

اثر اسانس آویشن شیرازی بر تولید یون سوپراکسید و نیتریک اکسید و بیان ژن‌های NADH اکسیداز و نیتریک اکسید سنتاز در سلول‌های ماکروفاژ

نویسندگان: مریم امینی زاده، غلامرضا کاوسی*

مرکز بیوتکنولوژی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

E-mail: ghkavoosi@shirazu.ac.ir

* نویسنده مسئول: غلامرضا کاوسی

چکیده

هدف: اثرات مهارکننده‌ی اسانس آویشن شیرازی بر تولید سوپراکسید و نیتریک اکسید و بیان ژن‌های NADH اکسیداز (NOX) و نیتریک اکسید سنتاز (NOS) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: اسانس گیاه توسط روش تقطیر جداسازی و اجزای تشکیل‌دهنده آن بوسیله کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی مشخص شد. قدرت جاروب‌کنندگی اسانس بر روی رادیکال سوپراکسید و نیتریک اکسید به روش بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله بعد سلول‌های ماکروفاژ موشی تحریک‌شده با لیپوپلی ساکارید (LPS) با غلظت‌های مختلف اسانس تیمار شدند و بیان ژن‌های آن آدی اچ اکسیداز و نیتریک اکسید سنتاز به روش Real Time PCR و همچنین میزان تولید یون سوپراکسید و نیتریک اکسید به روش‌های بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده اسانس گیاه آویشن، لینالوول (۳۲/۹ درصد)، کارواکرول (۲۶/۷ درصد)، تیمول (۱۲/۵ درصد)، پاراسیمن (۴/۵ درصد) و الفا-پینن (۲ درصد) می‌باشند. اسانس آویشن در غلظت‌های پایین ۷۰-۱۰۰ میکروگرم/میلی لیتر قدرت جاروب‌کنندگی زیادی از آنیون‌های سوپراکسید (O_2^-) و نیتریک اکسید (NO) در مطالعات درون شیشه‌ای از خود نشان می‌دهد. اسانس در غلظت غیرسیتوتوکسیک، در ماکروفاژهای موشی تحریک‌شده توسط LPS باعث کاهش شدید تولید یون سوپراکسید و نیتریک اکسید شد. همچنین در سلول‌های J774 (لاین ماکروفاژهای موشی) تحریک‌شده با LPS اسانس آویشن باعث کاهش بیان ام آر آن آ نیتریک اکسید سنتاز و NADH اکسیداز شد.

نتیجه‌گیری: مشاهدات حاکی از آن است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن احتمالاً از طریق کاهش تولید نیتریک اکسید، سوپراکسید و کاهش بیان ژن‌های نیتریک اکسید سنتاز و NADH اکسیداز است.

واژگان کلیدی: نیتریک اکسید، سوپراکسید آنیون، نیتریک اکسید سنتاز، NADH اکسیداز

دانشور

پژوهشی

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست و پنجم-شماره ۱۳۶
شهریور ۱۳۹۷

دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۳۰
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۷/۰۵/۱۳
پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۲۹

مقدمه

تشکیل‌دهنده شباهت بسیاری به اسانس دارد (۶). اسانس و عرق بعضی از گیاهان دارای مزایای بیولوژیکی و بهداشتی زیادی از جمله خواص ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی می‌باشند (۷)؛ اما اسانس‌های به دست آمده از گیاهان دارویی معمولاً ناپایدار هستند و در آب حل نمی‌شوند. کپسوله کردن این اسانس‌ها و عرقیات در یک امولسیفایر خوراکی راه ساده‌ای برای پایدارسازی و حلال‌سازی آن‌هاست (۸). اخیراً دندریم‌های پلی‌آمین (پلی‌آمیدوآمین) به عنوان امولسیفایر سازگار و کارآمد برای اسانس‌های گیاهی مورد توجه قرار گرفته‌اند. واکنش اسید-باز دندروزوم‌ها و اسانس باعث می‌شود که اسانس به داخل ساختار دندریم وارد شود (۹).

آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora* گیاهی متعلق به خانواده نعناعیان است که هم به عنوان طعم‌دهنده و هم در طب سنتی استفاده می‌شود. اسانس این گیاه نقش مهمی در داروسازی و صنایع غذایی ایفا می‌کند. انحلال اسانس در عرق در حضور پلی‌آمیدوآمین دندروزوم ترکیبی پیچیده‌ای از اسانس-آب معطر ایجاد می‌کند که اجزای هیدروفیل و لیپوفیل در تعادل قرار می‌گیرند و در نتیجه این ترکیب کارایی، ایمنی و خواص عملکردی بالاتری را دارا می‌شود. بر این اساس، در مطالعه حاضر، اثرات مهارکننده اسانس آویشن شیرازی بر تولید سوپراکسید و نیتریک اکسید و بیان ژن‌های NADH اکسیداز (NOX) و نیتریک اکسید سنتاز (NOS) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی و تعیین خصوصیات اسانس

قسمت‌های هوایی آویشن (برگ و گل) تهیه‌شده از گیاهان وحشی به مدت سه روز در سایه خشک شدند. قطعات خشک شده (۱۰۰ گرم) به مدت سه ساعت با استفاده از کلونجر تقطیر یافتند. آب جهت تولید بخار برای حمل مواد شیمیایی سبک، جوشانده شد، سپس بخار سرد شده و محصول تقطیرشده (اسانس و آب

رادیکال‌های آزاد یا اکسیدانت‌ها گونه‌های اکسیژن یا نیتروژن بسیار فعالی از جمله رادیکال هیدروکسیل، آنیون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، نیتریک اکسید، نیتريت، پراکسی نیتريت، پراکسید لیپیدها و مواد واکنش پذیر با تیوباریتوریک اسید می‌باشند. ایجاد و تشکیل آن‌ها می‌تواند منشا داخلی (بوسیله تنفس و تحریک ماکروفازها) یا منشا خارجی (با تابش یونیزه یا آلاینده‌های خاص) داشته باشد (۱). این رادیکال‌ها می‌توانند با تغییر چربی، قند، اسید نوکلئیک، پروتئین، آنزیم‌ها و متابولیت‌ها منجر به آسیب سلول شوند. آسیب سلولی ناشی از رادیکال‌های آزاد در فرآیندهای فیزیولوژیکی و وقایع مختلف پاتولوژیک مانند جهش‌های دی‌ان‌ا، سرطان، بیماری‌های قلبی عروقی، آب مروارید، کاهش قدرت سیستم ایمنی بدن، بیماری کبد، دیابت، التهاب، نارسایی کلیه، اختلال عملکرد مغز، پیری و استرس دخالت می‌کنند (۲،۳). برای مقابله با این رادیکال‌های سلول‌ها مجهز به سیستم آنتی‌اکسیدان داخل سلولی شامل آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی (آسکوربیک اسید، توکوفرول، کارتنوئید، گلوکوتانیون، پلی‌فنل‌ها) و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی (پراکسیدازها و کاتالازها) هستند (۴). سیستم آنتی‌اکسیدان درونی به تنهایی برای انسان در بسیاری از شرایط کافی نیست و انسان به انواعی از آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در رژیم غذایی نیاز دارد تا از صدمات رادیکال‌های آزاد بدن را محافظت کند. در مقالات علمی متعددی بیان شده است که رژیم غذایی حاوی آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند اسانس یا عرقیات برای سلامت انسان مفید است (۵).

