Crop Biotech.
Autumn (2021) 11(1): 79-98. DOI: 10.30473/cb.2021.57154.1829

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال یازدهم، شماره اول، پیاپی سی‌وپنجم، پائیز ۱۴۰۰ (۹۸-۷۹)

«مقاله پژوهشی»

تاثیر سولفورافان موجود در عصاره گیاه *Brassica oleracea* بر دو فاکتور سیستم ایمنی *TNFα* و *IL-6*، در اختلالات طیف اتیسم

مهدیه شجاعی [۱]، راضیه سرآبادانی [۲*]
۱. کارشناس‌ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
۲. استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۴)

Effect of *Brassica oleracea* Extract on TNFα and IL-6 as Two Factors of Immune System in Relation to Autism Spectrum Disorder

Mahdieh Shojaee[1], Razieh Sarabadani[2*]
1. M.Sc., Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran.
(Received: May 11, 2021 - Accepted: Dec. 5, 2021)

چکیده

اختلالات سیستم ایمنی یکی از دلایل ابتلای افراد به بیماری اتیسم است. *TNFα* و *IL-6* از نشانگرهای مهم بیماری اتیسم می‌باشند. افزایش بیش از اندازه این سایتوکاین‌ها در مغز و خون بیماران اتیسمی علاوه بر اختلالات سیستم ایمنی، زمینه‌ساز بسیاری از ناهنجاری‌های رفتاری شایع در مبتلایان به این بیماری می‌باشد. در این پژوهش، سل‌لاین عصبی *1321N1* و سل‌لاین *HFF* به‌عنوان سلول‌های نرمال تحت القای سیستم ایمنی قرار گرفتند تا فاکتورهای ایمنی در بالاترین سطح از فعالیت خود قرار گیرد، سپس سلول‌ها با سه غلظت ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره کلم‌بروکلی تیمار شدند و در سه بازه زمانی ۱، ۲ و ۳ روزه توسط تست الایزا مورد آنالیز قرار گرفتند و اثر سولفورافان موجود در عصاره کلم‌بروکلی بر روی دو فاکتور *TNFα* و *IL-6* بررسی شد. نتایج مقایسه نمونه بدون تیمار با عصاره کلم‌بروکلی و نمونه تیمار شده با ۲ میلی‌گرم از عصاره کلم‌بروکلی به‌مدت ۳ روز، نشان داد که دو فاکتور *TNFα* و *IL-6* تحت‌تاثیر عصاره کلم‌بروکلی کاهش یافت. همچنین مشاهده شد که غلظت بالاتر عصاره و زمان بیشتر تیمار دهی اثر بخشی بیشتری در کاهش دو فاکتور مذکور داشت. به‌طور کلی نتایج آزمایش حاضر تاثیر عصاره کلم‌بروکلی بر کاهش التهاب سیستم ایمنی که به‌واسطه این دو فاکتور ایجاد شدند، را پیشنهاد می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: عصاره کلم‌بروکلی، سیستم ایمنی، *IL-6*، *TNFα*.

Abstract

Immune system disorders have been recognized as a cause of the autism spectrum disorder (ASD). TNFα and IL-6 are significant markers of the ASD. Increased levels of these cytokines in the brain and blood of the ASD-engaged patients not only affect the immune system disorders but also contribute to many common behavioral abnormalities exhibited by such patients. In this research, we investigated the effect of the broccoli extract and its sulforaphane content on two immune system factors, namely TNFα and IL-6. For this purpose, with its effectiveness confirmed via gas chromatography – mass spectroscopy (GC-MS) and MTT assay, the broccoli extract was subjected to immune system induction to maximize the activity of the immune system factors. The cells were treated with the broccoli extract at three different dosages, namely 1, 1.5 and 2 mg of the cell per milliliter of the broccoli extract, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were performed for three treatment times, namely 1, 2, and 3 days. A comparison between the stimulated immune system cells without treatment against those treated with the 2 mg of broccoli extract for 3 days clearly demonstrated the effectiveness of the broccoli extract for attenuating the activity of the TNFα and IL-6 factors. It was also observed that higher concentrations of the extract and longer treatment time were more effective in reducing these two factors. In general, the results of the present experiment suggest the effect of broccoli extract on reducing the inflammation of the immune system caused by these two factors.

Keywords: broccoli extract, immune system, *IL-6*, *TNFα*.

* نویسنده مسئول: راضیه سرآبادانی
E-mail: r.sarabadani@gmail.com

مقدمه

به‌دلیل افزایش پیش‌رونده‌ی شیوع اتیسم، دانستن مکانیسم‌های دخیل در آن به‌منظور دست‌یابی به درمان بهتر کودکان اوتیستیک بسیار مهم است. اختلالات طیف اتیسم[1] (*ASD*) دارای اساس نوروبیولوژیک[2] بسیار پیچیده‌ای است که به‌طور کامل مورد بررسی واقع نشده است (Ghaffari *et al*., 2016). تعدادی از فاکتورهای عفونی، ایمنی، محیطی، ژنتیکی و آلرژیک آغاز تولد ممکن است موجب افزایش خطر ابتلا به *ASD* شوند (Theoharides *et al*., 2016). نقش سیستم ایمنی در ایجاد و گسترش این بیماری به حدی است که اختلالات سیستم ایمنی یکی از مهم‌ترین دلایل ایجاد و گسترش این بیماری پیش از تولد و حتی در دوران جنینی می‌باشد.

هر جاندار در مواجهه با عوامل بیماری‌زا از خود دفاع می‌کند. دو نوع اصلی دفاع شامل ایمنی ذاتی و ایمنی اکتسابی می‌باشد. ایمنی ذاتی از ابتدای تولد حضور داشته و دفاع گسترده‌ای را در برابر عفونت‌ها فراهم می‌کند، در مقابل ایمنی اکتسابی، فقط در برخورد با عوامل تحریک کننده از قبیل میکروب‌ها و سلول‌های غیرعادی بدن، توکسین‌ها و سایر عوامل بیگانه ایجاد می‌شود. لیزوزوم[3]، سلول‌های فاگوسیتوزکننده[4]، لنفوسیت‌ها[5]، سایتوکاین‌ها[6]، ماکروفاژها[7]، پروتئین‌های ضد میکروبی[8]، اینترفرون‌ها[9]، سلول‌های کشنده طبیعی (*nk*)[10]، سلول‌های *B* و انواع سلول‌های *T* تنها بخش‌هایی از این سیستم عظیم و کارآمد در بدن موجودات زنده می‌باشند (Urry *et al*., 2011).

تاثیر متقابل و بشدت تنظیم شده لنفوسیت‌ها با مواد بیگانه، با یکدیگر و با سایر سلول‌های بدن، ایمنی فوق‌العاده‌ای را در برابر بسیاری از عوامل بیماری‌زا فراهم می‌آورد. اگر این تعادل دقیق، از طریق عملکرد نادرست سیستم ایمنی مختل شود، اثرات آن می‌تواند خود را به‌صورت یک آلرژی ساده[11] تا عواقب جدی و حتی کشنده مانند بیماری‌های خود ایمنی[12] و التهاب‌های مزمن نشان دهد (Urry *et al*., 2011).

در مواجهه سلول با هر گونه عامل خارجی، سایتوکاین‌ها به‌منظور تحریک پاسخ ایمنی آزاد می‌شوند. سایتوکاین‌ها از جمله پروتئین‌های تولید شده توسط انواع سلول‌های ایمنی می‌باشند که واکنش‌های التهابی و ایمنی را تحریک و تنظیم می‌نمایند. با توجه به اثرات بیولوژیک ویژه هر سایتوکاین، کمبود یا بیش‌بود هر کدام از آن‌ها منجر به بیماری و اختلال در سیستم ایمنی فرد می‌شود. سایتوکاین‌ها در پزشکی بالینی به‌عنوان ابزار درمانی یا به‌عنوان هدف آنتاگونیست‌های خاص، در انواع بیماری‌های ایمنی و التهابی، اهمیت دارند. انواع مختلف سایتوکاین شامل کموکین‌ها، فاکتورهای محرک، اینترفرون‌ها، اینترلوکین‌ها و فاکتورهای نکروز تومور می‌باشد (Abbas *et al*., 2014). در مطالعات اخیر ارتباط موثری بین سایتوکاین و اختلالات طیف اتیسم گزارش شده است به‌طوری‌که یافته‌های به‌دست آمده افزایش معنی‌دار انواع سایتوکاین‌های *TNF-a*، *IFN-g*[13]، *IL-1b*[14] و *IL-12*[15] در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون، سرم و پلاسما در افراد مبتلا به اتیسم را نشان می‌دهد (Ashwood *et al*., 2006). مطابق با این یافته‌ها، مطالعات اکس لی و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از چندین آزمایش

1. *Autism spectrum disorder*
2. Neurobiology
3. *Lysosome*
4. *Phagocytosis*
5. Lymphocytus
6. Cytokine
7. Macrophage
8. Antimicrobial peptide
9. Interferon
10. Natural killer cell
11. Allergy
12. Autoimmune disease
13. Interferon Gamma
14. Interleukin 1 beta (IL-1β)
15. Interleukin 12 (IL-12)

ایمونولوژیک نشان داد که *IL-6*، *TNFa*، *IL-8*[1]، *GM-CSF*[2] و *IFNg* به‌طور قابل توجهی در مغز افراد مبتلا به اتیسم در مقایسه با افراد سالم، افزایش یافته است (Li *et al*., 2009). همه این یافته‌ها نشان می‌دهد که سیستم ایمنی بدن و سایتوکاین‌ها نقش مهمی را در پاتوژنز[3] اتیسم ایفا می‌کنند. با این حال، مکانیسم‌های مؤثر اختلال عملکرد سیستم ایمنی و تغییرات سایتوکاین بر روی پاتوژنز اتیسم هنوز ناشناخته مانده است.

