

## اثر ضدالتهابی اسانس حاصل از *Eucalyptus globulus* Labill. و تأثیر آن بر مسیر NF-κB

کبری حبیبی<sup>۱</sup>، حسن رفعتی<sup>۲\*</sup>، ابوالحسن احمدیانی<sup>۳</sup>، آتوسا علی‌احمدی<sup>۴</sup> و مارک دی ادریچ<sup>۵</sup>

۱- دانشجوی دکترا، گروه فیتوشیمی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه فیتوشیمی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

پست الکترونیک: H\_Rafati@sbu.ac.ir

۳- استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه بیولوژی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۵- دانشیار، گروه داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه ملی سئول، سئول، کره

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۶

تاریخ اصلاح نهایی: شهریور ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۵

### چکیده

التهاب یکی از واکنش‌های دفاعی بدن در برابر میکروارگانیسم‌ها و عوامل حساسیت‌زا است. مسیر NF-κB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) یک جزء ضروری از پاسخ‌های التهابی دخیل در تعدادی از بیماری‌های دستگاه تنفسی مانند آسم و بیماری انسداد مزمن ریوی (COPD) است. در طب سنتی، گیاه *Eucalyptus globulus* Labill. از تیره Myrtaceae به شکل استنشاقی برای بیماری‌های عفونی و التهابی دستگاه تنفسی استفاده می‌شود. در این مطالعه، فعالیت ضدالتهابی اسانس *E. globulus* و همچنین تأثیر آن بر مسیر NF-κB بررسی شد. برای ارزیابی فعالیت ضدالتهابی، از مدل التهاب ایجاد شده توسط کاراژینان در کف پای موش استفاده شد. اسانس به صورت داخل صفاقی در دوزهای ۳-۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن حیوان تزریق شد. از استیل سالیسیلیک اسید (آسپرین) در دوز ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. یک مدل آزمایشگاهی براساس ساختار ژن گزارشگر لوسیفرآز (با تکرارهایی از یک توالی کدینگ مورد توافق NF-κB) برای بررسی اثرات مهارکنندگی اسانس بر مسیر NF-κB در سلول‌های لوسمی میلوئید مزمن انسانی (K562) در غلظت‌های ۲۵۰-۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. اسانس *E. globulus* به‌طور معنی‌داری سبب کاهش التهاب ( $p < 0/05$ ) در دوزهای ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم در زمان ۱ تا ۳ ساعت پس از تزریق کاراژینان گردید. میزان حداکثر کاهش التهاب حدود ۵۸٪ نسبت به گروه کنترل بود. همچنین اسانس *E. globulus* توانست فعالیت NF-κB ناشی از TNFα (Tumor Necrosis Factor alpha) را به‌طور معنی‌داری ( $p < 0/01$ ) در غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش دهد. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که اسانس *E. globulus* یک محصول طبیعی ضدالتهابی قوی است که اثرات آن احتمالاً از طریق مسیر NF-κB تنظیم می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: اسانس، *Eucalyptus globulus* Labill.، التهاب، کاراژینان، NF-κB.

## مقدمه

NF- $\kappa$ B یک ترکیب پروتئینی پیچیده است که رونویسی DNA، تولید سیتوکین و زنده‌مانی سلولی را کنترل می‌کند. NF- $\kappa$ B نقشی کلیدی در تنظیم پاسخ‌های سلولی بر عهده دارد و تعدادی از شناخته‌شده‌ترین عوامل القاء فعالیت آن عبارتند از: ROS (Reactive Oxygen Species)، TNF $\alpha$ ، (Tumor Necrosis Factor alpha) و LPS (bacterial lipopolysaccharides) (Gilmore, 2006). NF- $\kappa$ B در کنترل بسیاری از ژن‌های مسئول در فرایند التهاب دخیل است و نقش پیام‌رسانی مهمی در بسیاری از بیماری‌های التهابی از جمله بیماری‌های التهابی دستگاه تنفسی همانند آسم و COPD ایفاء می‌کند (Edwards *et al.*, 2009؛ Wong & Tergaonkar, 2009). باوجود این، فعالیت بیش از حد NF- $\kappa$ B خود سبب بروز و یا تشدید بیماری می‌گردد. در سال‌های اخیر، NF- $\kappa$ B به‌عنوان یک هدف درمانی برای داروهای جدید مورد توجه قرار گرفته است (Garg & Aggarwal, 2002). همچنین گزارش شده است که بسیاری از ترکیب‌های طبیعی دارای اثر ضدالتهابی، فعالیت خود را از طریق مهار مسیر تولید NF- $\kappa$ B انجام می‌دهند (Paur *et al.*, 2010).

هدف اصلی از این مطالعه، بررسی فعالیت ضدالتهابی اسانس *E. globulus* بود. کارایی اسانس *E. globulus* در کاهش التهاب در مدل التهاب ایجاد شده توسط کاراژینان در پشت پای موش مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نقش مهم پیام‌رسانی NF- $\kappa$ B در بیماری‌های مهم دستگاه تنفسی همانند آسم و COPD اثر اسانس *E. globulus* روی این مسیر در شرایط آزمایشگاهی در سلول‌های K562، یک لاین سلولی لوسمی میلوئید مزمن انسانی، مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این، پروفایل شیمیایی اسانس برای درک بهتر اثر ضدالتهابی مشاهده شده و ارتباط آن با ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس، با استفاده از دستگاه GC و GC-MS مورد آنالیز قرار گرفت.