در میان این مواد آنتی‌اکسیدان قوی، اسانس بعضی از گیاهان که مخلوطی از ترکیبات لیپوفیل مانند ترکیبات فنلی، ترپنوئید و فلاونوئیدهاست، توجهات زیادی را در صنایع پزشکی، دارویی، کشاورزی و غذایی به خود اختصاص داده است. آب معطر (عرق) گیاه (هیدرولیت) محلول آبی شفاف و اشباع از مواد فرار آروماتیک است که از تقطیر گیاه به دست می‌آید و از نظر مواد

متاسولفات (۲۰ mM)، نیکوتین آمید دی نوکلئوتید آمین (۳۰۰ mM)، نیتروبولوترازولیوم (۵۰ mM) بود. بعد از انکوباسیون جذب در ۵۶۰ نانومتر خوانده شد و در نهایت درصد جاروب کنندگی رادیکال سوپراکسید از معادله زیر بدست آمد:

درصد جاروب کنندگی رادیکال سوپراکسید =
 [(جذب کنترل-جذب نمونه)/جذب کنترل] × ۱۰۰
 جذب کنترل = جذب محلول واکنش رادیکال سوپراکسید؛ جذب نمونه = جذب محلول رادیکال سوپراکسید در حضور آنتی‌اکسیدان.

سپس با استفاده از درصد مهارکنندگی رادیکال سوپراکسید در مقابل غلظت های مختلف ماده آنتی‌اکسیدان نموداری رسم می‌شود که IC50 را می‌توان مشخص کرد.

سنجش مهار نیتریک اکسید

۲۰ میکرولیتر از امولسیون تهیه شده با ۰/۵ میلی‌لیتر از سدیم نیتروپروسید (SNP) مخلوط و در دمای ۳۷°C به مدت دو ساعت انکوبه شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف گریس به مخلوط افزوده و جذب در ۵۴۰ نانومتر خوانده شد.

درصد مهارت تولید نیتریک اکسید = [(جذب کنترل-جذب نمونه)/جذب کنترل] × ۱۰۰
 IC50 از گراف رسم شده بر اساس درصد مهار نیتریک اکسید علیه غلظت آنتی‌اکسیدان بدست آمد.

کشت سلول‌های ماکروفاژ

رده سلولی ماکروفاژ موشی (J774) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM غنی شده با ال-گلوتامین ۲ mM، پنی‌سیلین ۱۰۰ U/mL، استرپتومایسین ۱۰۰ µg/mL و FCS غیرفعال شده (۱۰ درصد) کشت داده شدند و محیط رشد هر هفته سه بار تعویض شد. قدرت بقا سلول‌ها بوسیله رنگ تریپان بلو اندازه‌گیری شد. سلول‌ها با غلظت ۲ × ۱۰^۶ سلول در میلی‌لیتر در پلیت‌های ۲۴ خانه کشت و بعد از گذشت ۱۸ ساعت، سلول‌هایی که نجسیده بودند به آرامی از محیط حذف شد.

معطر) جمع‌آوری شد. اسانس‌های چربی دوستی که بر روی آب معطر شناور بودند با استفاده از یک قیف جداساز جداگشت. اسانس و آب معطر حاصل شده در یک ویال و در دمای پایین (۴°C) نگه‌داری شد. تجزیه اسانس با استفاده از کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی سری ۷۸۹۰-A (Agilent Palo Alto CA) و بر اساس دستورالعمل دستی انجام گردید. شاخص خروج (RI) هم بر اساس زمان خروج آلکان‌ها (C8-C25) به عنوان استاندارد مشخص و در نهایت ترکیبات گیاهی بوسیله مقایسه شاخص تأخیر با منابع موجود تعیین گشت (۱۰).

تهیه امولسیون اسانس

برای تهیه امولسیون دندروزم-اسانس، یک میلی‌لیتر اسانس به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب معطر (عرق) اضافه شد. در این حالت اسانس بر روی آب معطر قرار می‌گیرد. در مرحله بعد دو میلی‌لیتر دندروزم به مخلوط اسانس-آب معطر اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵°C و سپس ۲۴ ساعت در ۴°C قرار داده شد. تحت این شرایط یک امولسیون شیری‌رنگ ایجاد می‌شود که برای آنالیزهای بیوشیمیایی و آنتی‌اکسیدان مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش محتوای فنل کل

میزان فنل کل در امولسیون بدست آمده بوسیله معرف فولین-سیوکالتو با استفاده از اسیدگالیک به عنوان استاندارد بدست آمد. ۲۰۰ میکرولیتر از امولسیون یا اسیدگالیک (۰-۵۰۰ میکروگرم) به یک میلی‌لیتر معرف فولین-سیوکالتو (۱۰ درصد) و ۰/۳ میلی‌لیتر Na₂CO₃ (۱۰ درصد) اضافه و مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه شیک شد. سپس جذب در ۷۶۵ نانومتر توسط اسپکتوفتومتر خوانده شد. برای آنالیزهای بعدی امولسیون توسط آب مقطر به غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر رسانیده شد.

سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکال سوپراکسید

۲۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف امولسیون رقیق شده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق با مخلوط واکنش رادیکال سوپراکسید انکوبه شد. مخلوط واکنش در بافرسفات (۱۰ mM, pH ۷/۴) شامل فنازین

فعالیت سیتوتوکسیک

سلول‌های ماکروفاژی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C و دی اکسید کربن (پنج درصد) با غلظت‌های مختلفی از اسانس آویشن (۰-۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) انکوبه شد. پس از آن، ۱۰ میکرولیتر MTT (پنج میکروگرم/میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه و به مدت چهار ساعت در ۳۷°C انکوبه شدند و در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از بافر لیزکننده (SDS ۱۰ درصد در ۱۰ mM HCl) افزوده شد. جذب هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه پلیت خوان تعیین شد. قدرت حیات سلول‌ها بوسیله احیا MTT به فورمازان تعیین می‌شود و درصد بقا از فرمول زیر تعیین می‌گردد:

(جذب سلول‌های تیمار شده/جذب نمونه کنترل) × ۱۰۰
تولید نیتریک اکسید و سوپراکسید آنیون در سلول ماکروفاژ در حضور LPS و امولسیون اسانس

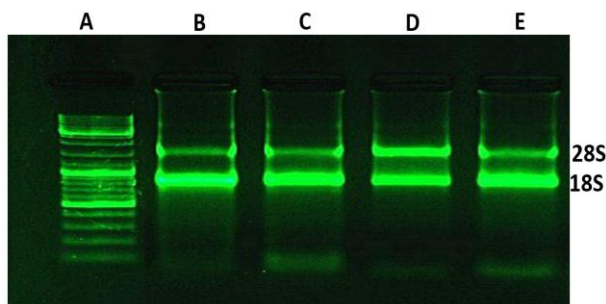
سلول‌های ماکروفاژی در پلیت‌های ۲۴ خانه (۱۰۶ × ۲ سلول در میلی‌لیتر، یک میلی‌لیتر در هر چاهک) کشت داده شدند و به مدت یک‌شب (در ۳۷°C تحت شرایط رطوبت و CO₂ پنج درصد) انکوبه شدند. برخی از سلول‌ها با غلظت‌های غیرتوکسیستک اسانس آویشن (۵ و ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) به مدت دو ساعت تیمار شدند و سپس با LPS (یک میکروگرم/میلی‌لیتر از اشیریشیاکولی) تیمار گشتند. بعد از انکوباسیون ۲۴ ساعته، ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت با ۱۰۰ میکرولیتر معرف گریس (سولفانامید یک درصد، نفتیل اتیلن دیامین یک دهم درصد و اسید فسفریک سه درصد) در پلیت‌های ۹۶ خانه مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و پس از آن محتوی نیتريت در ۵۴۰ نانومتر بررسی گردید. از سدیم نیتريت هم برای تهیه منحنی استاندارد استفاده شد (۱۱).

ROS با استفاده از دی کلرودی هیدروفلوروسین دی استات (DCFH2-DA) اندازه‌گیری شد. DCFH2-DA در غلظت نهایی دو میکروگرم/میلی‌لیتر به سلول‌های کشت داده‌شده اضافه و دو ساعت دیگر در تاریکی قرار داده شد. در نهایت، طول‌موج تحریکی در ۴۸۵ نانومتر و طول‌موج حذفی در ۵۲۸ نانومتر با استفاده از دستگاه

خوناش فلورسانس تعیین گشت (۱۲).

میزان بیان ژن‌های NOX و NOS در سلول J774 در حضور LPS و امولسیون اسانس استخراج RNA و سنتز cDNA

در حدود ۱۰۶ × ۲ سلول که تحت تیمار با LPS و امولسیون اسانس قرار گرفته بودند در میکرو تیوب‌های عاری از آر آن آ به همراه بافر RNX-plus به طور کامل مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. ۲۰۰ میکرولیتر کلروفوم هر ویال اضافه و به آرامی مخلوط شد. مخلوط در ۱۳۲۰۰g در ۴°C به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گشت، سوپرناتانت به ویال جدیدی انتقال یافت و به همان میزان ایزوپروپانول افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ نگه‌داشته شد. سپس کلاف RNA با اتانول ۷۵ درصد شسته و خشک شد و در نهایت با اضافه کردن ۱۵ میکرولیتر آب عاری از RNase به حالت معلق درآمد. RNA کل استخراج‌شده توسط دستگاه نانودراپ و الکتروفورز بر روی ژل آگاروز (شکل ۱) کیفیت‌سنجی و در مرحله بعدی با استفاده از RNA، ۱۰۰ پیکومول الیگو dT، ۱۵ پیکومول dNTP، ۲۰ واحد مهارکننده RNase و ۲۰۰ واحد آنزیم ترنسکریپتاز معکوس M-Mulv اولین رشته cDNA در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر سنتز شد.



شکل ۱. کیفیت RNA استخراج‌شده از ماکروفاژهای

تیمار شده با LPS. A = نشانگرهای وزن مولکولی. B = نمونه کنترل بدون هیچ‌گونه تیمار. C = نمونه تیمار شده به LPS. D = نمونه تیمار شده به LPS و اسانس آویشن شیرازی با غلظت ۵ میکروگرم/میلی‌لیتر. E = نمونه تیمار شده به LPS و اسانس آویشن شیرازی با غلظت ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر.

RT-PCR کمی

آزمایش مخلوط شد. زمان دناتوراسیون ابتدایی پنج دقیقه در نظر گرفته شد و سپس ۹۴°C به مدت دو دقیقه، زمان آنالیز هر پرایمر ۱۵ ثانیه و در نهایت ۳۰ ثانیه در ۷۲°C برای هر نمونه مورد آزمایش، واکنش Real-time PCR دو بار تحت شرایط یکسان صورت گرفت. آنگاه، برای آنالیز نتایج Real-time بیان نسبی ژن هدف با بیان ژن کنترل مقایسه شد و با استفاده از روش $\Delta\Delta CT$ تعیین گشت. CT هر نمونه با استفاده از نرم‌افزار Line Gene K بدست آمد (fqdpcr ver. 4.2.00).

طراحی پرایمر با استفاده از نرم‌افزار Allele ID7 و با توجه به نقطه اتصال اگزون‌ها برای گلیسرآلدهید-۳- فسفات دهیدروژناز به عنوان ژن کنترل داخلی و ژن‌های مورد آزمایش صورت گرفت (جدول ۱). RT-PCR کمی در حجم ۲۰ میکرولیتر و با حضور یک میکرولیتر cDNA، بافر سایبرگرین 1x و چهار پیکومول از هر پرایمر انجام شد. Real-time PCR توسط دستگاه ترموسایکلر Line Gene K به روش زیر انجام شد: ابتدا پنج میکرولیتر از cDNA به همراه چهار پیکومول از هر پرایمر و SYBR Premix Ex Taq TM II 1x برای انجام