یک پاسخ قوی ایمنی که منجر به ترشح شدید انواع سایتوکاین‌ها می‌شود، می‌تواند به بیماری‌های التهابی منتهی شود (Blanco *et al*., 2008). اینترلوکین‌ها گروهی از سایتوکاین‌ها هستند که نقشی کلیدی در تولید پاسخ التهابی ایفا می‌کنند. تعداد آن‌ها بسیار زیاد است و با شماره از ۱ تا ۳۶ مشخص می‌شوند. برخی از سایتوکاین‌ها می‌توانند به‌عنوان پیش التهابی و ضد التهابی نیز طبقه‌بندی شوند. سایتوکاین‌های پیش التهابی (اینترلوکین ۱، اینترلوکین ۶، فاکتور نکروز تومر آلفا و...)، التهاب را در واکنش به آسیب به بافت القا می‌کنند، در حالی که سایتوکاین‌های ضد التهابی (اینترلوکین ۴، اینترلوکین ۱۰ و اینترلوکین ۱۳) دقیقاً عملی مخالف عمل سایتوکاین‌های پیش التهابی دارند و هدف آن‌ها پایین آوردن واکنش التهابی می‌باشد. برای نمونه به‌منظور کاهش التهاب مزمن برآمده از آرتریت روماتوئید، سایتوکاین‌های ضد التهابی در بدن منتشر می‌شوند (Punt *et al*., 2018). التهاب مغز در پاتوژنز اتیسم (*ASD*) دخیل است (Theoharides *et al*., 2016). مطالعات نشان داده‌اند که چندین اختلال در فاکتورهای التهابی و ایمنی–التهابی در *ASD* وجود دارد (Croonenberghs *et al*., 2002). تعدادی از مولکول‌های التهابی در مغز و مایع مغزی‌نخاعی در بیماران *ASD* افزایش می‌یابند که شامل *IL-1β*، *IL-6*، *TNF*، *MCP-1* و *CCL8 (IL-8)* می‌باشند. که افزایش سطح پلاسمایی *IL-8*، *IL-6* و *IL1β* با رفتارهای نابجا و نواقص اجتماعی در کودکان اوتیستیک همراه است (Theoharides *et al*., 2016).

فاکتور نکروز تومور آلفا (*TNFα*) یک پروتئین سیگنالینگ سلولی است که در التهاب سیستمیک دخیل است و یکی از سایتوکاین‌هایی است که واکنش فاز حاد را ایجاد می‌کند. *TNF-α* اگرچه می‌تواند توسط بسیاری از انواع سلول‌های دیگر مانند لنفوسیت‌های *CD4+*، سلول‌های *NK*، نوتروفیل‌ها[4]، ائوزینوفیل‌ها[5] و نورون‌ها تولید شود، اما به‌طور عمده از ماکروفاژهای فعال آزاد می‌شود و تولید بیش از اندازه آن در ایجاد سرطان و سایر بیماری‌های التهابی مؤثر است (Gahring *et al*., 1996). افزایش بیان *TNF-α* و در نتیجه سطح بالای آن در مغز و سرم خون در انواع بیماری‌های التهابی و در بیماران مبتلا به اتیسم دیده می‌شود (Chez *et al*., 2007; Jyonouchi *et al*., 2000).

یکی دیگر از انواع سایتوکاین‌ها تحت عنوان اینترلوکین ۶ (*IL-6*) به‌عنوان فاکتور تحریک کننده سلول‌های *B* و به‌عنوان یک عامل اصلی پاسخ ایمنی و التهابی مطرح می‌باشد (Rose-John *et al*., 2006; Tanaka *et al*., 2014). امروزه مشخص شده است که IL-6 دارای وظایف مهمی در سیستم ایمنی بدن می‌باشد. برای نمونه در سیستم عصبی مرکزی و محیطی، اینترلوکین۶ می‌تواند به‌عنوان فاکتور رشد عصبی عمل کند

1. Interleukin 8 (IL-8)
2. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)
3. Pathogenesis
4. Neutrophil
5. Eosinophils

به‌طوری‌که در مایع مغز و نخاعی، پلاسما و لنفوسیت‌های بیماران مبتلا به اتیسم افزایش می‌یابد (Malik *et al*., 2011; Emanuele *et al*., 2010; Wei- Hongen, *et al*., 2011).

از آنجایی‌که بعد از گذشت سالیان زیاد از ورود داروهای شیمیایی به سیستم درمان و برجای گذاشتن اثرات و عوارض جانبی بر بیماران، در سال‌های اخیر تمایل به مصرف گیاهان دارویی افزایش پیدا کرده است. یکی از گیاهانی که در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه محققان و دانشمندان در حوزه درمان اختلالات سیستم ایمنی و اتیسم قرار گرفته است، کلم‌بروکلی است (Singh *et al*., 2014).

کلم‌بروکلی گیاهی دارویی با نام علمی *Brassica oleracea*، از خانواده براسیکاسه بوده و در بهبود بیماری‌هایی همچون سرطان، آرتریت، دیابت، بیماری‌های کلیوی، التهاب سیستم ایمنی و غیره مؤثر است (Palak *et al*., 2016). اثرات درمانی کلم‌بروکلی عمدتاً با محتوای بالای ترکیبات زیست فعال آن مانند فنول‌ها[1]، گلوکوزینولات‌ها، ایزوتیوسیانات‌ها و اسید اسکوربیک[2] همراه است (Jacobo *et al*., 2009). سولفورافان موجود در کلم‌بروکلی، به‌عنوان شاخص‌ترین ایزوتیوسیونات یک فیتوکمیکال[3] است که محصول هیدرولیز گلوکوزیلات توسط آنزیم میروسیناز[4] است (Higdon *et al*., 2007; Zhang *et al*., 1992; Zhang *et al*., 1994; Fimognari *et al*., 2008). بر پایه نظر رادلف و همکاران در بسیاری از مطالعات مشخص شد که سولفورافان می‌تواند بروز برخی از تومورها را کاهش دهد (Rudolf *et al*., 2009) و همچنین عامل پیشگیری از سرطان است (Sharma *et al*., 2010). کلم‌بروکلی به‌صورت خام یا پخته مصرف می‌شود و بیشترین تاثیر در زمانی رخ می‌دهد که به‌صورت خام مصرف شود زیرا پخت و پز آنزیم میروسیناز را تخریب می‌کند و نهایتاً ماده مؤثر کلم‌بروکلی از بین می‌رود (Ciska *et al*., 2001; Verkerk *et al*., 2009; Fowke *et al*., 2003; Wang *et al*., 2004). در سال ۲۰۱۷، لینچ و همکاران در دانشگاه جان هاپکینز پس از سال‌ها تحقیق در زمینه سولفورافان موجود در عصاره کلم‌بروکلی و تجویز آن به‌صورت روزانه به افراد مبتلا به بیماری اتیسم، بیان داشتند که سولفورافان باعث ۴۶٪ پیشرفت در تعاملات اجتماعی، ۴۲٪ پیشرفت در ارتباطات کلامی و ۵۴٪ کاهش قابل توجه در رفتارهای غیرطبیعی در این گروه از بیماران شد (Lynch *et al*., 2017). به نظر می‌رسد سولفورافان از طریق مهار فاکتور نکروز تومر آلفا (*TNF-α*)، منجر به کنترل التهاب سیستم ایمنی شده و در درمان اختلالات رفتاری ناشی از این گونه التهابات در افراد اوتیسم مؤثر است (Yadav *et al*., 2010). با در نظر گرفتن خواص سولفورافان بر بهبود بیماری‌ها، در تحقیق حاضر تاثیر این ماده بر میزان تغییرات دو فاکتور *TNFα* و *IL-6* که هم در سیستم ایمنی و التهاب مؤثر هستند و هم به‌عنوان مارکرهای اصلی اتیسم شناخته شده‌اند، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بذرهای هیبرید سنتارو گیاه کلم‌بروکلی (*Brassica oleracea*) از شرکت تاکی‌سید[5] ژاپن تهیه شد. سل‌لاین‌های مورد بررسی در این پژوهش از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. رده سلولی *1321N1 Cell line* به‌عنوان سل‌لاین عصبی، همچنین *HFF* از سلول فیبروبلاست پوستی انسانی به‌عنوان سلول نرمال استفاده شد.

1. Phenol
2. Ascorbic acid
3. Phytochemical
4. Myrosinase
5. TAKII SEED

روش ضدعفونی کردن و عصاره‌گیری از جوانه کلم‌بروکلی

بذرها با روش Fahey و همکاران (۱۹۹۷) ضدعفونی و کشت شد. جوانه‌های هفت‌روزه کلم‌بروکلی مستقیماً به دستگاه فریزدرایر منتقل و خشک شدند. میزان ۲ گرم از جوانه بروکلی فریزدرای‌شده با ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر به‌مدت یک ساعت و ۳۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفت سپس *pH* محلول با کمک اسیدکلریدریک به حدود ۲ رسید تا از تخریب سولفورافان جلوگیری شود. عصاره‌گیری در پژوهشکده مواد و انرژی کرج انجام شد.

آزمایش *GC-MS*

دستگاه *GC 6890N Agilent* و *Mass 5973 Agilent* با ستون *RTX-5 Sil MS* معادل *HP-5 MS* به طول ۳۰ مترو قطر mm۰/۲۵ و ضخامت µm۰/۲۵ تزریق شد. شرایط تزریق *MS 50→550*، *inlet:250* درجه و *Solv: 3* درجه و *Split: 50* و حجم تزریق ۱ میکرولیتر بود (Tsoi *et al*., 1998).

آزمایش *MTT*

هدف از انجام این آزمایش در بررسی تاثیر تیمارهای این مطالعه بر روی سل‌لاین مورد نظر در طول تحقیق می‌باشد، بدین منظور غشای سلولی توسط یک حلال مناسب از جمله ایزوپروپانول یا دی متیل سولفواکساید تخریب و فورمازون حل شد، سپس توسط دستگاه الایزاریدر میزان جذب نوری فورمازون در طول موج ۵۷۸ خوانده شد (Sammani *et al*., 2014). کلیه مراحل کار زیر هود (دمای ۳۷درجه، رطوبت ۹۰٪ و میزان ۵٪ CO_2) انجام و سلول‌ها داخل فلاسک با محیط کشت ۱۰٪، *DMSO* و *FBS* رشد داده شد. میزان ۱۰ تا ۲۰ هزار سلول (*HFF* و 1321N) در هر چاهک ریخته و پس از ۸ ساعت انکوبه، محلول رویی جدا شده و محیط کشت جدید حاوی ۵٪ سرم و غلظت‌های مختلف از عصاره کلم‌بروکلی (در بازه ۰/۲۵ میلی‌گرم تا ۳ میلی‌گرم) به چاهک‌های مربوطه اضافه گردید و به‌مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در داخل انکوباتور قرار داده شد و مجدداً پس از مدت ۸ ساعت و تخلیه محلول روی سلول‌ها به داخل هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول *MTT* (شرکت سیگما) آماده‌شده با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و به‌مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد و محلول رویی تخلیه و نهایتاً به هر چاهک ۱۵۰ میکرولیتر *DMSO* افزوده شد. پس از آن به‌مدت ۲۰ دقیقه داخل انکوباتور شیکردار با دمای ۷۳ درجه قرار داده شد، سپس میزان جذب، توسط دستگاه الایزاریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. این آزمایش برای هر رده سلولی به‌طور جداگانه و با سه بار تکرار انجام گرفت. میزان زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (رابطه ۱). در ادامه، میزان *IC50* با نرم‌افزار گراف‌پد ترسیم محاسبه شد.

