextran sodium sulfate-induced colitis model in mice and effective outcome measurement method. *J Cancer Prev*. 2015; 20(4):260. doi: 10.15430/JCP.2015.20.4.260 pmid: 26734588
- Pulli B, Ali M, Forghani R, Schob S, Hsieh KL, Wojtkiewicz G, Linnoila JJ, Chen JW. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. *PLoS one*. 2013 ;8(7):e67976. doi: 10.1371/journal.pone.0067976 pmid: 23861842
- Mashhour S, Froushani SM, Tehrani AA. Non-Adherent Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Clinical Manifestations and Inflammation in an Experimental Model of Ulcerative Colitis in Rats. *Iran J Med Sci*. 2020; 45(5):341. doi: 10.30476/ijms.2020.72514.0 pmid: 33060877
- Froushani SM, Zarei L, Ghaleh HE, Motlagh BM. Estragole and methyl-eugenol-free extract of *Artemisia dracunculus* possesses immunomodulatory effects. *Avicenna J Phytomed*. 2016;6(5):526. PMID: 27761422
- Jahantigh M, Froushani SM, Ahangaran NA. Benefits of bone marrow-derived mesenchymal stem cells primed with estradiol in alleviating collagen-induced arthritis. *Iran J Basic Med Sci*. 2023; 26(4):400. doi: 10.22038/IJBMS.2023.68112.14882 pmid: 37009006
- Lü JM, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med*. 2010; 14(4):840-860. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x pmid: 19754673
- Haghdooost, F., Baradaran Mahdavi, M. M., Zandifar, A., Sanei, M. H., Zolfaghari, B., & Javanmard, S. H. (2013). *Pistacia atlantica* resin has a dose-dependent effect on angiogenesis and skin burn wound healing in rat. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013 :893425. doi: 10.1155/2013/893425 pmid: 24285978
- He J, Liang J, Zhu S, Zhao W, Zhang Y, Sun W. Protective effect of taurohyodeoxycholic acid from *Pulvis Fellis Suis* on trinitrobenzene sulfonic acid induced ulcerative colitis in mice. *Eur J Pharmacol*. 2011;670(1):229-235. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.08.036 pmid: 21925164
- Connelly L, Jacobs AT, Palacios-Callender M, Moncada S, Hobbs AJ. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression. *J Biol Chem*. 2003; 278(29):26480-7. doi: 10.1074/jbc.M302238200 pmid: 12740377
- He J, Liang J, Zhu S, Li J, Zhang Y, Sun W. Anti-inflammatory effects of *Pulvis Fellis Suis* extract in mice with ulcerative colitis. *J Ethnopharmacol*. 2011; 138(1):53-59. doi: 10.1016/j.jep.2011.08.019 pmid: 21872653
- Lopes LD, Marques RB, Fernandes HB, Pereira SD, Ayres MC, Chaves MH, Almeida FR. Mechanisms of the antinociceptive action of (-) epicatechin obtained from the hydroalcoholic

- fraction of *Combretum leprosum* Mart & Eic in rodents. *J Biomed Sci.* 2012;19:1-6. doi: 10.1186/1423-0127-19-68 PMID: 22830928
25. Dudeck J, Kotrba J, Immler R, Hoffmann A, Voss M, Alexaki VI, Morton L, Jahn SR, Katsoulis-Dimitriou K, Winzer S, Kollias G. Directional mast cell degranulation of tumor necrosis factor into blood vessels primes neutrophil extravasation. *Immunity.* 2021;54(3):468-483. doi: 10.1016/j.immuni.2020.12.017 PMID: 33484643
 26. Ashraf K, Esmaeli E, Shahinfard N, Ansari R, Parvin N, Namjoo A, Borjian S, Shirzad H, Mansouri S, Rafieyan M. The effect of hydroalcoholic extracts of *Zizipus vulgaris* L. on burn healing. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences.* 2011; 12(4):78-82.
 27. Bossone C, Hosseini JM, Piñeiro-Carrero V, Shea-Donohue T. Alterations in spontaneous contractions in vitro after repeated inflammation of rat distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001; 280(5):G949-57. doi: 10.1152/ajpgi.2001.280.5.G949 PMID: 11292604
 28. Cho EJ, Shin JS, Noh YS, Cho YW, Hong SJ, Park JH, Lee JY, Lee JY, Lee KT. Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Patrinia scabiosaefolia* in mice with ulcerative colitis. *J Ethnopharmacol.* 2011; 136(3):428-435. doi: 10.1016/j.jep.2010.04.047 PMID: 20573566
 29. Gharazi P, Momtaz S, Rezaei Z, Rahimifard M, Baeri M, Abdollahi A, Abdollahi M, Zare K, Farzaei MH. Protective effect of a formulation containing *Pistacia atlantica* oleo-gum-resin and honey on experimental model of acetic acid-induced colitis in rats. *Research Journal of Pharmacognosy.* 2021; 8(2):37-49. doi: 10.22127/rjp.2021.260288.1647
 30. Ostovan M, Fazljou SM, Khazraei H, Araj Khodaei M, Torbatii M. The anti-inflammatory effect of *Pistacia lentiscus* in a rat model of colitis. *J Inflamm Res.* 2020;13: 369-376. doi: 10.2147/JIR.S259035 PMID: 32801830
 31. Gholami M, Ghasemi-Niri SF, Maqbool F, Baeri M, Memariani Z, Pousti I, Abdollahi M. Experimental and Pathological study of *Pistacia atlantica*, butyrate, *Lactobacillus casei* and their combination on rat ulcerative colitis model. *Pathol Res Pract.* 2016; 212(6):500-508. doi: 10.1016/j.prp.2016.02.024 PMID: 26972417
 32. Honmore V, Kandhare A, Zanzwar AA, Rojatkhar S, Bodhankar S, Natu A. *Artemisia pallens* alleviates acetaminophen induced toxicity via modulation of endogenous biomarkers. *Pharm Biol.* 2015; 53(4):571-581. doi: 10.3109/13880209.2014.934382 PMID: 25339313
 33. Zhou M, He J, Shen Y, Zhang C, Wang J, Chen Y. New frontiers in genetics, gut microbiota, and immunity: a rosetta stone for the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Biomed Res Int.* 2017;2017:8201672. doi: 10.1155/2017/8201672 PMID: 28831399
 34. Minaiyan M, Karimi F, Ghannadi A. Anti-inflammatory effect of *Pistacia atlantica* subsp. *kurdica* volatile oil and gum on acetic acid-induced acute colitis in rat. *Res J Pharmacogn.* 2015; 2(2):1-2.
 35. Kaliora AC, Stathopoulou MG, Triantafyllidis JK, Dedoussis GV, Andrikopoulos NK. Chios mastic treatment of patients with active Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2007;13(5):748. doi: 10.3748/wjg.v13.i5.748 PMID: 17278198
 36. Tavakoli J, Hajpour Soq K, Yousefi A, Estakhr P, Dalvi M, Mousavi Khaneghah A. Antioxidant activity of *Pistacia atlantica* var *mutica* kernel oil and its unaponifiable matters. *J Food Sci Technol.* 2019; 56:5336-45. doi: 10.1007/s13197-019-04004-0 PMID: 31749481
 37. Mahjoub F, Rezaayat KA, Yousefi M, Mohebbi M, Salari R. *Pistacia atlantica* Desf. A review of its traditional uses, phytochemicals and pharmacology. *J Med Life.* 2018; 11(3):180. doi: 10.25122/jml-2017-0055 PMID: 30364651