جدول ۱. پرایمرهای استفاده شده در Real-time PCR

ژن	شماره دسترسی	توالی همسو	توالی ناهم‌سو
GAPDH	NM-008084	5'-CGGTGTGAACGGATTTGGC-3'	5'-TGAGTGGAGTCATACTGGAAC-3'
NOX p22	NM-007806.3	5'-ATGGAGCGATGTGGACAG-3'	5'-ACCGACAACAGGAAGTGG-3'
NOX p40	NM-008677.2	5'-CAACAAAGACTGGCTGGAG-3'	5'-CCGCAATGTCCTTGATGG-3'
NOX p47	NM-001286037.1	5'-ATGGCACAAAGGACAATC-3'	5'-ACCTGAGGCTATACACAAG-3'
NOX p67	NM-010877.4	5'-CAGCCACAGTCAGCAGAG-3'	5'-GCACAAAGCCAAACAATACG-3'
NOS2	NM-010927	5'-CTGGAGTTCTGGATGAG-3'	5'-CTGAGGGCTGACACAAGG-3'

طراحی پرایمر با استفاده از نرم‌افزار Allele ID7 و با توجه به نقطه اتصال اگزون‌ها برای ژن کنترل داخلی و ژن‌های مورد آزمایش با توجه به توالی *Mus musculus* صورت گرفت.

آنالیز آماری

برای آنالیز داده‌ها از بسته نرم‌افزاری SPSS استفاده شد. آزمایش‌ها به صورت بلوک‌های تصادفی با سه تکرار صورت گرفتند و به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شدند. سطوح معنی‌داری بین تیمارها هم بوسیله آزمون دانکن و در سطح $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

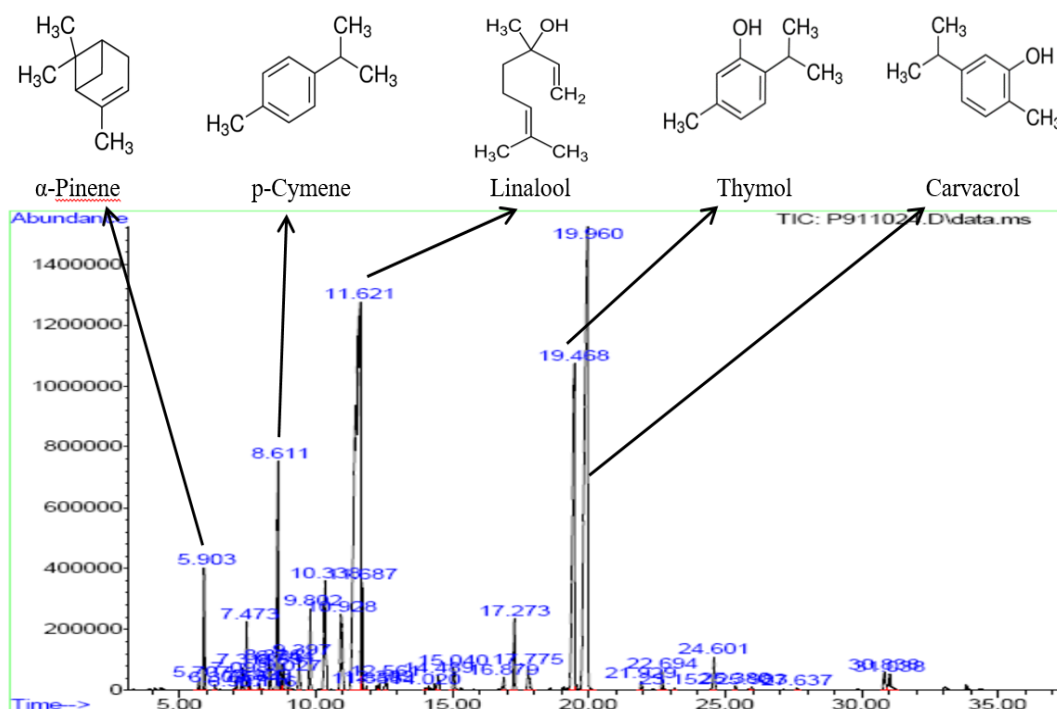
ترکیب شیمیایی اسانس آویشن

ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی لینالوول (۳۲/۹ درصد)، کارواکرول (۲۶/۷ درصد)، تیمول (۱۲/۵ درصد)، پاراسیمن (۴/۵ درصد) و الفا-

پینن (۲ درصد) می‌باشند (شکل ۲). نتایج آزمایش‌ها ما با گزارش‌ها قبلی که توسط سایر نویسندگان منتشر شده است همخوانی دارد؛ گرچه تفاوت‌هایی از نظر کمی و کیفی در ترکیبات تشکیل‌دهنده وجود دارد (۱۳). تفاوت ترکیبات شیمیایی به ژنتیک، مرحله رشدی، فصل جمع‌آوری گیاه و نحوه آماده‌سازی اسانس بستگی دارد. اسانس آویشن شیرازی به طور عمده حاوی ترکیبات فنلی (۱۹۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) مانند تیمول و کارواکرول یا مشتقات آن‌هاست. جهت سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی این مقدار به غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر رقیق شد. ترکیبات فنلی گیاهان ترکیباتی با

می‌کنند. بر این اساس، محتوای فنل کل اسانس آویشن دلیل مهمی مبنی بر انتقال اتم هیدروژن و انتقال تک الکترون و در نتیجه توانایی آنتی‌اکسیدانی این ترکیب است (۶).

عملکردهای چندگانه هستند که می‌توانند هم به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های ابتدایی و هم حذف‌کنندگان رادیکال‌های آزاد فعالیت نمایند. این ترکیبات در مهار رادیکال‌ها، دهنده اتم هیدروژن، دهنده تک الکترون، دفع‌کننده اکسیژن فعال و کلات کننده فلزات فعالیت



شکل ۲. نمودار کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی اسانس آویشن شیرازی.

ترکیبات اصلی اسانس آویشن لینالول (۳۳ درصد)، کارواکرول (۲۶/۷ درصد)، تیمول (۱۲/۵ درصد)، پاراسیم (۴/۵ درصد) و الف-پینن (۲ درصد) هستند.