رابطه ۱) درصد زنده‌مانی سلول =

$$\frac{\text{میزان جذب سلول‌های تیمارشده}}{\text{میزان جذب سلول‌های کنترل}} \times ۱۰۰$$

بررسی *TNFα , IL-6* به‌وسیله تست الایزا

در این پژوهش برای تایید اثر سولفورافان بر روی فاکتورهای سیستم ایمنی در شرایط آزمایشگاهی، سلول *1321N1* در پلیت‌های ۶ خانه کشت داده شد. پس از چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت در تعدادی از نمونه‌ها، سلول‌ها تحت القای سیستم ایمنی قرار گرفتند تا فاکتورهای ایمنی در بالاترین سطح از فعالیت خود قرار بگیرند و اثر کاهنده سولفورافان در دو فاکتور *TNFα* و *IL-6* بررسی شود. برای تحریک سیستم ایمنی، سلول‌ها به‌مدت ۱۴ ساعت با غلظت ۷۵ نانوگرم از

PMA (شرکت سیگما) و ۱ میلی‌گرم ایونومایسین[1] تیمار شدند (Guvenel and Aleks, 2015). پس از این بازه زمانی محیط روی سلول‌ها طبق پروتکل کیت الایزا گردآوری شد. در ادامه سلول‌ها با سه غلظت ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم از عصاره کلم‌بروکلی به‌مدت ۳ روز تیمار شدند، که در بازه‌های زمانی ۱ تا ۳ روزه محیط روی سلول‌ها برای بررسی تغییرات دو فاکتور *TNFα* و *IL-6* نسبت به نمونه‌های کنترل (بدون هیچ تیمار) و نمونه سلول تحریک‌شده سیستم ایمنی بدون تیمار با عصاره کلم‌بروکلی گردآوری شد. تست الایزا با کیت bioassay technology laboratory elisa kit، *TNFα* و *IL-6* انجام شد، برای انجام تست الایزا جهت بررسی *TNFα* و *IL-6*، طبق پروتکل‌های موجود در کیت عمل شد. بدین منظور، نمونه‌ها به‌صورت زیر در نظر گرفته شدند.

۱. نمونه کنترل (بدون تیمار)

۲. نمونه تیمارشده با غلظت ۵۰ و ۷۵ نانوگرم از PMA و ۱میلی‌گرم ایونومایسین به‌مدت ۸ و ۱۴ ساعت

۳. سه نمونه تیمارشده با غلظت‌های ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم از عصاره کلم‌بروکلی در سه بازه زمانی ۱، ۲ و ۳ روزه بعد از القای سیستم ایمنی سلول

۴. نمونه‌ای از سلول‌های تحریک‌شده سیستم ایمنی بدون تیمار با عصاره به‌مدت ۳ روز

۵. نمونه‌ای که تنها با ۲ میلی‌گرم از عصاره به‌مدت زمان ۳ روز تیمار شد.

برای بررسی آماری سطح تغییرات دو فاکتور *TNFα* و *IL-6* در تست‌های موردنظر در این پژوهش، در مرحله اول با توجه به دستورالعمل و حساسیت‌های کیت، نمودار استاندارد *IL-6* و *TNFα* رسم شد. در ادامه با توجه به نمودارهای استاندارد مقدار سطح تغییرات فاکتور *IL-6* و *TNFα* در نمونه‌ها محاسبه شد. آنالیز داده‌ها بر پایه دو آزمون یک‌طرفه (ANOVA) و تی تست در دو سطح معنی‌داری ۵ و ۱ درصد انجام شد. برای این منظور و رسم نمودارها از نرم‌افزار گراف‌پد استفاده شد، همچنین مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج عصاره‌گیری از جوانه فریز درای شده

دو گرم جوانه کلم‌بروکلی فریز درای شده پس از عصاره‌گیری به دستگاه تزریق شد. نتایج در شکل ۱ و جدول ۱ قرارداده شد.

در این روش مولکول‌های سولفورافان، نیتریل سولفورافان، ۱-بوتن ۴- ایزوتیوسیانات و ۱- آن هیدروکسی ۵-پنتان ایمیدات به‌دست آمد. دو مولکول آخر، مولکول‌های تخریب‌شده سولفورافان هستند که در اثر حرارت موجود در دستگاه شکسته شده‌اند و این تاکیدی بر وجود سولفورافان در نمونه مورد آزمایش بود.

بررسی نتایج آزمایش *MTT*

نتایج آزمایش سمیت‌سنجی بر روی سل لاین عصبی *1321N1* و سلول نرمال استخراج‌شده از پوست جنین *HFF* نشان داد (شکل‌های ۲ و ۳) که استفاده از عصاره کلم‌بروکلی در غلظت‌های مورد استفاده در بازه زمانی ۱ الی ۳ روزه سمیت معنی‌داری بر روی سلول‌ها ندارد، به طوری‌که تا غلظت‌های ۲ میلی‌گرم درصد زنده مانی سلول‌ها تقریباً بالای ۹۰٪ می‌باشد. همسو با نتایج پژوهش حاضر، Scott و همکاران (۲۰۱۲) نیز در مقاله خود به‌طور مفصل با گردآوری بیش از ۱۲۰۰ مقاله از ۴ پایگاه داده به بی‌خطر بودن مصرف کلم‌بروکلی اشاره کردند. بر این اساس، با اطمینان بیشتری می‌توان بر استفاده از عصاره کلم‌بروکلی به‌عنوان مکمل غذایی جهت کاهش التهاب سیستم ایمنی، تأکید کرد. همچنین با توجه به اینکه غلظت‌هایی که در این آزمایش و با توجه به شرایط آزمایش‌های *in vitro* استفاده شد هیچ‌کدام باعث از بین‌رفتن نیمی از سلول‌های نمونه نشد در

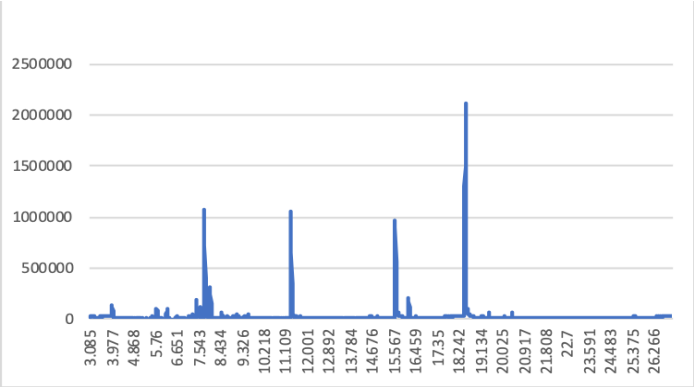
1. Ionomycin

نتیجه با نرم‌افزار گراف‌پد نتایج تقریبی مقدار *IC50* محاسبه شد.

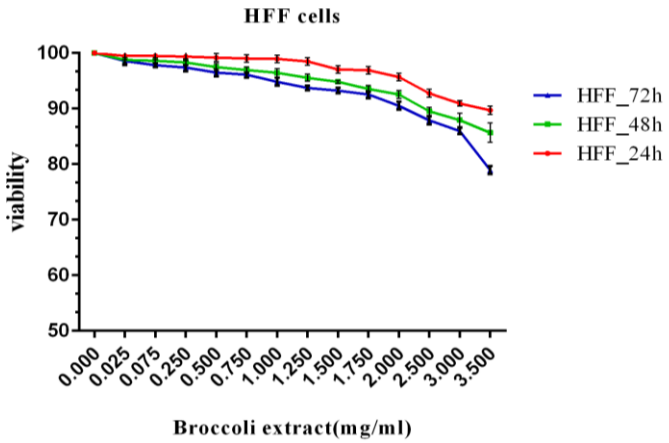
در ادامه پژوهش برای بررسی اثر تیمار عصاره با توجه به نمودارهای *MTT* که در غلظت‌های ۲ میلی‌گرم تقریباً یک جهش در حرکت نمودار در اثر زنده‌مانی سلول گذاشته و همچنین نمودارهای *IC50*، برای ادامه پژوهش سه غلظت ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم انتخاب شد.

جدول ۱. نتایج آنالیز *GC-MS* جوانه فریزدرایو شده. بر اساس کتابخانه MS دستگاه مورد استفاده وجود سولفورافان و سولفورافان نیتریل و دو مولکول تخریب شده سولفورافان در نتایج دیده می‌شود.

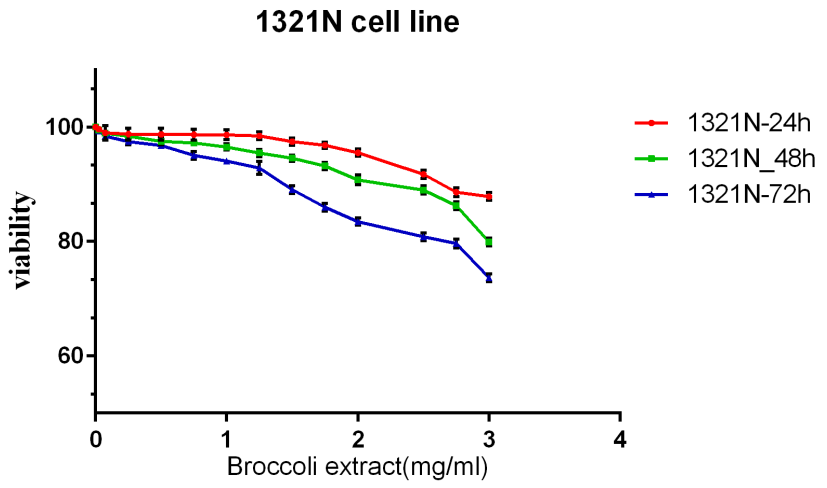
PK شماره قله	RT زمان ایجاد قله	Area Pct منطقه قله	Library/ID کتابخانه جی سی مس	Ref منبع	شماره CAS	Qual کیفیت
1	4.00512	0.997712	1,3,5-Triazine	1105	000290-87-9	72
2	5.8283	1.39892	p-Xylene	5030	000106-42-3	95
3	6.2398	1.17455	Benzene, 1,3-dimethyl-	5055	000108-38-3	95
4	7.45717	1.86073	Benzene, 1-ethyl-3-methyl-	9315	000620-14-4	94
5	7.51432	1.58777	Benzene, 1-ethyl-2-methyl-	9314	000611-14-3	86
6	7.63433	2.17435	Dimethyl trisulfide	10826	003658-80-8	83
7	7.80008	13.1286	1-Butene, 4-isothiocyanato-	6852	003386-97-8	78
8	8.04013	3.26553	Benzene, 1,2,3-trimethyl-*	9310	000526-73-8	97
9	8.5145	0.753283	Benzene, 1,2,3-trimethyl-	9310	000526-73-8	95
10	11.3664	13.5846	.beta.-D-Glucopyranose, 1-thio-,1-[N-hydroxy-5-(methylthio) pentanimidate]*	165800	077171-29-0	12
11	15.6415	17.003	Sulforaphane nitrile*	21059	061121-66-2	90
12	16.1959	2.45421	4-Methyl-2,5-dimethoxybenzaldehyde	44103	004925-88-6	59
13	18.522	40.6168	Sulforaphane*	42398	004478-93-7	53



شکل ۱. نمودار پیک‌های موجود در آنالیز *GC MS* جوانه فریز درایو شده. ۴ پیک شارپ ایجاد شده نشان دهنده سولفورافان (در زمان ۱۸/۲۴۲ دقیقه) و شکست‌های مولکول سولفورافان در اثر حرارت دستگاه است.