التهاب بخشی از واکنش‌های دفاعی بدن در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عوامل حساسیت‌زا است. در غیاب التهاب، زخم‌ها و عفونت‌ها هیچ وقت التیام نمی‌یابند. باوجود این، هنگامی که واکنش‌های التهابی مزمن و غیرقابل کنترل می‌شوند، می‌توانند منجر به اختلالاتی از جمله سرطان، حملات قلبی و بیماری انسداد مزمن ریوی (COPD) شوند (White, 2005؛ Taubes, 2002؛ Moore *et al.*, 2010). بنابراین، کنترل التهاب یک هدف مهم برای پزشکان و گروه‌های تحقیقاتی کشف داروست. متأسفانه، داروهای ضدالتهابی موجود، عوارض جانبی متعددی دارند که نیاز به داروهای ضدالتهابی جدید را دوجندان می‌کنند. در این راستا، داروهای سنتی و گیاهان دارویی ممکن است مورد توجه زیاد باشند. ترکیب‌های جداسازی شده از گیاهان دارویی، منبع مطمئنی از ترکیب‌های فعال زیستی طبیعی هستند که فعالیت‌های ضدباکتری، ضدویروسی، ضدقارچی و ضدالتهابی دارند (Giamperi *et al.*, 2002؛ Reichling *et al.*, 2009). در طب سنتی برگ‌های درخت *Eucalyptus globulus* Labill. (Myrtaceae) به شکل استنشاقی برای بیماری‌های عفونی و التهابی دستگاه تنفسی استفاده می‌شود (Zargari, 1990). همچنین، مطالعات متعددی فعالیت ضدالتهابی اسانس و عصاره گیاه *E. globulus* را در محیط کشت و نیز در مدل حیوانی ارزیابی کرده‌اند (Silva *et al.*, 2003؛ Almeida *et al.*, 2009؛ Vigo *et al.*, 2004؛ Serafino *et al.*, 2008). علاوه بر این، گزارش شده است که ترکیب‌های مونوترپنوئیدی اسانس گیاه *E. globulus* توانستند فعالیت ضدالتهابی و ضددردی از خود نشان دهند (Santos & Rao 2000؛ Liapi *et al.*, 2007). همچنین مطالعات قبلی نشان دادند که جزء عمده اسانس *E. globulus*، یعنی ۱،۸-سینئول یا اکالیپتول، توانست تولید سیتوکین و متابولیسم آراشیدونیک اسید را در مونوسیت‌های انسانی مهار کند (Juergens *et al.*, 2004؛ Juergens *et al.*, 1998).

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

برگ‌های خشک گیاه *E. globulus* از عطاری خریداری و توسط بخش گیاه‌شناسی پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی، مورد تأیید قرار گرفت (شماره سند: ۱۷۵۱، MPH).

### استخراج، جداسازی و شناسایی اسانس

از ۱۰۰ گرم گیاه مذکور با روش تقطیر با آب و به‌کمک کلونجر به مدت سه ساعت اسانس‌گیری بعمل آمد. سپس اسانس‌های بدست آمده توسط سدیم‌سولفات خشک و در یک ظرف تیره و در بسته تا زمان آنالیز در یخچال در دمای ۴°C نگهداری شدند.

آنالیز اسانس به کمک دستگاه گاز کروماتوگراف Thermoquest مدل Trace مجهز به ستون DB-5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه نازک ۰/۲۵ میکرومتر انجام شد. دمای محفظه تزریق و آشکارساز به ترتیب ۲۵۰°C و ۳۰۰°C بود و از نیتروژن با سرعت ۱/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه به‌عنوان گاز حامل استفاده شد. برنامه‌ریزی حرارتی آن به این صورت بود که دما از ۶۰ تا ۲۵۰°C با سرعت ۴ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش پیدا کرد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵۰°C ثابت نگه داشته شد.

شناسایی اجزاء اسانس به کمک دستگاه گاز کروماتوگراف کویل شده با طیف‌سنج جرمی Thermoquest-Finnigan مدل Trace مجهز به ستون DB-5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه نازک ۰/۲۵ میکرومتر انجام شد. هلیوم با سرعت جریان ۱/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه به‌عنوان گاز حامل و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت استفاده شد. برنامه دمایی همانند دستگاه GC تنظیم گردید.

از دستگاه GC برای جداسازی و تعیین درصد هر یک از اجزاء اسانس استفاده شد. سپس اسانس توسط دستگاه GC-MS با استفاده از پارامترهای مختلف از قبیل زمان و شاخص بازداری (RI)، مطالعه طیف‌های جرمی و مقایسه

این طیف‌ها با ترکیب‌های استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه رایانه دستگاه GC-MS مورد شناسایی کیفی قرار گرفت. سپس، درصد نسبی هر یک از ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس با توجه به سطح زیر منحنی آن در کروماتوگرام GC به روش نرمال کردن سطح و نادیده گرفتن ضرایب پاسخ بدست آمد.