سیتو توکسیسیتی اسانس آویشن

به نشت کاتیون‌هایی مانند کلسیم می‌شود. نشت کلسیم سلول‌ها را به سمت آپوپتوز و نکروز می‌برد (۱۴). از سوی دیگر، اجزای فنلی اسانس می‌توانند توسط گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن یا زنجیره انتقال الکترونی میتوکندری یا برخی از فلزات سنگین اکسید شوند و به این ترتیب گونه‌های رادیکال اضافی مانند رادیکال فنوکسیل تولید کنند که قادر به اکسیداسیون لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA هستند و ممکن است منجر به آپوپتوز و یا نکروز گردند. اگر غلظت‌های اسانس برای نفوذ به غشاهای میتوکندری بسیار کم باشد، تبدیل آن‌ها

نتایج حاصل از MTT نشان داد که اسانس آویشن در حالت وابسته به غلظت از زنده ماندن ماکروفاژها جلوگیری می‌کند و در غلظت‌های بالاتر از ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر به شدت باعث کاهش قدرت بقای ماکروفاژها می‌شود. فعالیت سیتوتوکسیک اسانس ممکن است به ماهیت لیپوفیلی اسانس مرتبط باشد. این ترکیبات لیپوفیل می‌توانند به غشاهای سیتوپلاسمی وارد شوند و باعث افزایش سیالیت غشا گردند. جابجایی اسانس بین زنجیره اسید چرب فسفولیپید و گلیکولیپید موجب افزایش سیالیت و نفوذپذیری غشا شده و منجر

معنی‌داری بر تولید ROS در ماکروفاژها ندارد (۷). تحریک ماکروفاژها بوسیله LPS منجر به افزایش تولید ROS می‌گردد و اسانس آویشن باعث کاهش معنی‌دار تولید ROS در ماکروفاژهای تحریک‌شده با LPS می‌شود (جدول ۲). کاهش قابل توجه سطح بیان ام آر ان آ ژن NOX در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر اسانس آویشن در سلول‌های تیمار شده با LPS مشاهده شد. این کاهش ممکن است به دلیل تأثیر مهاری اسانس آویشن بر تشکیل یا القای ام آر ان آ ژن NOX و تولید آنیون سوپراکسید باشد (جدول ۲).

به پرواکسیدانت رخ نمی‌دهد و در نهایت آنتی‌اکسیدان‌ها فعالیت خود را حفظ می‌کنند. در مقابل، در غلظت‌های بالا آن‌ها به میتوکندری‌ها آسیب می‌رسانند و می‌توانند به آن نفوذ کنند، همچنین می‌توانند به پرواکسیدانت‌ها اکسید شوند و در نتیجه موجب آسیب به DNA، پروتئین و مرگ سلولی گردند (۱۵).

حذف آنیون‌های سوپراکسید و مهار بیان NOX بر اساس مطالعات خارج سلولی، وابستگی به غلظت در فعالیت جاروب‌کنندگی اسانس آویشن با IC50 برابر ۷۷ میکروگرم/میلی‌لیتر مشاهده شد (۶). بررسی‌های داخل سلولی نشان داد که اسانس آویشن هیچ تأثیر

جدول ۲. اثر اسانس آویشن بر تولید سوپراکسید و بیان ژن‌های NOX در ماکروفاژهای تحریک‌شده با LPS

NOX p67	NOX p47	NOX p40	NOX p22	سوپراکسید (شدت فلورسانس)	نمونه
۱/۰ ± ۰/۳ ^d	۱/۰ ± ۰/۵ ^d	۱/۰ ± ۰/۳ ^d	۱/۰ ± ۰/۴ ^d	۱۸۳۳۰ ± ۵۵۰ ^b	کنترل
۲۵ ± ۲/۵ ^a	۴۲ ± ۲/۵ ^a	۱۷ ± ۲/۵ ^a	۲۶ ± ۲/۰ ^a	۳۶۲۲۲ ± ۳۰۰۰ ^a	لیپوپلی ساکارید
۱۳ ± ۲/۳ ^b	۲۲ ± ۲/۳ ^b	۸/۰ ± ۱/۶ ^b	۱۵ ± ۱/۸ ^b	۲۰۲۹۶ ± ۹۰۰ ^b	لیپوپلی ساکارید + اسانس (پنج میلی‌گرم در لیتر)
۶/۰ ± ۱/۳ ^c	۹/۰ ± ۱/۸ ^c	۴/۰ ± ۱/۰ ^c	۶/۰ ± ۱/۵ ^c	۲۱۴۰۰ ± ۱۲۰۰ ^b	لیپوپلی ساکارید + اسانس (ده میلی‌گرم در لیتر)
داده‌ها بصورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شده‌اند. حروف مختلف در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری نمونه‌ها در سطح ۰/۰۵ بر اساس آزمون دانکن است. حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت غیر معنی‌دار بین نمونه‌ها است.					

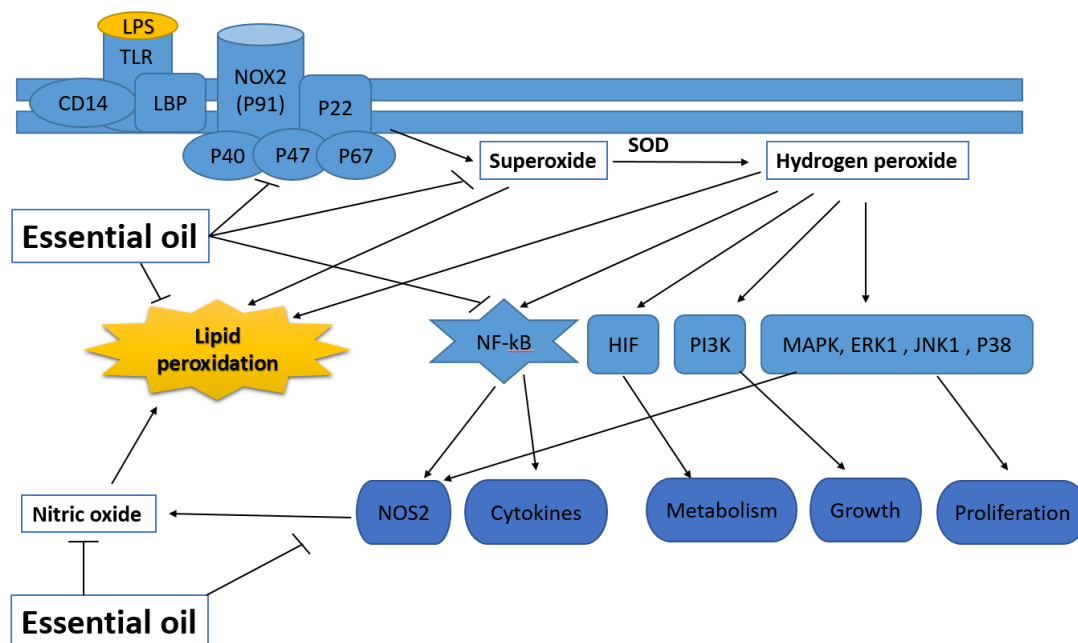
(JNK) را فعال نماید (۱۷). کینازها در نهایت باعث فعال شدن NF-κB می‌شود که خود تولید سایر پروتئین‌ها را از قبیل ایتنرلوکین ۶، ایتنرلوکین ۸، ایتنرلوکین ۱۷، ایتنرلوکین ۲۲، سیکلواکسیژناز ۲ و iNOS تحریک می‌کند. مولکول پراکسید هیدروژن به طور مستقیم هم می‌تواند فاکتور نسخه‌برداری NF-κB را فعال کند؛ بنابراین سوپر اکسید می‌تواند باعث تولید نیتریک اکسید و در نهایت سایر گونه‌های فعال اکسیژن و نیترژن شود (شکل ۳). همان‌طور که در جدول ۲ آمده است، ماکروفاژها در حالت عادی بیان کمی از ژن‌های NOX p67phox، NOX p47phox، NOX p40phox، NOX p22phox را دارا هستند و میزان سوپر اکسید در آن‌ها پایین است. درحالی‌که در حضور LPS بیان این ژن‌ها و میزان تولید سوپراکسید افزایش معناداری (P ≤ 0/05) را