شکل ۲. نمودار تیمار لاین سلولی با عصاره کلم‌بروکلی. در این نمودار تیمار سل لاین *HFF* با عصاره کلم‌بروکلی، محور عمودی درصد زنده بودن سلول‌ها و محور افقی میزان عصاره مورد استفاده در تیمارها.

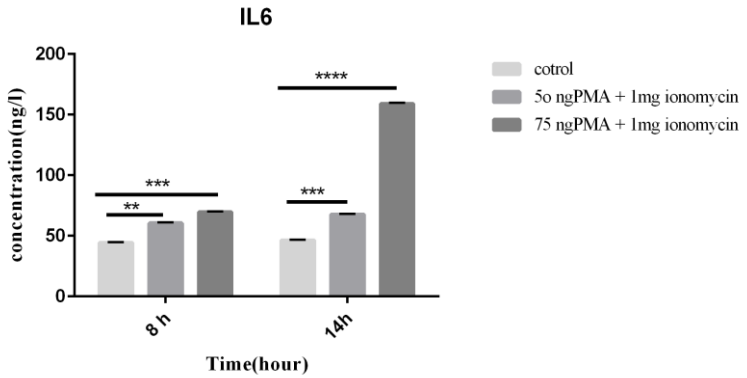


شکل ۳. نمودار تیمار لاین سلولی 1321N با عصاره کلم‌بروکلی. محور عمودی درصد زنده بودن سلول‌ها و محور افقی میزان عصاره مورد استفاده

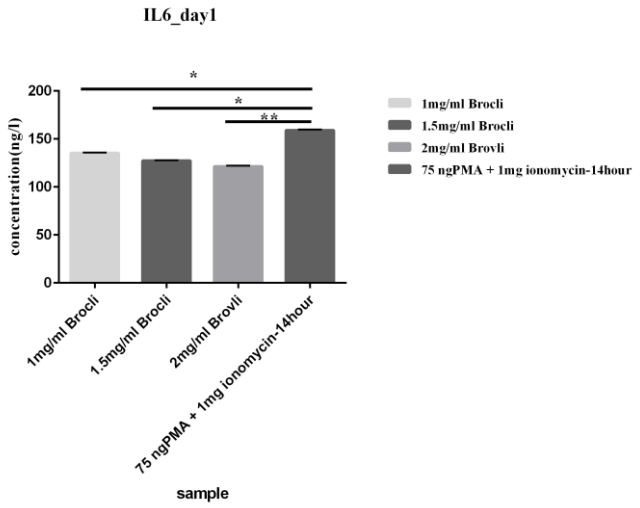
سنجش میزان تغییرات *IL-6*

مرحله اول طبق دستورالعمل کیت، نمودار استاندارد این نمونه رسم شد. در مرحله بعد برای تحریک سیستم ایمنی و به جهت به‌دست آوردن غلظت مناسبی از مواد تحریک‌کننده سیستم ایمنی (*PMA* و ایونومایسین) و انتخاب بهترین غلظت از *PMA* و ایونومایسین که بتواند سیستم ایمنی را در بالاترین سطح از فعالیت قرار دهد، تست‌های بعدی انجام شد. از غلظت ۵۰ نانوگرم *PMA* و ۱ میلی‌گرم ایونومایسین و غلظت ۷۵ نانوگرم *PMA* و ۱ میلی‌گرم ایونومایسین در بازه زمانی ۸ و ۱۴ ساعت استفاده شد. بررسی نتایج مربوط به تغییرات *IL-6* با توجه به نمودار نشان داده شده در شکل شماره ۴ بیان می‌دارد، زمانی که در بازه زمانی ۱۴ ساعت از غلظت ۷۵ نانوگرم *PMA* و ۱ میلی‌گرم ایونومایسین استفاده می‌شود، نسبت به نمودارهای همتای آن در بازه زمانی ۸ ساعت با استفاده از غلظت ۵۰ نانوگرم *PMA* و ۱ میلی‌گرم ایونومایسین به‌طور معنی‌داری و در سطح $P<0001$، باعث افزایش سطح *IL-6* می‌شود. بر این اساس برای اطمینان کامل از تحریک سیستم ایمنی، در ادامه اثر عصاره کلم‌بروکلی بر روی تیمار با غلظت ۷۵ نانوگرم از *PMA* و ۱ میلی‌گرم ایونومایسین در بازه زمانی ۱۴ ساعت بررسی شد.

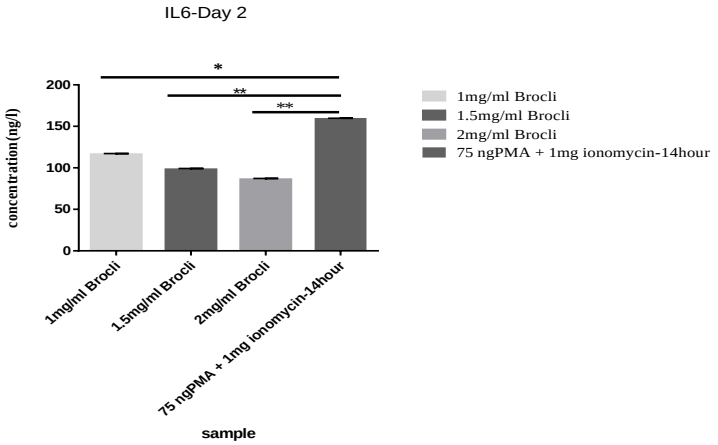
بعد از تعیین کردن مقدار لازم از تیمار *PMA* و ایونومایسین برای تحریک سیستم ایمنی سلول، در مرحله بعدی اثر عصاره کلم‌بروکلی حاوی سولفورافان در سه غلظت ۲، ۱/۵ و ۱ میلی‌گرم با توجه به نتایج آزمایش سمیت، در سه بازه زمانی ۱ تا ۳ روزه، بر روی نمونه‌های تحریک شده سیستم ایمنی برای اندازه گیری و بررسی تغییرات میزان بیان *TNFα* و *IL-6* بررسی شد. نتایج تغییرات سطح *IL-6* در بازه زمانی یک روزه (شکل ۵) در سطح آماری ۵٪ نشان داد که سولفورافان موجود در عصاره کلم‌بروکلی بر روی سطح *IL-6* در طول ۲۴ ساعت تاثیر می‌گذارد. مقایسه بین نمونه کنترل (نمونه‌ای که سیستم ایمنی آن تحریک شد) با نمونه‌های تیمار شده با عصاره در غلظت ۲ میلی‌گرم، کاهش سطح *IL-6* در سطح معنی داری $P<01$ در بازه زمانی یک روز را نشان داد. بررسی نتایج در بازه زمانی ۲ روز نشان داد که هرچه زمان بیشتری سلول‌ها در معرض عصاره کلم‌بروکلی قرار گیرند سطح *IL-6* کاهش بیشتری پیدا می‌کند (شکل ۶).



شکل ۴. نمودار ستونی سطح تغییرات *IL-6* در نمونه تیمار شده برای بررسی تغییرات سطح ایمنی در دو بازه زمانی ۸ و ۱۴ ساعت. نمونه کنترل، نمونه تحریک شده با ۵۰ میلی‌گرم از *PMA* و نمونه تحریک شده با ۷۵ نانوگرم *PMA* (* $p < 05$, ** $P < 01$, *** $p < 001$, ****$P < 0001$).



شکل ۵. مقایسه اثر تیمار با سه غلظت (۱ میلی‌گرم، ۱/۵ میلی‌گرم، ۲ میلی‌گرم) از عصاره بروکلی در مدت زمان یک روز و نمونه کنترل بر روی *IL-6* (* $p < 05$, ** $P < 01$).

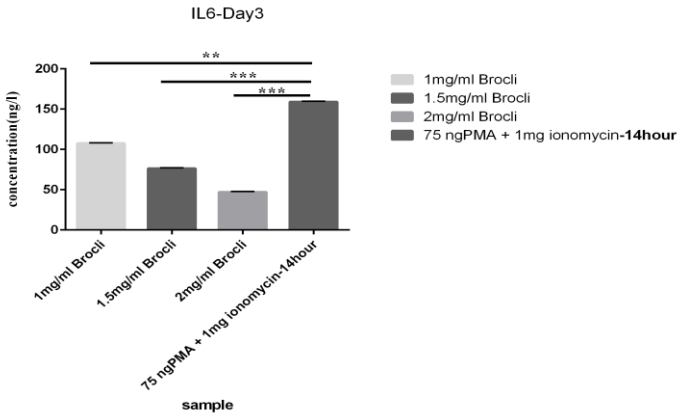


شکل ۶. مقایسه اثر تیمار با سه غلظت (۱ میلی‌گرم، ۱/۵ میلی‌گرم، ۲ میلی‌گرم) از عصاره بروکلی در مدت زمان دو روز، و نمونه کنترل بر روی *IL-6* (* $p < 05$, ** $P < 01$).

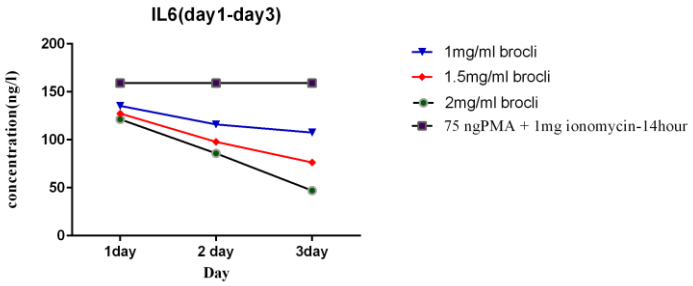
به‌طور کلی اثر غلظت ۲ میلی‌گرم از عصاره کلم‌بروکلی در کاهش *IL-6* بیشتر از دو غلظت دیگر بود. اگرچه هر سه غلظت عصاره بروکلی در مقایسه با نمونه کنترل تاثیر معنی‌داری را بر کاهش *IL-6* نشان داد، ولی سطح معنی‌داری نمونه تیمارشده با ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم از عصاره از لحاظ آماری بالاتر بود (P<۰/۰۱) (شکل ۶).

نتایج در بازه زمانی ۳ روزه نشان داد که عصاره کلم‌بروکلی تاثیر کاملاً معنی‌داری را بر کاهش *IL-6* در نمونه دارای بالاترین سطح تحریک سیستم ایمنی گذاشته است به‌طوری‌که میزان کاهش در میزان فاکتور مذکور نسبت به دو روز گذشته به‌طور معنی‌داری بیشتر است. همچنین روند تاثیر معنی‌داری غلظت‌های مختلف بر روی تغییرات *IL-6* نمایان بود و بیشترین سطح معنی‌داری در کاهش فاکتور مذکور در مقایسه با نمونه کنترل مربوط به نمونه‌های تیمارشده با ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم عصاره بروکلی بود (P <001) (شکل ۷).