### ارزیابی فعالیت ضدالتهابی

#### مطالعه حیوانی

در کلیه آزمایش‌ها از موش نر صحرایی سفید (Ratus albinus) با نژاد ویستار (Wistar) استفاده شد. حیوانات در جعبه‌های مخصوص نگهداری حیوان از جنس پلکسی گلاس با درب فلزی مشبک نگهداری شدند و هیچ محدودیتی از نظر آب و غذا نداشتند. نگهداری در دمای ۲°C ± ۲۴ و در ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی انجام شد. تمامی موش‌های صحرایی مورد استفاده در محدوده وزنی ۲۰ ± ۲۰۰ گرم بودند و در دسته‌های ۶ تایی نگهداری شدند. هر حیوان فقط یک‌بار استفاده شد. حیوانات از دانشکده فارماکولوژی، دانشگاه شهید بهشتی تهران تهیه شدند.

اثرات ضدالتهابی آسپرین و اسانس در مدل التهاب ایجاد شده توسط کاراژینان در کف پای موش بررسی شد (Winter et al., 1962). کاراژینان با غلظت ۱٪ و به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر به‌صورت زیر جلدی به کف پای چپ حیوان تزریق شد. غلظت‌های مختلف اسانس (دوزهای ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و آسپرین (۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به‌صورت داخل صفاقی به سمت چپ حیوان تزریق شدند و حجم تزریق در هر مورد ۰/۲ میلی‌لیتر به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن حیوان بوده است. حلال تمامی اسانس‌ها و نیز آسپرین، نرمال سالین به همراه توئین ۸۰ با غلظت ۴٪ بود. در این آزمایش‌ها ابتدا حجم پای چپ حیوان اندازه‌گیری شد، سپس غلظت‌های مختلف اسانس یا آسپرین به آن تزریق شد و نیم ساعت پس از تزریق، کاراژینان به کف پای چپ حیوان تزریق شد. وزن پای تزریق شده در زمان‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ ساعت پس از

۵ تکرار از یک ترادف مورد توافق NF- $\kappa$ B (Stratagene, Netherlands, Huissen) و ۵ میکروگرم از پلاسمید لوسیفراز *Renilla reniformis* بود برای هر پالس در الکتروپوریشن استفاده شد. پس از انجام الکتروپوریشن، سوسپانسیونی از سلولها در محیط کشت RPMI که حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی بود تهیه شده و در ۳۷°C درجه سانتی‌گراد تحت اتمسفر CO<sub>2</sub> ۵٪ گرماگذاری شد. ۲۰ ساعت پس از انتقال ژن، سلولها جمع‌آوری شده و سوسپانسیونی با غلظت نهایی ۱۰۶ سلول در میلی‌لیتر از آنها در محیط کشت RPMI حاوی ۱٪ سرم جنین گاوی تهیه شد و به مدت دو ساعت تحت تیمار با اسانس *E. globulus* قرار داده شد. یک نمونه هم به عنوان کنترل در همان شرایط بدون اسانس تهیه و نگهداری شد. سپس سلولها به مدت ۶ ساعت با غلظت ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از TNF $\alpha$  تحت تیمار قرار گرفتند. پیش از اندازه‌گیری میزان فعالیت لوسیفراز (کرم شب‌تاب)، محلولی از ۷۵ میکرولیتر معرف Dual-Glo Luciferase (Promega) به سلولها اضافه شده و سلولها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. سپس ۷۵ میکرولیتر از معرف Dual-Glo Stop & Glo (Promega) به مخلوط اضافه شده و دوباره گرماگذاری در همان شرایط تکرار شد. به منظور تعیین میزان فعالیت لوسیفراز *Renilla* از لومینومتر Orion (Berthold, Pforzheim, Germany) استفاده شد و نشر نور به مدت ۱۰ ثانیه بود. نتایج به شکل نسبتی از فعالیت لوسیفراز (کرم شب‌تاب) که با توجه به فعالیت لوسیفراز *Renilla* نرمالایز شده بود تعیین گردید.

#### تجزیه و تحلیل آماری

تمام نتایج بدست آمده به صورت Mean  $\pm$  SEM نشان داده شده‌اند. برای مقایسه میزان اثر دوزهای مختلف اسانس و دارو، با کمک نرم‌افزار SPSS و بعد از بررسی نرمال بودن شکل توزیع جامعه با کمک آزمون One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test، از ANOVA یک‌طرفه و به دنبال آن از آزمون Tukey استفاده شد. احتمال ( $p$ ) کمتر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