در سلول‌های ماکروفاژی، تولید آنیون سوپراکسید تحت کنترل ژن NOX است. این کمپلکس آنزیمی مولتی پروتئینی شامل چند زیرواحد از قبیل gp91phox، gp47phox، gp40phox، gp22phox، gp67phox است که به غشای سلولی متصل می‌شوند تا آنزیم فعال شود. فعال شدن NOX بوسیله LPS منجر به تبدیل اکسیژن مولکولی به آنیون سوپراکسید از طریق انتقال یک الکترون از NADPH می‌شود (۱۶). LPS به گیرنده‌های toll-like (TLR-4) متصل و باعث فعال شدن زیرواحد gp91phox از NOX و تولید سوپراکسید می‌گردد. سوپراکسید یا هیدروژن پراکسید (مشتق شده از سوپراکسید بوسیله فعالیت سوپراکسید دیسموتاز) می‌تواند کینازهایی مانند extracellular-signal، P38 mitogen activated protein kinase و regulated kinase (ERK) و c-Jun N-terminal protein kinase

نشان داده است. در صورتی که اضافه کردن امولسیون اسانس به ماکروفاژهای تحریک شده با LPS به طور معناداری ($P \leq 0/05$) بیان این ژن‌ها و میزان سوپراکسید آنیون را کاهش داده است؛ اما در حقیقت مکانیسم دقیق اسانس‌ها در مهار تولید سوپراکسید در ماکروفاژهای تحریک شده ناشناخته است. اسانس‌ها ترکیبات لیپوفیلی هستند که از طریق غشای سلولی می‌توانند وارد سلول شوند. اسپکتروسکوپی رنگ تابی دورانی، نور فرابنفش و فلورسانس نشان داد که اسانس آویشن از طریق درج شدن با DNA برهم‌کنش دارد. تغییر در طیف فرابنفش DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر بوسیله اضافه کردن اسانس آویشن نشان‌دهنده این است که اسانس تغییر کانفورماسیونی در ساختار DNA از طریق تشکیل کمپلکس DNA-اسانس القا می‌کند که در نهایت باعث دفورماسیون DNA می‌گردد. طیف فلورسانس و رنگ تابی دورانی، ورود اسانس را به دابل هلیکس DNA تایید می‌کند (۱۸). بر همین اساس، تأثیرات تنظیمی اسانس بر بیان برخی از ژن‌ها ممکن است در اثر تغییرات اپی ژنتیک باشد.

اثر مهارتی برخی اسانس‌ها بر بیان ژن NOX و فعالیت آن در مطالعات دیگر نیز به اثبات رسیده است. اسانس ریحان سبز با نام علمی *Ocimum basilicum* عمدتاً از متیل چاویکول، ژرانیال و نرال تشکیل شده و باعث کاهش معنی‌دار بیان NOX در ماکروفاژهای موشی تحریک شده با LPS در غلظت‌های غیر سمی می‌شود (۱۹). اسانس آویشن غنی از کارواکرول، تیمول و پارا-سیمن، بیان NOX را در ماکروفاژهای تحریک شده با LPS به طور قابل توجهی کم می‌کند (۲۰). اسانس جعفری معطر با نام

علمی *Tagetes minuta* که به طور عمده از دهیدروتاژتون، اسیمن و تاژتون تشکیل شده هم بیان NOX را تنزل می‌دهد (۲۱). آپوسینین که از *Picrorria kurroa* گرفته شده یک ترکیب فنلی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی است که از تولید سوپراکسید جلوگیری می‌کند و NOX را در نوتروفیل مهار می‌کند. این تأثیر مهارتی ممکن است که به فعالیت آنتی‌اکسیدانی آپوسینین مرتبط باشد (۲۲). بربرین که یک آلکالوئید گیاهی است در غلظت‌های غیر سمی تولید سوپراکسید را در ماکروفاژهای تحریک شده با LPS با کاهش بیان NOX کم می‌کند (۲۳). اسانس *Melaleuca alternifolia* (روغن درخت چای) و ترکیبات آن مانند ترپنین-۴-ال، آلفا-ترپینئول و ۱-۸-سینئول تولید سوپراکسید را در ماکروفاژها و نه در نوتروفیل‌ها جلوگیری می‌کند (۲۴). تأثیرات مهارتی پلامباجین (نفتاکوینون برگرفته از گیاه دارویی) بر مهارت NOX هم گزارش شده است (۲۵). فعالیت حذف‌کنندگی رادیکال‌های سوپراکسید نقش مثبت اسانس آویشن را در کاهش تخریب بافت‌های بیولوژیکی و یا اثر حفاظتی آن را روی بافت‌ها در تنش‌های اکسیداتیو بوسیله رادیکال هیدروکسیل مشتق شده از آنیون سوپراکسید نشان داده است. با توجه به نتایج مطالعه حاضر، اسانس آویشن قادر به کاهش بیان اجزای کلیدی NOX می‌شود. مهارت بیان NOX در ماکروفاژها نشان‌دهنده توانایی اسانس آویشن در حذف سوپراکسید و واکنش‌های اکسیداتیو است و شواهد زیادی فراهم آورد که این گیاه خصوصیات آنتی‌اکسیدان زیادی را به نمایش می‌گذارد.



شکل ۳. شبکه انتقال پیام لیپوپولی ساکارید و بیان ژن‌های NADH اکسیداز (NOX) و نیتریک اکسید سنتاز (NOS) و تولید سوپر اکسید و نیتریک اکسید.