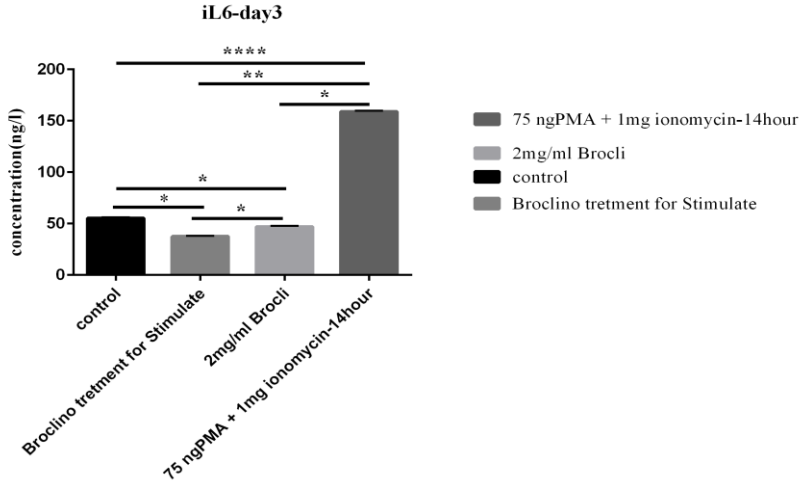
به‌طور کلی بررسی اثر عصاره کلم‌بروکلی، کاهش سطح *IL-6* در نمونه تحریک شده سیستم ایمنی در بازه زمانی سه روز در سه غلظت را نشان داد. در بازه زمانی سه روزه استفاده از غلظت ۲ میلی‌گرم اگرچه تاثیر بیشتری بر کاهش سطح *IL-6* داشت اما با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نشان نداد. در شکل ۸، روند تاثیر عصاره کلم‌بروکلی بر سطح تغییرات *IL-6* در سه بازه زمانی نشان داده شده است. همچنین، در این پژوهش برای بررسی اثر عصاره کلم‌بروکلی بر نمونه سلولی که با سیستم ایمنی تحریک نشده بود، سلول در بازه زمانی سه روزه در معرض غلظت ۲ میلی‌گرم از عصاره قرار گرفت، پس از مقایسه بین نتایج نشان داده شد که عصاره بروکلی باعث کاهش معنی دار سطح *IL-6* در مقایسه با نمونه کنترل سلولی (نمونه‌ای از سلول بدون هیچ تیمار) شد (شکل ۹).



شکل ۷. مقایسه اثر تیمار با سه غلظت (۱ میلی‌گرم، ۱/۵ میلی‌گرم، ۲ میلی‌گرم) از عصاره بروکلی در مدت زمان سه روز و نمونه کنترل بر روی *IL-6*, *** p <001, ** P <01).



شکل ۸. میزان سطح تغییرات *IL-6* در سه بازه زمانی با سه غلظت مختلف از عصاره بروکلی (۱ میلی‌گرم، ۱/۵ میلی‌گرم، ۲ میلی‌گرم) و نمونه کنترل.



شکل ۹. میزان سطح تغییرات *IL-6* در مقایسه بین نمونه تیمار شده با عصاره کلم‌بروکلی با نمونه‌های دیگر. نمونه کنترل بدون هیچ تیمار یا تحریک، نمونه تیمار کنترل با عصاره به‌مدت سه روز، نمونه تحریک شده سیستم ایمنی و تیمار شده با عصاره و ستون آخر نمونه تحریک شده سیستم ایمنی (* $p < 05$, *** $p < 001$, ****$P < 0001$).

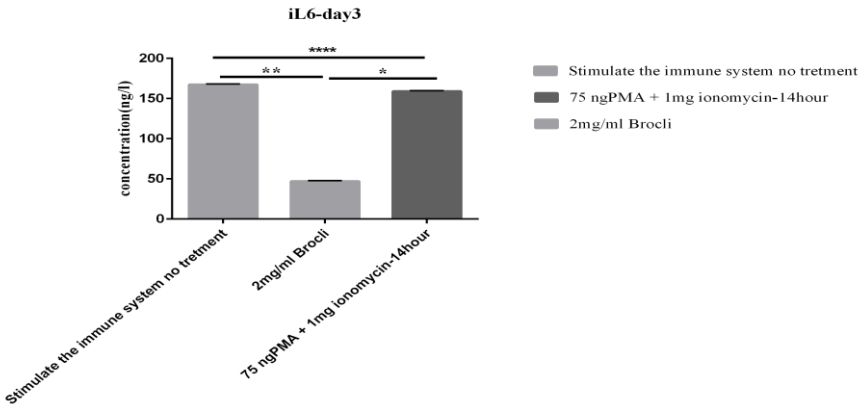
مقایسه بین نمونه‌ای که سیستم ایمنی آن با ۷۵ نانوگرم از *PMA* و ۱ میلی‌گرم ایونومایسین در بازه زمانی ۱۴ ساعت تحریک شده و سپس با عصاره کلم‌بروکلی تیمار شده با نمونه‌ای که فقط القای سیستم ایمنی بر آن انجام شده و با محیط حاوی عصاره کلم‌بروکلی تیمار نشده در بازه زمانی ۳ روزه نشان داد که میزان سطح *IL-6* در نمونه القا شده ایمنی ولی تیمار نشده با عصاره بروکلی، همچنان در سطح معنی‌داری ۵٪ افزایش پیدا کرد. همچنین مقایسه این نمونه با نمونه‌ای که بدون تحریک سیستم ایمنی فقط با ۲ میلی‌گرم از عصاره کلم‌بروکلی به‌مدت ۳ روز تیمار شد اختلاف معنی داری از لحاظ میزان *IL-6* نشان داد (سطح معنی‌داری $P < 0001$) (شکل ۱۰).

نتایج سنجش میزان تغییرات *TNF-α*

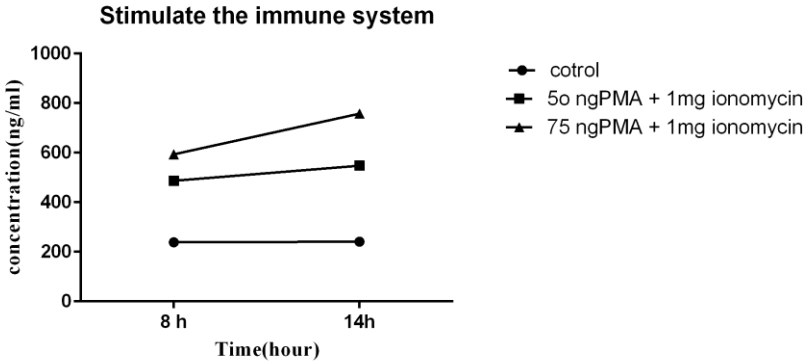
در مرحله اول نمودار استاندارد الایزا طبق پروتکل و دستورالعمل‌های کیت، انجام و رسم شد. در مرحله بعد، برای تحریک سیستم ایمنی و به جهت به‌دست آوردن غلظت مناسبی از مواد تحریک کننده سیستم ایمنی (*PMA* و ایونومایسین) و انتخاب بهترین غلظتی که بتواند سیستم ایمنی را در بالاترین سطح از فعالیت قرار دهد، آزمایشاتی انجام شد. از غلظت ۵۰ نانوگرم *PMA* و ۱ میلی‌گرم ایونومایسین و غلظت ۷۵ نانوگرم *PMA* و ۱ میلی‌گرم ایونومایسین در بازه زمانی ۸ و ۱۴ ساعت استفاده شد. بررسی نتایج مربوط به تغییرات $TNF\alpha$ با توجه به نمودار نشان داده شده در شکل ۱۱ بیان می‌دارد، زمانی که در بازه زمانی ۱۴ ساعت از غلظت ۷۵ نانوگرم *PMA* و ۱ میلی‌گرم ایونومایسین استفاده می‌شود، نسبت به نمودارهای همتای آن در بازه زمانی ۸ ساعت با استفاده از غلظت ۵۰ نانوگرم *PMA* و ۱ میلی‌گرم ایونومایسین به‌طور معنی‌داری و در سطح $P<0001$، باعث افزایش سطح $TNF\alpha$ می‌شود. همچنین نتایج مربوط به سطح تغییرات $TNF\alpha$ نشان داد که استفاده از تیمار ۷۵ نانوگرم از *PMA* و ۱ میلی‌گرم ایونومایسین در بازه زمانی ۱۴ ساعت به‌طور معنی‌داری ($P < 0001$) باعث افزایش سطح $TNF\alpha$

در نمونه تیمار شده نسبت به نمونه کنترل می‌شود، همچنین سطح تغییرات در این نمونه نسبت به سایر نمونه‌ها معنی‌دار بود (شکل ۱۱).

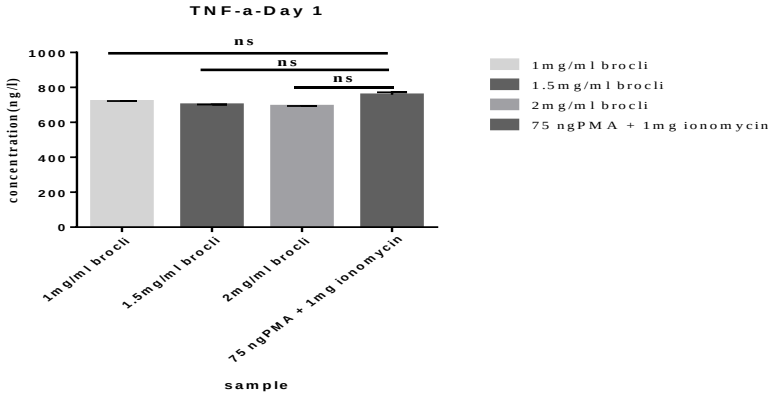
در ادامه بررسی اثر سه غلظت ۱ و ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم از عصاره کلم‌بروکلی حاوی سولفورافان در سه بازه زمانی ۱ و ۲ و ۳ روزه بر میزان سطح تغییرات $TNF\alpha$ سلول‌های تیمار شده با ۷۵ نانوگرم از PMA با ۱ میلی‌گرم از ایونومایسین در بازه زمانی ۱۴ ساعت انجام گرفت. نتایج تیمار سلول با عصاره کلم‌بروکلی بعد از تحریک سیستم ایمنی نشان داد که بعد از گذشت یک روز هیچ تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری بین سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف از عصاره کلم‌بروکلی و نمونه کنترل مشاهده نشد (شکل ۱۲).



شکل ۱۰. میزان سطح تغییرات $IL\text{-}6$ در مقایسه بین نمونه تحریک شده سیستم ایمنی ولی تیمار نشده با نمونه تحریک شده سیستم ایمنی و تیمار شده با عصاره و نمونه تیمار شده ولی تحریک نشده سیستم ایمنی (* $p < 05$, *** $p < 001$, ****$P < 0001$).