تزریق اندازه‌گیری شد. به گروه کنترل تنها حلال‌دارها یعنی نرمال سالین به همراه توئین ۸۰ تزریق گردید. هر غلظت از اسانس و همچنین اسپرین بر روی ۶ حیوان بررسی شد. برای اندازه‌گیری حجم پا به روشی که قبلاً توسط Fereidoni و همکاران (۲۰۰۰) توضیح داده شده است، استفاده شد. به طور خلاصه، یک ظرف پلاستیکی لوله‌ای شکل حدود ۵ سانتی‌متر طول و ۲ سانتی‌متر عرض که یک انتهای آن بسته و در داخل یک پتری چسبانیده شده بود تا ارتفاع حدود ۴/۵ سانتی‌متر از جیوه پر شد و پس از قرار گرفتن روی ترازو، ترازو صفر شد. دور پای چپ حیوان در ناحیه مج حلقه‌ای با ماژیک کشیده شد. حیوان داخل یک نگهدارنده حیوان (restrainer) قرار گرفت و پای چپ حیوان از برش طولی موجود در نگهدارنده خارج شد و تا محل علامت طوری وارد ستون جیوه شد که با بدنه لوله هیچ تماسی نداشته باشد. بنابر قانون ارشمیدس، ترازو وزن مقدار جیوه جابجا شده را نشان می‌دهد. اگر این وزن را بر جرم حجمی جیوه (۱۳/۶) تقسیم کنیم، حجم جیوه جابجا شده بر حسب میلی‌لیتر بدست می‌آید که برابر حجم پای حیوان تا آن قسمتی است که وارد جیوه شده است. بدین ترتیب حجم پای حیوان قابل محاسبه بود.

#### مطالعه آزمایشگاهی

##### کشت سلول و تیمار

سلول‌های لوسمی میلوئید مزمن انسانی K562 در محیط RPMI 1640 (Lonza, Verviers, Belgium) همراه با سرم جنین گاوی ۱۰٪ (Lonza)، پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد/میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) (Lonza) کشت داده شدند. سلول‌ها در یک انکوباتور CO<sub>2</sub> ۵٪ و دمای ۳۷°C کشت و هر ۳ روز پاساژ داده شدند.

انتقال گذرای ژن و سنجش ژن گزارشگر لوسیفراز انتقال گذرای ژن به سلولهای k562 براساس روشی که قبلاً ۴۴ ارائه شده بود، انجام شد (Duvoix et al., 2004). به طور خلاصه ۵ میکروگرم از سازه ژن گزارشگر لوسیفراز که حاوی

## نتایج

با مطالعه و بررسی دقیق زمان‌های بازداری ترکیب‌ها، شاخص بازداری، طیف‌های جرمی و مقایسه این پارامترها با ترکیب‌های استاندارد و کتابخانه دستگاه، ۱۹ ترکیب در اسانس برگ‌های درخت *E. globulus* شناسایی شد که ۹۴٪ کل اسانس را تشکیل می‌دادند (جدول ۱). ترکیب‌های

اصلی اسانس عبارت بودند از: آلفا-فلاندرن (۴۴/۲٪) و ۱،۸-سینئول (۳۱/۶٪). در اسانس حاصل ۵۳/۴٪ مونوترپن‌های هیدروکربنی، ۳۳/۲٪ مونوترپن‌های اکسیژن‌دار، ۶/۲٪ سسکوئی‌ترین‌های هیدروکربنی و ۱/۲٪ سسکوئی‌ترین‌های اکسیژن‌دار وجود داشتند.

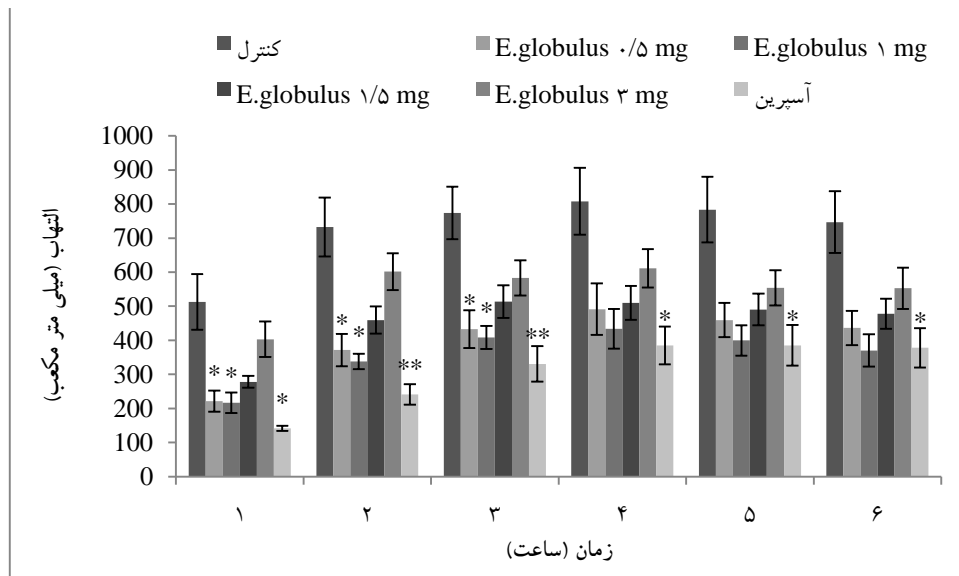
جدول ۱- آنالیز فیتوشیمیایی اسانس *E. globulus* توسط دستگاه GC و GC-MS