لیپوپولی ساکارید به گیرنده تول (TLR) متصل می‌شود و باعث فعال‌شده آنزیم NADH اکسیداز می‌شود. این آنزیم باعث تولید رادیکال سوپر اکسید می‌شود. هرچند این رادیکال می‌تواند اثرات تخریبی متعددی داشته باشد، اما به نظر می‌رسد اثرات پیام‌رسانی آن از طریق تولید پراکسید هیدروژن توسط آنزیم سوپر اکسی دیسموتاز (SOD) انجام می‌گیرد. پراکسید هیدروژن به عنوان یک پیام‌آور ثانویه عمل می‌کند و باعث فعال شدن فاکتورهای نسخه‌برداری مختلف مانند NF-kB می‌شود. این فاکتور نسخه‌برداری باعث افزایش بیان آنزیم نیتریک اکسید سنتاز و در افزایش تولید نیتریک اکسید می‌شود. هرچند آنزیم نیتریک اکسید سنتاز می‌تواند مستقیماً توسط لیپوپولی ساکارید القاء شود اما به نظر می‌رسد مسیر اصلی تحریک آن القاء توسط پراکسید هیدروژن است؛ بنابراین رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌توانند باعث القاء رادیکال‌های فعال نیتروزن شوند. اسانس آویشن شیرازی به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی با مهار بیان ژن‌های NADH اکسیداز و نیتریک اکسید سنتاز و در نهایت حذف رادیکال‌های سوپراکسید و نیتریک اکسید اثرات آنتی‌اکسیدانی خود را به نمایش می‌گذارد.

مهار نیتریک اکسید و کاهش بیان NOS

تجزیه و تحلیل نتایج خارج سلولی نشان داد که اسانس آویشن فعالیت حذف نیتریک اکسید وابسته به غلظت را با IC50 برابر با ۹۶ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان می‌دهد. بررسی‌ها نشان داد که اسانس آویشن هیچ تأثیر قابل‌توجهی در تولید NO در ماکروفاژها نداشت. در ماکروفاژهای تحریک‌شده با LPS تولید NO زیاد شد و اسانس آویشن تولید NO در ماکروفاژهای تحریک‌شده با LPS را بطور قابل‌توجهی کاهش داد (جدول ۳). تحریک ماکروفاژها با LPS باعث ازدیاد بیان ام آر آن آ NOS

می‌گردد. اسانس آویشن در غلظت ۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، بیان ام آر آن آ NOS را در ماکروفاژهای تحت تیمار با LPS کاهش می‌دهد (جدول ۳). در این مورد هم LPS به گیرنده toll-like 4 (TLR-4) متصل می‌شود و سپس مپکینازهایی مانند: P38 mitogen activated protein kinase (ERK) extracellular-signal regulated kinase و c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) را فعال می‌کند و مپکینازها در نهایت NK-kB را فعال می‌کنند که خودش باعث تحریک بیان NOS و تولید NO می‌شود؛ بنابراین

فعال شدن نیتریک اکسید سنتاز و تولید نیتریک اکسید نه تنها مستقیماً توسط LPS و فعال شدن فاکتور نسخه‌برداری NK-KB صورت می‌گیرد، پراکسید هیدروژن تولید شده در اثر سوپر اکسید هم می‌تواند باعث فعال شده مسیر تولید نیتریک اکسید شود (۲۶). در گزارش‌هایی فعالیت مهاری مواد مشتق شده از گیاهان بر بیان NOS بیان شده؛ مثلاً اسانس حاصل از گیاه جعفری معطر در غلظت های ۱-۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر و اسانس حاصل از آویشن در ماکروفاژهای تیمار شده با LPS بیان NOS را تنزل داده است (۲۰، ۱۹). همچنین اسانس فرار گیاه *Houttuynia cordata* از تولید NO بوسیله کاهش تنظیم بیان NOS جلوگیری کرده است (۳۲). مخلوط عصاره گیاهان *Cinnamomi Ramulus*، *Anemarrhenae*

فعال شدن نیتریک اکسید سنتاز و تولید نیتریک اکسید نه تنها مستقیماً توسط LPS و فعال شدن فاکتور نسخه‌برداری NK-KB صورت می‌گیرد، پراکسید هیدروژن تولید شده در اثر سوپر اکسید هم می‌تواند باعث فعال شده مسیر تولید نیتریک اکسید شود (۲۶). در گزارش‌هایی فعالیت مهاری مواد مشتق شده از گیاهان بر بیان NOS بیان شده؛ مثلاً اسانس حاصل از گیاه جعفری معطر در غلظت های ۱-۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر و اسانس حاصل از آویشن در ماکروفاژهای تیمار شده با LPS بیان NOS را تنزل داده است (۲۰، ۱۹). همچنین اسانس فرار گیاه *Houttuynia cordata* از تولید NO بوسیله کاهش تنظیم بیان NOS جلوگیری کرده است (۳۲). مخلوط عصاره گیاهان *Cinnamomi Ramulus*، *Anemarrhenae*

جدول ۳. اثر اسانس آویشن بر تولید نیتریک اکسید و بیان NOS در ماکروفاژهای تحریک شده با LPS

جدول ۳: اثر اسانس آویشن بر تولید نیتریک اکسید و بیان NOS در ماکروفاژهای تحریک شده با LPS		
NOS	NO (μM)	نمونه
۱/۰ ± ۰/۳ ^d	۲۶ ± ۲/۳ ^b	کنترل
۲۸ ± ۱/۶ ^a	۵۰ ± ۲/۸ ^a	لیپوپلی ساکارید
۱۱ ± ۲/۲ ^b	۲۷ ± ۲/۲ ^b	لیپوپلی ساکارید + اسانس (پنج میلی گرم در لیتر)
۵/۰ ± ۱/۴ ^c	۳۲ ± ۳/۴ ^b	لیپوپلی ساکارید + اسانس (ده میلی گرم در لیتر)

داده‌ها بصورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شده‌اند. حروف مختلف در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری نمونه‌ها در سطح ۰/۰۵ بر اساس آزمون دانکن است. حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت غیر معنی‌دار بین نمونه‌ها است.

نتیجه‌گیری

با در نظر گرفتن این یافته‌ها، اصلی‌ترین جز تشکیل‌دهنده اسانس آویشن مونوترپن های فنلی (تیمول و کارواکرول) و مونوترپن های هیدروکربنی (لینالول، سیمن و ترپینن) هستند. اسانس آویشن در ماکروفاژهای تحریک شده با LPS با جلوگیری از بیان ژن‌های NOX و NOS و کاهش میزان تولید سوپراکسید و نیتریک اکسید فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود را نشان داد. با این وجود،

مطالعات بیشتری برای درک بهتر و مکانیسم مولکولی اسانس آویشن در کاهش تنظیم ژن‌های NOX و NOS یا سایر ژن‌های دفاعی لازم است.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر با حمایت مالی دانشگاه شیراز (پژوهانه شماره 88-GR-AGRST-108) انجام شده است.