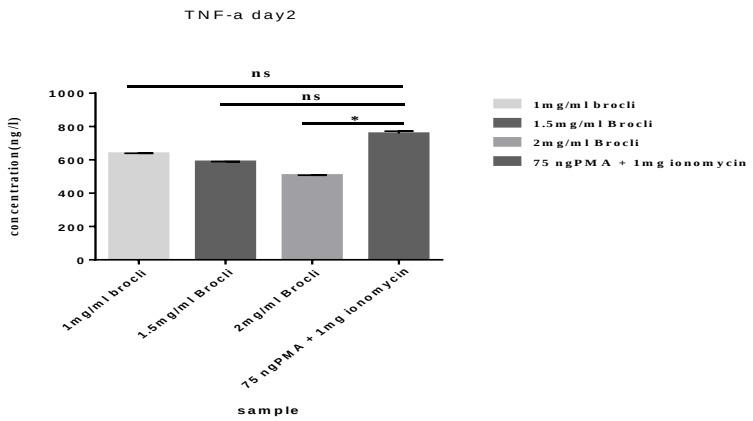


شکل ۱۱. نمودار خطی سطح تغییرات $TNF\text{-}\alpha$ در نمونه تیمارشده برای بررسی تغییرات سطح ایمنی (*** $p < 001$, ****$P < 0001$).

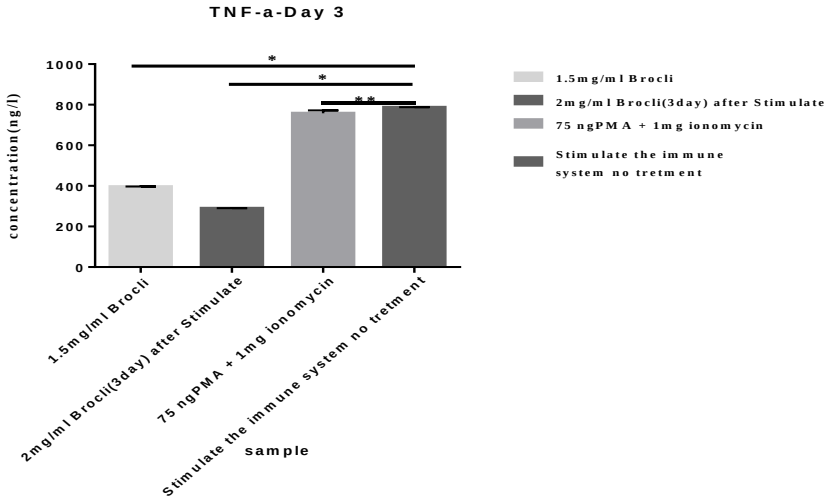


شکل ۱۲. مقایسه اثر تیمار با سه غلظت (۱ میلی‌گرم، ۱/۵ میلی‌گرم، ۲ میلی‌گرم) از عصاره بروکلی در مدت زمان یک روز و نمونه کنترل بر روی $TNF\alpha$ (*ns: non-significant*).

نتایج تیمار سلول‌های تحریک شده سیستم ایمنی با غلظت‌های مختلف از عصاره کلم‌بروکلی در بازه زمانی ۲ روز نشان داد که دو غلظت ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم از عصاره کلم‌بروکلی از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ با نمونه کنترل نشان نداد، اما استفاده از ۲ میلی‌گرم عصاره کلم‌بروکلی به‌طور معنی‌داری $P<01$ باعث کاهش سطح $TNF\alpha$ در مقایسه با نمونه کنترل شد که نشان دهنده این است که غلظت بالاتر عصاره در بازه زمانی بیشتر تاثیرگذار است (شکل ۱۳). آنالیز مربوط به تیمار سلول‌های تحریک شده سیستم ایمنی با غلظت‌های مختلف از عصاره در بازه زمانی ۳ روزه نشان داد که هر سه غلظت از عصاره کلم‌بروکلی به‌طور معنی‌داری باعث کاهش سطح $TNF\alpha$ در نمونه مورد بررسی شد. که این معنی‌داری در مورد دو غلظت ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم با نمونه کنترل در سطح $P<01$ و برای تیمار ۲ میلی‌گرم از عصاره کلم‌بروکلی با نمونه کنترل سطح معنی‌داری بالاتر از $P<001$ را نشان داد (شکل ۱۴). این نتایج نمایانگر این است که ظاهراً زمان تاثیر بسزایی در تاثیرگذاری عصاره‌های بروکلی بر فاکتور مذکور دارد.

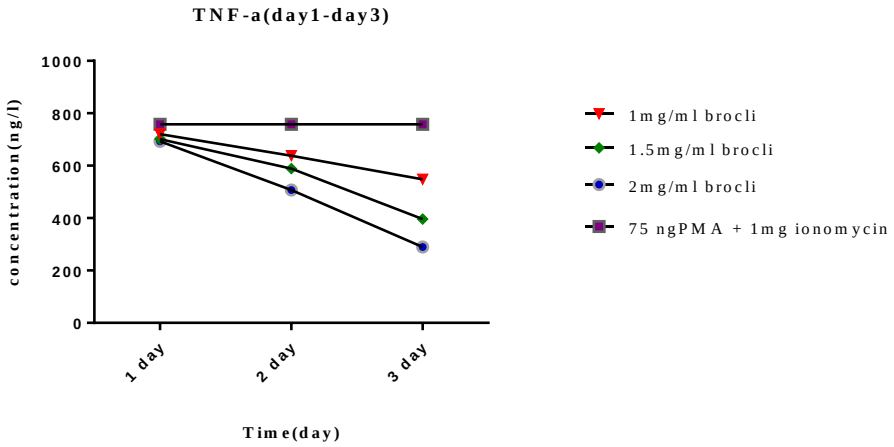


شکل ۱۳. مقایسه اثر تیمار با سه غلظت (۱ میلی‌گرم، ۱/۵ میلی‌گرم، ۲ میلی‌گرم) از عصاره بروکلی در مدت زمان دو روز و نمونه کنترل بر روی $TNF\alpha$ (*$p<05$, ns: non-significant*).

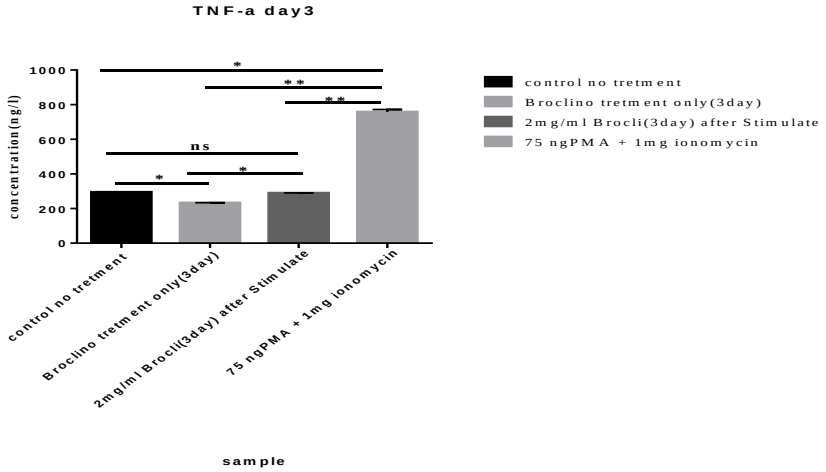


شکل ۱۴. مقایسه اثر تیمار با سه غلظت (۱ میلی‌گرم، ۱/۵ میلی‌گرم، ۲ میلی‌گرم) از عصاره بروکلی در مدت زمان سه روز و نمونه کنترل بر روی $TNF\alpha$ (* $p < 05$, ** $P < 01$).

به‌طور کلی نتایج نشان داد استفاده از عصاره کلم‌بروکلی در غلظت‌های ۱ تا ۲ میلی‌گرم در بازه زمانی ۳ روز باعث کاهش معنی داری در سطح $TNF\text{-}\alpha$ در نمونه‌های تحریک شده سیستم ایمنی می‌شود. روند اثرگذاری عصاره کلم‌بروکلی بر میزان $TNF\text{-}\alpha$ در نمودار شکل ۱۵ مشخص می‌باشد. در این پژوهش برای تایید اثر عصاره کلم‌بروکلی بر سطح $TNF\text{-}\alpha$ در یک نمونه، سلول‌ها تنها با ۲ میلی‌گرم از عصاره کلم‌بروکلی به‌مدت دو روز تیمار شد (بدون هیچ تیمار دیگری). در ادامه مقایسه نتایج نشان داد که عصاره کلم‌بروکلی به‌طور معنی‌داری در سطح ۵٪ باعث کاهش سطح $TNF\text{-}\alpha$ نسبت به نمونه کنترل (نمونه‌ای که فقط محیط نرمال دارد) شد، همچنین آنالیز این نمودار نشان داد که بین نمونه و کنترل (نمونه محیط نرمال بدون هیچ تیمار) با نمونه‌ای که سیستم ایمنی طبق پروتکل القا و سپس با ۲ میلی‌گرم از عصاره کلم‌بروکلی به‌مدت سه روز تیمار شد هیچ تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ وجود نداشت که می‌تواند تاییدی بر تاثیر عصاره کلم‌بروکلی بر $TNF\text{-}\alpha$ باشد (شکل ۱۶).



شکل ۱۵. میزان سطح تغییرات TNFα در سه بازه زمانی با سه غلظت (۱ میلی‌گرم، ۱/۵ میلی‌گرم، ۲ میلی‌گرم) از عصاره بروکلی و نمونه کنترل

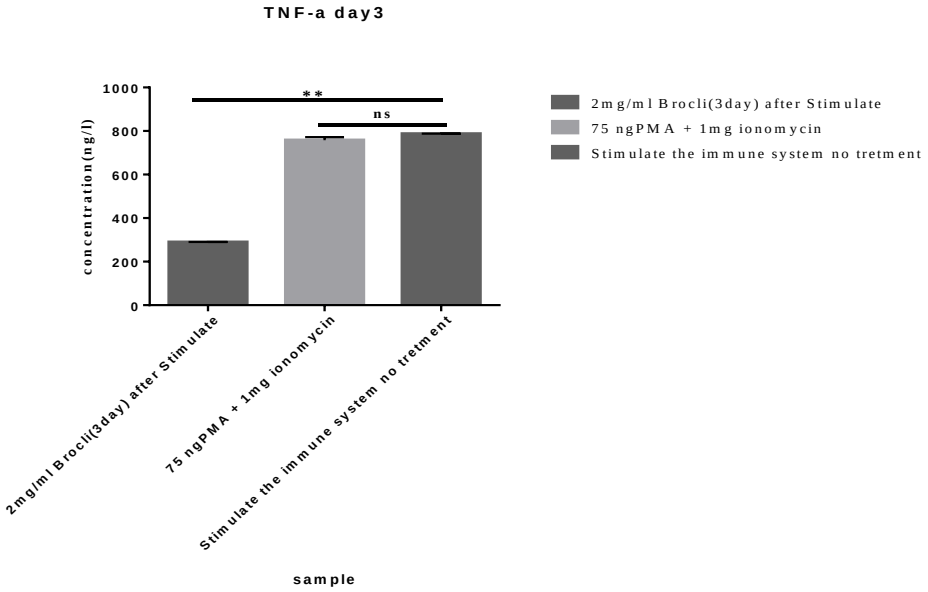


شکل ۱۶. مقایسه بین نمونه تیمار شده با عصاره کلم‌بروکلی با نمونه‌های دیگر. نمونه کنترل بدون هیچ تیمار یا تحریک، نمونه تیمار کنترل با عصاره به‌مدت سه روز، نمونه تحریک شده سیستم ایمنی و تیمار شده با عصاره و ستون آخر نمونه تحریک شده سیستم ایمنی (** p <05, ** P <01, ns: non-significant*).