ردیف	نام ترکیب	شاخص بازداری	درصد	روش شناسایی
۱	$\alpha$ -thujene	۹۳۰	۰/۷	RI-MS
۲	$\alpha$ -pinene	۹۳۹	۲/۴	RI-MS
۳	sabinene	۹۷۷	۰/۱	RI-MS
۴	$\beta$ -pinene	۹۸۳	۰/۱۲	RI-MS
۵	myrcene	۹۹۰	۰/۶	RI-MS
۶	$\alpha$ -phellanderene	۱۰۱۴	۴۴/۲	RI-MS
۷	$\alpha$ -terpinene	۱۰۲۱	۱/۰	RI-MS
۸	p-cymene	۱۰۳۱	۰/۹	RI-MS
۹	1,8-cineole	۱۰۴۱	۳۱/۶	RI-MS
۱۰	$\gamma$ -terpinene	۱۰۶۳	۳/۳	RI-MS
۱۱	terpinolene	۱۰۹۳	۰/۵	RI-MS
۱۲	terpinene-4-ol	۱۱۸۳	۱/۱	RI-MS
۱۳	$\alpha$ -gurjunene	۱۴۲۳	۰/۱	RI-MS
۱۴	E-caryophyllene	۱۴۳۶	۲/۸	RI-MS
۱۵	aromadendrane	۱۴۵۶	۱/۵	RI-MS
۱۶	$\alpha$ -humulene	۱۴۶۹	۰/۲	RI-MS
۱۷	9-epi-(E)-caryophyllene	۱۴۷۷	۰/۵	RI-MS
۱۸	bicyclgermacrene	۱۵۱۲	۱/۲	RI-MS
۱۹	viridiflorol	۱۶۰۶	۱/۲	RI-MS

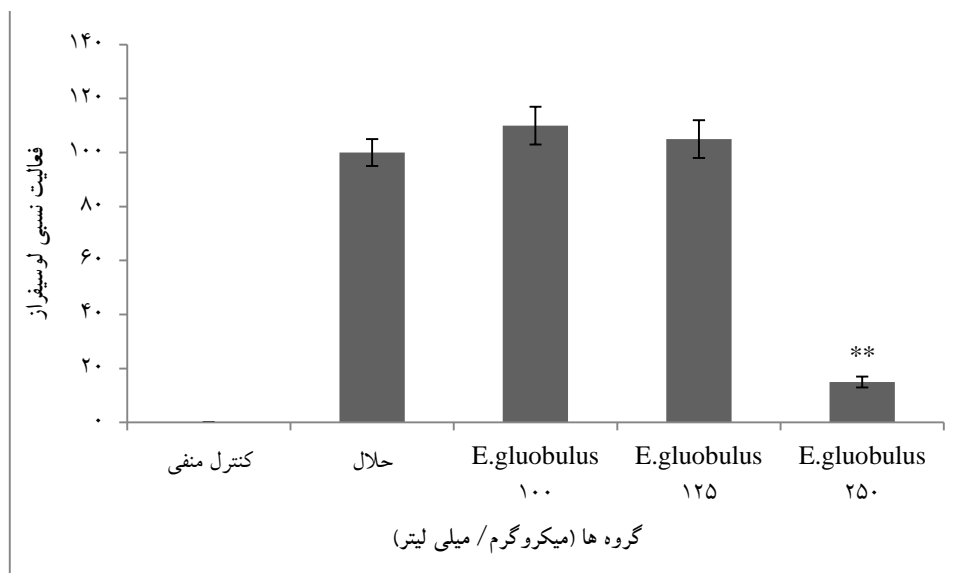
نتایج مربوط به اثر ضدالتهابی دوزهای مختلف اسانس و نیز آسپرین در نمودار ۱ نشان داده شده است. اسانس *E. globulus* در دوزهای ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم تزریق شد. نتایج نشان داد که تنها دوزهای ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم از اسانس در کاهش التهاب مؤثر بودند. اسانس *E. globulus* در دوز ۰/۵ میلی‌گرم در طی دوره زمانی ۱

( $P < 0.05$ ،  $P < 0.05$ )، ۲ ( $P < 0.05$ ،  $P < 0.05$ ) و ۳ ( $P < 0.05$ )، ۴۴٪ ساعت پس از تزریق کاراژینان و در دوز ۱ میلی‌گرم همانند دوز ۰/۵ میلی‌گرم در مدت زمان ۱ ( $P < 0.05$ )، ۵۸٪، ۲ ( $P < 0.05$ ،  $P < 0.05$ ) و ۳ ( $P < 0.05$ )، ۴۷٪ ساعت پس از تزریق کاراژینان، باعث کاهش معنی‌دار التهاب شدند. همانگونه که از شکل ۱ برمی‌آید دوزهای ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم

اسانس *E. globulus* نسبت به دوز ۲۵۰ میلی‌گرم آسپرین آماری معنی‌دار بین آنها مشاهده نشد. فعالیت کمتری در کاهش التهاب داشتند اما هیچگونه تفاوت



شکل ۱- اثر ضدالتهابی اسانس *E. globulus* در دوزهای ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم و آسپرین در دوز ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه کنترل ( $p < 0.05$  و  $p < 0.01$ ) در کف پای موش تا ۶ ساعت پس از تزریق کاراژینان (تعداد حیوان برای هر غلظت مطالعه شده=۶)



شکل ۲- مهار فعالیت NF-KB توسط TNF $\alpha$  به وسیله پیش تیمار با عصاره *E. globulus* در دوزهای ۱۰۰، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر در مقایسه با گروه کنترل ( $p < 0.05$  و  $p < 0.01$ ) در سلول‌های لوسمی میلوئید مزمن انسانی (K562)