مقایسه بین نمونه تحریک شده سیستم ایمنی بدون تیمار با عصاره کلم‌بروکلی به‌مدت زمان ۳ روز با نمونه‌ای از سلول تحریک شده سیستم ایمنی و در ادامه تیمار با ۲ میلی‌گرم از عصاره بروکلی به‌مدت ۳ روز به‌طور واضحی اثر عصاره کلم‌بروکلی بر کاهش *TNFα* را نشان داد (سطح معنی‌داری *P<001*) (شکل ۱۷).

اگرچه تاکنون مطالعات زیادی در زمینه تاثیر عصاره بروکلی و سولفورافان بر روی کاهش التهابات سیستم ایمنی در بیماران اتیسمی انجام نشده است ولی تحقیقات چندین ساله دانشگاه جانز هاپکینز نشان داد که به‌واسطه مصرف عصاره کلم‌بروکلی بسیاری از اختلالات رفتاری در افراد دارای اختلال طیف اتیسم کنترل شد به‌طوری‌که با تجویز عصاره بروکلی به‌صورت روزانه به افراد مبتلا به اختلال اتیسم، ۴۶٪ پیشرفت در تعاملات اجتماعی، ۴۲٪ پیشرفت در ارتباطات کلامی و ۵۴٪ کاهش قابل توجه در رفتارهای غیرطبیعی در این گروه از بیماران مشاهده شد، اگرچه آنها مکانیسم دقیق این تاثیرگذاری را مورد بررسی قرار ندادند (Lynch *et al*., 2017). در مطالعه‌ای دیگر روی بیماران مبتلا به سرطان مشخص شد که سولفورافان از طریق مهار فاکتور نکروز تومر آلفا (*TNF-α*)، منجر به کنترل التهاب سیستم ایمنی می‌شود (Yadav *et al*., 2010) و از آنجاییکه مکانیسم مشابهی در مسیر التهاب سیستم ایمنی در اختلال اتیسم وجود دارد لذا به نظر می‌رسد که مصرف روزانه سولفورافان همچنین در درمان اختلالات رفتاری ناشی از این گونه التهابات در افراد اوتیسم می‌تواند مؤثر باشد.

بر خلاف مطالعات محدود موجود در زمینه تاثیر کلم‌بروکلی در کنترل التهاب سیستم ایمنی، تحقیقات زیادی در زمینه تاثیر عصاره سایر گیاهان در این مسیر انجام شده است که تاییدی بر اثربخشی عصاره گیاهان دارویی بر کاهش بیان فاکتورهای مهم دخیل در این مسیر در بیماران مذکور است، لذا در ادامه به برخی از نتایج حاصل از بررسی اثرات دیگر گیاهان دارویی بر روی کنترل التهابات سیستم ایمنی اشاره می‌شود.



شکل ۱۷. مقایسه بین نمونه تحریک شده سیستم ایمنی بدون تیمار با عصاره کلم‌بروکلی به‌مدت زمان ۳ روز با نمونه‌ای از سلول تحریک شده سیستم ایمنی و در ادامه تیمار با ۲ میلی گرم از عصاره بروکلی به‌مدت ۳ روز (*p <05, ** P <01, ns: non-significant*).

ساکی در سال ۲۰۱۸ عنوان کرد التهاب و بی‌نظمی سیستم ایمنی در اختلالات مختلف روانپزشکی نقش دارد. از این رو، گیاهان دارویی مؤثر بر سیستم ایمنی بدن و التهاب ممکن است در اتیسم نیز مؤثر باشند (Saki, 2018). به جهت تایید خواص ضد التهابی زردچوبه، اکسو و همکاران بیان کردند که کورکومین دارای اثرات ضد التهابی است که در پیشگیری از حمله سلول‌های *Th17* به اعصاب و شروع آسیب در بیماری‌ام اس مؤثر است (Xie *et al*., 2011). در تحقیقی دیگر همسو با مطالعه حاضر، گزارش شده است که *جینکوبیلوبا* بر سیستم انتقال دهنده عصبی تأثیر می‌گذارد و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است که می‌تواند بر پاتوژنز اختلالات طیف اتیسم تأثیر بگذارد اما افزودن *جینکوبیلوبا* به ریسپریدون بر نتیجه درمان اتیسم تأثیری نداشت (Hasanzadeh *et al*., 2012). در تحقیقات مشابهی حاج آقایی و همکاران بیان داشتند که عصاره گیاه اسکلروفولاریا استریاتا باعث کاهش تکثیر لنفوسیت‌ها و کاهش تولید سایتوکاین‌های پیش‌التهابی می‌شود و از پاسخ ایمنی در سلول‌ها جلوگیری می‌کند (Hajiaghaei *et al*., 2010).

کانوو و همکاران در سال ۲۰۱۳ بیان داشتند که کاکائو به نسبت غنی از پلی‌فنول است که آن را به یک آنتی‌اکسیدان قوی تبدیل می‌کند. گزارش شده است که مصرف کاکائو به‌دلیل فعالیت آن به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان و همچنین از طریق مکانیسم‌های دیگر، برای سلامت قلب و عروق، عملکردهای مغز و پیشگیری از سرطان مفید است. افزون بر این، کاکائو بر سیستم ایمنی بدن، به‌ویژه پاسخ ذاتی التهابی و پاسخ ایمنی تطبیقی سیستمیک و روده تأثیر می‌گذارد (Pérez-Cano *et al*., 2013).

وانگ و همکاران گزارش کردند عصاره سیر سیاه با افزایش فعالیت سلول‌های *NK* (قاتل طبیعی) که تصور می‌شد نقشی اساسی در ریشه‌کنی سلول‌های تومور در داخل بدن دارد، ایمنی سلولی را افزایش می‌دهد. سایتوکاین‌های بیشتر *NO* (اکسید نیتریک)، *IFN* (اینترفرون)، *IL-2* (اینترلوکین-۲) و *TNF* (عامل نکروز تومور) از سلول‌های طحال موش تحت درمان با عصاره تولید شدند. با این حال، مقدار *IL-4* (اینترلوکین -۴)، که در نظر گرفته می‌شود با ایمنی هومورال (تولید آنتی‌بادی مانند *IgG* و *IgE*) همراه باشد، در مایع رویی

سلول‌های طحال کاهش می‌یابد (Wang *et al*., 2010). خاکپور و همکاران نیز بیان داشتند که عصاره هیدروالکلی گیاه مریم‌گلی به‌دلیل وجود فلاونوییدها و ترپن‌ها قابل مقایسه با داروی ضد التهاب دگزامتازون است و دارای خواص ضد التهابی در حیوانات مدل می‌باشد (Khakpour *et al*., 2015).

چاکرابارتی و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه خود رابطه معکوس بین بیان ژن *TNFα* و *IL-10* را در ماهی کاتلا تغذیه شده با دانه گیاه *Achyranthes aspera* (گونه‌ای علف هرز) مشاهده کردند، چراکه *IL-10*به‌عنوان یک سایتوکاین چندمنظوره می‌باشد که یکی از فعالیت‌های آن سرکوب عملکرد سیستم ایمنی است (Chakrabarti *et al*., 2014). همسو با تحقیقات دیگر محققان، هوانگ و همکاران در مطالعه خود گیاه *Panax ginseng* که اصطلاحاً *ginsang*نامیده می‌شود را معرفی کردند که دارای اثرات تعدیل کننده سیستم ایمنی است، که از طریق تولید انواع سایتوکاین‌هایی که پاسخ به محرک‌های پیش التهابی را کاهش می‌دهد و همچنین با مهار تولید سایتوکاین‌های التهابی، از ایجاد التهاب جلوگیری می‌کند و در درمان بیماری‌های خود التهابی مؤثر است (Hwang *et al*., 2011).

در این پژوهش به جهت شبیه‌سازی هر چه بیشتر محیط آزمایشگاه با شرایط طبیعی، و از آنجایی‌که در بدن بیماران مبتلا به اتیسم میزان *IL-6 TNFα* در بالاترین سطح نسبت به افراد نرمال قرار دارد، با القا سیستم ایمنی به میزان ۷۵ نانوگرم *PMA* و ۱ میلی‌گرم ایونومایسین طی بازه زمانی ۱۴ ساعت میزان این دو فاکتور ایمنی در سلول بالا رفت و زمانی که تحت تیمار با عصاره کلم‌بروکلی با غلظت ۲ میلی‌گرم و بعد از گذشت ۳ روز قرار گرفت، عصاره بروکلی در سطح معنی‌داری توانست *IL-6 – TNFα* را کاهش دهد. از آنجایی‌که از یک طرف این دو فاکتور از مارکرهای اصلی اختلال اتیسم محسوب می‌شوند و از سوی دیگر با در نظر گرفتن نتایج مطالعات قبلی، حاکی از ارتباط این فاکتورها با برخی اختلالات رفتاری از جمله پرخاشگری، عدم توجه و تمرکز و عدم برقراری ارتباط با محیط در افراد دارای اختلال اتیسم می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که هر تیمار که بتواند بر کاهش بیان این دو فاکتور تاثیر بگذارد احتمالاً در درمان برخی از علائم این بیماری کمک کننده خواهد بود. لذا به نظر می‌رسد با انجام آزمایش‌های بیشتر و استفاده از حیوانات مدل با کاهش فاکتورهای *IL-6* و *TNFα* برخی از علائم بیماری اتیسم از قبیل پرخاشگری و عدم تمرکز و... نیز کاهش یابد. پیشنهاد می‌شود با توجه به این موضوع مهم که استفاده از گیاه کلم‌بروکلی اثر منفی بر بدن ندارد و با در نظر گرفتن ذائقه بسیار حساس بیماران اتیسم با رعایت کلیه مسیرهای پیش رو در تولید مکمل دارویی، از این گیاه پس از مطالعات تکمیلی بیشتر به‌عنوان مکمل گیاهی در کنار دیگر راه‌های درمان این اختلال، مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

مقاله حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه پیام نور مرکز کرج می‌باشد. با تشکر فراوان از آقای دکتر هوشنگ دادگر و آقای دکتر شاهسوارانی مسئول آزمایشگاه طب بازساختی و نوآوری‌های پزشکی و جناب آقای مهندس سعدی حسینی از انستیتو پاستور ایران، که با کمک و همکاری ایشان این پژوهش به نتیجه مطلوب رسید.

REFERENCES

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2014). *Cellular and molecular immunology E-book*. Elsevier Health Sciences.

Ashwood, P., & Wakefield, A. J. (2006). Immune activation of peripheral blood

and mucosal CD3+ lymphocyte cytokine profiles in children with autism and gastrointestinal symptoms. *Journal of Neuroimmunology*,*173*(1-2),126-134.

Blanco, P., Palucka, A. K., Pascual, V., & Banchereau, J. (2008). Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *19*(1), 41-52.

Carswell, E., Old, L. J., Kassel, R., Green, S., Fiore, N., & Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *72*(9), 3666-3670.

Ciska, E., & Kozłowska, H. (2001). The effect of cooking on the glucosinolates content in white cabbage. *European Food Research and Technology*, *212*(5), 582-587.

Chakrabarti, R., Srivastava, P. K., Verma, N., & Sharma, J. (2014). Effect of seeds of Achyranthes aspera on the immune responses and expression of some immune-related genes in carp *Catla catla*. *Fish & Shellfish Immunology*, *41*(1), 64-69.

Chez, M. G., Dowling, T., Patel, P. B., Khanna, P., & Kominsky, M. (2007). Elevation of tumor necrosis factor-alpha in cerebrospinal fluid of autistic children. *Pediatric Neurology*, *36*(6), 361-365.

Croonenberghs, J., Bosmans, E., Deboutte, D., Kenis, G., & Maes, M. (2002). Activation of the inflammatory response system in autism. *Neuropsychobiology*, *45*(1), 1-6.

Emanuele, E., Orsi, P., Boso, M., Broglia, D., Brondino, N., Barale, F., ... & Politi, P. (2010). Low-grade endotoxemia in patients with severe autism. *Neuroscience Letters*, *471*(3), 162-165.

Fahey, J. W., Zhang, Y., & Talalay, P. (1997). Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(19), 10367-10372.

Fimognari, C., Lenzi, M., & Hrelia, P. (2008). Interaction of the isothiocyanate sulforaphane with drug disposition and metabolism: pharmacological and toxicological implications. *Current drug metabolism*, *9*(7), 668-678.

Fowke, J. H., Chung, F. L., Jin, F., Qi, D., Cai, Q., Conaway, C., ... & Zheng, W. (2003). Urinary isothiocyanate levels, brassica, and human breast cancer. *Cancer Research*, *63*(14), 3980-3986.

Gahring, L. C., Carlson, N. G., Kulmer, R. A., & Rogers, S. W. (1996). Neuronal expression of tumor necrosis factor alpha in the OVOUJI fme brain. *Neuroimmunomodulation*, *3*(5), 289-303.

Ghaffari, M. A., Mousavinejad, E., Riahi, F., Mousavinejad, M., & Afsharmanesh, M. R. (2016). Increased serum levels of tumor necrosis factor-alpha, resistin, and visfatin in the children with autism spectrum disorders: a case-control study. *Neurology Research International*, *2016*.

Guvenel, A. (2015) Why T cell stimulated with PMA and ionomycin loss staining for CD4? Exist a tip like intracellular staining or something? Retrieved from: https://www.researchgate.net/post/Why_T_cell_estimulated_with_PMA_and_ionomycin_loss_staining_for_CD4_Exist_a_tip_like_intracelular_staining_or_something/55cc639161432560888b45a9/citation/download.

Hajiaghaei, R., Azadmehr, A., Monsef-Esfahani, H., Rezazadeh, SH., (2010) Evaluation of immunomodulatory effects of *Scrofularia striata* extract on the immune system. Thesis Department of Pharmacognosy and Pharmacy, Medicinal Plants Research Institute, Jihad University, Karaj, Iran.

Hasanzadeh, E., Mohammadi, M.R., Ghanizadeh, A., Rezazadeh, S.A., Tabrizi, M., Rezaei, F.,& Akhondzadeh, S. (2012). A double-blind placebo controlled trial of Ginkgo biloba added to risperidone in patients with autistic disorders. *Child*

Psychiatry & Human Development, *43*(5), 674-682.

Higdon, J. V., Delage, B., Williams, D. E., & Dashwood, R. H. (2007). Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacological Research*, *55*(3), 224-236.

Hwang, I., Ahn, G., Park, E., Ha, D., Song, J. Y., & Jee, Y. (2011). An acidic polysaccharide of Panax ginseng ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces regulatory T cells. *Immunology Letters*, *138*(2), 169-178.

Jacobo-Velázquez, D. A., & Cisneros-Zevallos, L. (2009). Correlations of antioxidant activity against phenolic content revisited: a new approach in data analysis for food and medicinal plants. *Journal of Food Science*, *74*(9), R107-R113.

Jyonouchi, H., Sun, S., & Rimell, F. L. (2000). Cytokine production by sinus lavage, bronchial lavage, and blood mononuclear cells in chronic rhinosinusitis with or without atopy. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, *126*(4), 522-528.

Khakpour, S., Khosravi, M., Jafari, M., Ahadi, A. (2015). The effect of hydroalcoholic extract of *Salvia officinalis* L. on reducing inflammation in male small laboratory mice, Department of Biology, Faculty of Life Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch.

Li, X., Chauhan, A., Sheikh, A. M., Patil, S., Chauhan, V., Li, X. M., ... & Malik, M. (2009). Elevated immune response in the brain of autistic patients. *Journal of neuroimmunology*, *207*(1-2), 111-116.

Lynch, R., Diggins, E. L., Connors, S. L., Zimmerman, A. W., Singh, K., Liu, H., ... & Fahey, J. W. (2017). Sulforaphane from broccoli reduces symptoms of autism: a follow-up case series from a randomized double-blind study. *Global Advances in Health and Medicine*, *6*, 2164957X17735826.

Malik, M., Sheikh, A. M., Wen, G., Spivack, W., Brown, W. T., & Li, X. (2011). Expression of inflammatory cytokines, Bcl2 and cathepsin D are altered in lymphoblasts of autistic subjects. *Immunobiology*, *216*(1-2), 80-85.

Palak, S. K., Thakur, A., & Kohli, K. (2016). Broccoli: An insight into formulation and patentability aspects. *Drug Des*, *5*(139), 2169-0138.

Pérez-Cano, F. J., Massot-Cladera, M., Franch, À., Castellote, C., & Castell, M. (2013). The effects of cocoa on the immune system. *Frontiers in Pharmacology*, *4*, 71.

Runte, F., Renner IV, P., & Hoppe, M. (2019). Kuby immunology.

Rose-John, S., Scheller, J., Elson, G., & Jones, S. A. (2006). Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *Journal of Leukocyte Biology*, *80*(2), 227-236.

Rudolf, E., Andělová, H., & Červinka, M. (2009). Activation of several concurrent proapoptic pathways by sulforaphane in human colon cancer cells SW620. *Food and Chemical Toxicology*, *47*(9), 2366-2373.

Saki, K. (2018). Autism: Synthetic-and plant-derived control and treatment. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*, *12*(03).

Sammani, A., Shammaa, E., Chehna, F., & Rahmo, A. (2014). The In-Vitro Toxic Effect of The Glycoalkaloids for Some Solanum Species Against The LIM-1863 Cell Line. *Pharmacognosy Journal*, *6*(4).

Scott, O., Galicia-Connolly, E., Adams, D., Surette, S., Vohra, S., & Yager, J. Y. (2012). The safety of cruciferous plants in humans: a systematic review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2012*.

Sharma, R., Sharma, A., Chaudhary, P.,

Pearce, V., Vatsyayan, R., Singh, S. V., ... & Awasthi, Y. C. (2010). Role of lipid peroxidation in cellular responses to D, L-sulforaphane, a promising cancer chemopreventive agent. *Biochemistry*, *49*(14), 3191-3202.

Singh, K., Connors, S. L., Macklin, E. A., Smith, K. D., Fahey, J. W., Talalay, P., & Zimmerman, A. W. (2014). Sulforaphane treatment of autism spectrum disorder (ASD). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(43), 15550-15555.

Tanaka, T., & Kishimoto, T. (2014). The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunology Research*, *2*(4), 288-294.

Theoharides, T. C., Tsilioni, I., Patel, A. B., & Doyle, R. (2016). Atopic diseases and inflammation of the brain in the pathogenesis of autism spectrum disorders. *Translational Psychiatry*, *6*(6), e844-e844.

Tsoi, M., Jansen, A. G. M., Bass, J., Chiang, W. C., Seck, M., Tsoi, V., & Wyder, P. (1998). Excitation of a magnetic multilayer by an electric current. *Physical Review Letters*, *80*(19), 4281.

Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., & Jackson, R. B. (2011). Membrane structure and function. *Biology 9th Edition: Campbell*.

Verkerk, R., Schreiner, M., Krumbein, A., Ciska, E., Holst, B., Rowland, I., ... & Dekker, M. (2009). Glucosinolates in Brassica vegetables: the influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Molecular Nutrition & Food Research*, *53*(S2), S219-S219.

Wang, L. I., Giovannucci, E. L., Hunter, D., Neuberg, D., Su, L., & Christiani, D. C. (2004). Dietary intake of cruciferous vegetables, glutathione S-transferase (GST) polymorphisms and lung cancer risk in a Caucasian population. *Cancer Causes & Control*, *15*(10), 977-985.

Wang, D., Feng, Y., Liu, J., Yan, J., Wang, M., Sasaki, J. I., & Lu, C. (2010). Black garlic (*Allium sativum*) extracts enhance the immune system. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, *4*(1), 37-40.

Wei, H., Zou, H., Sheikh, A. M., Malik, M., Dobkin, C., Brown, W. T., & Li, X. (2011). IL-6 is increased in the cerebellum of autistic brain and alters neural cell adhesion, migration and synaptic formation. *Journal of Neuroinflammation*, *8*(1), 1-10.

Xie L, Li X K, Takahara S (2011) Curcumin has bright prospects for the treatment of multiple sclerosis. *International Immunopharmacology*. *11*(3), 323-330.

Yadav, V. R., Prasad, S., Sung, B., Kannappan, R., & Aggarwal, B. B. (2010). Targeting inflammatory pathways by triterpenoids for prevention and treatment of cancer. *Toxins*, *2*(10), 2428-2466.

Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C. G., & Posner, G. H. (1992). A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(6), 2399-2403.

Zhang, Y., Kensler, T. W., Cho, C. G., Posner, G. H., & Talalay, P. (1994). Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(8), 3147-3150.