دوزهای ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم اسانس *E. globulus* در مدل التهاب ایجاد شده توسط تزریق ۰/۱ میلی‌لیتر محلول کارازینان (۲۰۰ μg/paw) به علاوه پروستاگلاندین I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>)، ۲۰۰ ng/paw)، دوز ۱۰ میلی‌گرم اسانس نتوانست التهاب را کاهش دهد و دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در بهترین حالت توانست به میزان ۷۶٪ التهاب را کاهش دهد. البته در این مطالعه، پروفایل شیمیایی اسانس *E. globulus* گزارش نشده بود. با توجه به اینکه آلفا-فلاندین مقدار قابل توجهی از اسانس *E. globulus* را در این مطالعه به خود اختصاص داده است اثرات ضدالتهابی (Siqueira et al., 2016) و ضدردی (Lima et al., 2012) گزارش شده از آلفا-فلاندین ممکن است عاملی اثرگذار بر تفاوت‌های مشاهده شده باشد. همچنین، این مطالعه ممکن است تأییدی بر اثر هم‌افزایی احتمالی آلفا-فلاندین و ۱،۸-سینئول در پاسخ ضدالتهابی افزایش یافته نسبت به مطالعات قبلی باشد.

تأثیر اسانس *E. globulus* بر مهار فعالیت NF-κB ناشی از TNFα، وابسته به دوز بود. IC<sub>50</sub> اسانس برای مهار فعالیت NF-κB در غلظت‌های بالاتر از ۱۲۵ میکروگرم/میلی‌لیتر مشاهده شد. در غلظت ۲۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر حداکثر اثر مهار فعالیت NF-κB توسط اسانس مشاهده شد. البته با توجه به اینکه آزمون زنده‌مانی سلولی انجام نشده است نمی‌توان با قطعیت گفت که اثر مشاهده شده در غلظت ۲۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر تنها به علت مهار فعالیت NF-κB بوده است. Greiner و همکاران (Greiner et al., 2013) گزارش کرده‌اند که ۱،۸-سینئول توانسته سبب مهار فعالیت NF-κB در رده‌های سلول‌های U373 و HeLa شود. علاوه بر این، اثرات سیستم ایمنی ۱،۸-سینئول در درمان پانکراس حاد آزمایشگاهی که از طریق مسیر NF-κB تنظیم می‌گردد، نشان داده شده است (Lima et al., 2013). براساس نقش شناخته شده پیام‌رسانی تنظیم شده با NF-κB در برخی از بیماری‌های تنفسی مانند آسم و COPD (Edwards et al., 2009)، این مسیر می‌تواند به‌عنوان یک هدف درمانی مناسب در نظر گرفته شود. البته مطالعات بیشتر روی اسانس *E. globulus* ممکن است یک مهارکننده جدید از سیستم

فعالیت بازدارندگی اسانس *E. globulus* بر مسیر NF-κB در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان دادند که اسانس فعالیت NF-κB ناشی از TNFα را به‌طور معنی‌داری (P < ۰/۰۱) با توجه به گروه کنترل مهار کرد و IC<sub>50</sub> اندازه‌گیری شده بالاتر از ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر بود. اسانس *E. globulus* فعالیت NF-κB ناشی از TNFα را حدود ۵۰٪ در یک غلظت بین ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مهار کرد.

## بحث

در این مطالعه، نتایج GC و GC-MS نشان داد که اجزاء اصلی اسانس *E. globulus*، از نظر کمیت، ۱،۸-سینئول (۳۱/۵۹٪) و آلفا-فلاندین (۴۴/۱۶٪) بودند. Kumar و همکاران (۲۰۱۲)، میزان ۱،۸-سینئول را در برگ‌های *E. globulus* به میزان ۳۳/۶۲٪ گزارش کردند. Papachristos و همکاران (۲۰۰۴) میزان آلفا-فلاندین را در اسانس حاصل از *E. globulus* حدود ۱۰/۳، ۲/۸ و ۵۰/۶۰٪ به ترتیب در طی سه ماه مختلف برداشت گزارش کردند. به‌طور کلی شیمی گیاهان با توجه به شرایط جغرافیایی مختلف و نیز زمان برداشت متفاوت، متغیر است. متفاوت بودن اجزای تشکیل‌دهنده و مقدار هر یک از آنها در اسانس مورد مطالعه، به‌ویژه مقدار ۱،۸-سینئول و آلفا-فلاندین، نسبت به گزارش‌های قبلی نیز می‌تواند به دلیل متفاوت بودن شرایط جغرافیایی رویشی گیاه باشد.

البته فعالیت ضدالتهابی اسانس *E. globulus* در مدل حیوانی مطالعه شده وابسته به دوز نبود. مؤثرترین دوز مشاهده شده ۱/۰ میلی‌گرم/کیلوگرم بود. افزایش دوز به بالاتر از ۱/۰ میلی‌گرم/کیلوگرم منجر به کاهش پاسخ ضدالتهابی شد. نتایج حاصل از این مطالعه در تأیید با یافته‌های قبلی است که گزارش کرده بودند تجویز زیرجلدی اسانس *E. globulus*، به‌طور قابل توجهی منجر به کاهش التهاب شد (Silva et al., 2003). طی مطالعات قبلی انجام شده در مورد اثرات ضدالتهابی اسانس *E. globulus* Silva و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که در تزریق زیرجلدی

- measurement of paw edema. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 43(1): 11-14.
- Garg A. and Aggarwal B.B., 2002. Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia*, 16(6): 1053-1068.
  - Giamperi, L., Fraternali, D. and Ricci, D., 2002. The in vitro action of essential oils on different organisms. *Journal of Essential Oil Research*, 14(4): 312-318.
  - Gilmore, T.D., 2006. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25(51): 6680-6684.
  - Greiner, J.F.W., Müller, J., Zeuner, M.T., Hauser, S., Seidel, T., Klenke, C.H., Grunwald, L.M., Schomann, T., Widera, D., Sudhoff, H., Kaltschmidt, B. and Kaltschmidt, C.H., 2013. 1,8-Cineol inhibits nuclear translocation of NF-κB p65 and NF-κB dependent transcriptional activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(12): 2866-2878.
  - Juergens, U.R., Stöber, M., Schmidt-Schilling, L., Kleuver, T. and Vetter, H., 1998. Anti-inflammatory effects of 1,8-cineole in bronchial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes ex vivo. *European Journal of Medical Research*, 3(9): 407-412.
  - Juergens, U.R., Engelen, T., Racké, K., Stöber, M., Gillissen, A. and Vetter, H., 2004. Inhibitory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 17(5): 281-287.
  - Kumar, P., Mishra, S., Malik, A. and Satya, S., 2012. Compositional analysis and insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* (family: Myrtaceae) essential oil against housefly (*Musca domestica*). *Acta Tropica*, 122(2): 212-218.
  - Liapi, Ch., Anifantis, G., Chinou, I., Kourounakis, A., Theodosopoulos, S. and Galanopoulos, P., 2007. Antinociceptive properties of 1,8-cineol and beta-pinene, from the essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* leaves, in Rodents. *Planta Medica*, 73(12): 1254-1274.
  - Lima, D.F., Brandão, M.S., Moura, J.B., Leitão, J.M., Carvalho, F.A., Miúra, L.M., Leite, J.R., Sousa, D.P. and Almeida, F.R., 2012. Antinociceptive activity of the monoterpene α-phellandrene in rodents: Possible mechanisms of action. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 64(2): 283-292.
  - Lima, P.R., Melo, T.S., Carvalho, K.M., de Oliveira, I.B., Arruda, B.R., de Castro Brito, G.A., Rao, V.S. and Santos, F.A., 2013. 1,8-cineole (eucalyptol) پیام‌رسانی NF-κB فراهم بیاورد. مهار کننده‌های دیگر NF-κB (از جمله الیگونوکلوئوتیدهای DNA، مولکول‌های DNA-پپتید، بازدارنده kappaB kinase β [IKK β] و مهار کننده‌های proteasome) نتایج جالب توجهی در مدل‌های حیوانی التهاب نشان داده‌اند و آزمایش‌های بالینی جدیدی برای درمان بیماری‌های التهابی به راه انداخته‌اند (Edwards et al., 2009).
- به‌طور کلی، این مطالعه نشان می‌دهد که اسانس *E. globulus* فعالیت ضدالتهابی قوی در مدل حیوانی آزمایشگاهی دارد. فعالیت بازدارندگی اسانس *E. globulus* بر مسیر NF-κB نشان می‌دهد که مسیر NF-κB ممکن است یکی از مکانیزم‌های احتمالی دخیل در فعالیت ضدالتهابی مشاهده شده در اسانس مورد مطالعه باشد.
- ### سپاسگزاری
- این کار با حمایت شورای پژوهش دانشگاه شهید بهشتی انجام شده است. نویسندگان همچنین سپاسگزاری خود را از حمایت پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی بعمل می‌آورند.
- ### منابع مورد استفاده
- Almeida, I.F., Fernandes, E., Lima, J.L., Valentão, P., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Costa, P.C. and Bahia, M.F., 2009. Oxygen and nitrogen reactive species are effectively scavenged by *Eucalyptus globulus* leaf water extract. *Journal of Medicinal Food*, 12(1): 175-183.
  - Duvoix, A., Delhalle, S., Blasius, R., Schneckeburger, M., Morceau, F., Fougère, M., Henry, E., Galteau, M.M., Dicato, M. and Diederich, M., 2004. Effect of chemopreventive agents on glutathione S-transferase P1-1 gene expression mechanisms via activating protein 1 and nuclear factor kappa B inhibition. *Biochemical Pharmacology*, 68(6): 1101-1111.
  - Edwards, M.R., Bartlett, N.W., Clarke, D., Birrell, M., Belvisi, M. and Johnston, S.L., 2009. Targeting the NF-kappaB pathway in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacology and Therapeutics*, 121(1): 1-13.
  - Fereidoni, M., Ahmadiani, A., Semnianian, S. and Javan, M., 2000. An accurate and simple method for



- Eucalyptus* essential oil on innate cell-mediated immune response. BMC Immunology, 9: 17-33.
- Silva, J., Abebeb, W., Sousa, S.M., Duarte, V.G., Machado, M.I.L. and Matos, F.J.A., 2003. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. Journal of Ethnopharmacology, 89(2-3): 277-283.
  - Siqueira, H., Neto, B., Sousa, D., Gomes, B., Cunha, F. and Oliveira, F., 2016. Antiedematogenic Effect of  $\alpha$ -Phellandrene in Animal Models. Current Bioactive Compounds, 12(2): 107-113.
  - Taubes, G., 2002. Does inflammation cut to the heart of the matter?. Science, 296(5566): 242-245.
  - Vigo, E., Cepeda, A., Gualillo, O. and Perez-Fernandez, R., 2004. In-vitro anti-inflammatory effect of *Eucalyptus globulus* and *Thymus vulgaris*: nitric oxide inhibition in J774A.1 murine macrophages. Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics, 56(2): 257-263.
  - White, P., 2005. COPD: Challenges and opportunities for primary Care. Respiratory Medicine: COPD Update, 1(2): 43-52.
  - Winter, C., 1962. Carrageenan-induced edema in hind paws of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 111: 544-547.
  - Wong, E.T. and Tergaonkar, V., 2009. Roles of NF-KB in health and disease: mechanisms Mechanisms and therapeutic potential. Clinical Science, 116(6): 451-465.
  - Zargari, A., 1991. Medicinal Plants. (Vol. 2), Tehran University Press, Tehran, 942p.
  - ameliorates cerulean induced acute pancreatitis via modulation of cytokines, oxidative stress and NF-KB activity in mice. Life Sciences, 92(24-26): 1195-1201.
  - Moore, M.M, Chua, W., Charles, K.A. and Clarke, S.J., 2010. Inflammation and cancer: causes and consequences. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 87(4): 504-508.
  - Papachristos, D.P., Karamanoli, K.I., Stamopoulos, D.C. and Menkissoglu-Spirodi, U., 2004. The relationship between the chemical composition of three essential oils and their insecticidal activity against *Acanthoscelides obtectus*. Pest Management Science, 60(5): 514-522.
  - Paur, I., Balstad, T.R., Kolberg, M., Pedersen, M.K., Austenaa, L.M., Jacobs, D.R. and Blomhoff, R., 2010. Extract of oregano, coffee, thyme, clove, and walnuts inhibits NF-kappaB in monocytes and in transgenic reporter mice. Cancer Prevention Research, 3(5): 653-663.
  - Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U. and Saller, R., 2009. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic propertiesan overview. Forschende Komplementärmedizin, 16(2): 79-90.
  - Santos, F.A. and Rao, V.S.N., 2000. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. Phytotherapy Research, 14(4): 240-244.
  - Serafino, A., Vallebona, P.S., Andreola, F., Zonfrillo, M., Mercuri, L., Federici, M., Rasi, G., Garaci, E. and Pierimarchi, P., 2008. Stimulatory effect of

## Anti-inflammatory activity of essential oil derived from *Eucalyptus globulus* Labill. and its impact on NF- $\kappa$ B pathway

K. Habibi<sup>1</sup>, H. Rafati<sup>2\*</sup>, A. Ahmadiani<sup>3</sup>, A. Aliahmadi<sup>4</sup> and M. Diederich<sup>5</sup>

1- Ph.D. Student, Department of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

2\*- Corresponding author, Department of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, E-mail: H\_Rafati@sbu.ac.ir

3- Department of Pharmacology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Department of Biology, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

5- Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, Korea

Received: October 2016

Revised: September 2017

Accepted: September 2017

### Abstract

Inflammation is one of the body's defensive reactions against microorganisms and allergens. The NF- $\kappa$ B pathway is an essential component of the inflammatory responses involved in a number of respiratory tract diseases, such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease. In traditional medicine, *Eucalyptus globulus* Labill. (Myrtaceae) is used in inhalation therapy for respiratory tract infections and inflammation. In this study, the anti-inflammatory activity of *Eucalyptus globulus* essential oil and its impact on the NF- $\kappa$ B pathway was evaluated. A rat model of carrageenan-induced hind paw edema was used to evaluate the anti-inflammatory activity of *E. globulus* oil. Essential oil was injected intraperitoneally at doses of 0.5-3 mg/kg. An *in vitro* model based on a luciferase reporter gene construct (with repeats of a consensus NF- $\kappa$ B coding sequence) was used for investigation of the inhibitory effects of oil on the NF- $\kappa$ B pathway at concentrations of 100-250  $\mu$ g/ml in Human chronic myeloid leukemia (K562) cells. *E. globulus* oil significantly reduced rat hind paw edema ( $P<0.05$ ) at doses of 0.5 and 1.0 mg/kg at 1 to 3 h after carrageenan injection. The maximal reduction in edema was 58%. *E. globules* oil inhibited TNF $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activity significantly ( $P<0.01$ ) at a concentration of 250  $\mu$ g/ml. The findings of the present study show that *E. globulus* essential oil is a potent anti-inflammatory natural product, whose effects could be mediated through the NF- $\kappa$ B pathway.

**Keywords:** Essential oil, *Eucalyptus globulus* Labill., inflammation, carrageenan, NF- $\kappa$ B.