منابع

- Carocho M, Ferreira IC. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 51:15-25.
- Oswald MC, Garnham N, Sweeney ST, Landgraf M. Regulation of neuronal development and function by ROS. *FEBS letters* 2018; 10.1002/1873-3468.12972.

3. Alzoghaibi MA. Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 2013; 19(39):6540-47.
4. Weigert A, von Knethen A, Fuhrmann D, Dehne N, Brüne B. Redox-signals and macrophage biology (for the upcoming issue of molecular aspects of medicine on signaling by reactive oxygen species). *Molecular aspects of medicine* 2018.
5. Carini F, Mazzola M, Rappa F, Jurjus A, Geagea AG, Al Kattar S, Bou-Assi T, Jurjus R, Damiani P, Leone A, Tomasello G. Colorectal carcinogenesis: Role of oxidative stress and antioxidants. *Anticancer Research* 2017; 37(9):4759-66.
6. El Asbahani A, Miladi K, Badri W, Sala M, Addi EA, Casabianca H, El Mousadik A, Hartmann D, Jilale A, Renaud FN, Elaissari A. Essential oils: from extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics* 2015; 483(1-2):220-43.
7. Raut JS, Karuppayil SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products* 2014; 62:250-64.
8. Rodríguez J, Martín MJ, Ruiz MA, Clares B. Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. *Food Research International* 2016; 83:41-59.
9. Munir M, Hanif M, Ranjha NM. Dendrimers and their applications: a review article. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Research* 2016; 2(1):55-66.
10. Adams RP. Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy. Academic Press 2012.
11. Schmölz L, Wallert M, Lorkowski S. Optimized incubation regime for nitric oxide measurements in murine macrophages using the Griess assay. *Journal of Immunological Methods* 2017; 449:68-70.
12. Bognar E, Sarszegi Z, Szabo A, Debreceni B, Kalman N, Tucsek Z, Sumegi B, Gallyas Jr F. Antioxidant and anti-inflammatory effects in RAW264. 7 macrophages of malvidin, a major red wine polyphenol. *PLoS One* 2013; 8(6):e65355.
13. Sadeghi H, Robati Z, Saharkhiz MJ. Variability in *Zataria multiflora* Bioss. Essential oil of twelve populations from Fars province, Iran. *Industrial Crops and Products* 2015; 67:221-6.
14. Ullah MF, Shamim U, Hanif S, Azmi AS, Hadi SM. Cellular DNA breakage by soy isoflavone genistein and its methylated structural analogue biochanin A. *Molecular Nutrition & Food Research* 2009; 53(11):1376-85.
15. Hirst D, Robson T. Targeting nitric oxide for cancer therapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2007; 59(1):3-13.
16. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews* 2007;87(1):245-313.
17. More P, Pai K. In vitro NADH-oxidase, NADPH-oxidase and myeloperoxidase activity of macrophages after *Tinospora cordifolia* (guduchi) treatment. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 2012;34(3):368-72.
18. Salehi F, Behboudi H, Kavooosi G, Ardestani SK. Monitoring ZEO apoptotic potential in 2D and 3D cell cultures and associated spectroscopic evidence on mode of interaction with DNA. *Scientific Reports* 2017; 7(1):2553.
19. Kavooosi G, Amirghofran Z. Chemical composition, radical scavenging and anti-oxidant capacity of *Ocimum Basilicum* essential oil. *Journal of Essential Oil Research* 2017; 29(2):189-99.
20. Kavooosi G, Teixeira da Silva JA, Saharkhiz MJ. Inhibitory effects of *Zataria multiflora* essential oil and its main components on nitric oxide and hydrogen peroxide production in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2012; 64(10):1491-500.
21. Karimian P, Kavooosi G, Amirghofran Z. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Tagetes minuta* essential oil in activated macrophages. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2014; 4(3):219-27.
22. Kleniewska P, Piechota A, Skibska B, Gorąca A. The NADPH oxidase family and its inhibitors. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 2012;60(4):277-94.
23. Sarna LK, Wu N, Hwang SY, Siow YL, O K. Berberine inhibits NADPH oxidase mediated superoxide anion production in macrophages. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 2010; 88(3):369-78.
24. Brand C, Ferrante A, Prager RH, Riley TV, Carson CF, Finlay-Jones JJ, Hart PH. The water-soluble components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) suppress the production of superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated in vitro. *Inflammation Research* 2001; 50(4):213-9.
25. Ding Y, Chen ZJ, Liu S, Che D, Vetter M, Chang CH. Inhibition of Nox-4 activity by

- plumbagin, a plant-derived bioactive naphthoquinone. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2005; 57(1):111-6.
26. Billack B. Macrophage activation: role of toll-like receptors, nitric oxide, and nuclear factor kappa B. *American Journal of Pharmaceutical Education* 2006; 70(5):102.
27. Li W, Fan T, Zhang Y, Fan T, Zhou P, Niu X, He L. *Houttuynia cordata* Thunb. Volatile Oil Exhibited Anti-inflammatory Effects In Vivo and Inhibited Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor- α Production in LPS-stimulated Mouse Peritoneal Macrophages In Vitro. *Phytotherapy Research* 2013; 27(11):1629-39.
28. Jeong MY, Lee JS, Lee JD, Kim NJ, Kim JW, Lim S. A combined extract of *Cinnamomi Ramulus*, *Anemarrhenae Rhizoma* and *Alpiniae Officinari Rhizoma* suppresses production of nitric oxide by inhibiting NF- κ B activation in RAW 264.7 cells. *Phytotherapy Research*. 2008; 22(6):772-7.
29. Seo HJ, Huh JE, Han JH, Jeong SJ, Jang J, Lee EO, Lee HJ, Lee HJ, Ahn KS, Kim SH. *Polygoni Rhizoma* Inhibits Inflammatory Response through Inactivation of Nuclear Factor-kappaB and Mitogen Activated Protein Kinase Signaling Pathways in RAW264. 7 Mouse Macrophage Cells. *Phytotherapy Research* 2012; 26(2):239-45.
30. Jaya A, Shanthi P, Sachdanandam P. Modulation of oxidative/nitrosative stress and mitochondrial protective effect of *Semecarpus anacardium* in diabetic rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2010; 62(4):507-13.

The effect of zataria essential oil on superoxide and nitric oxide production and NADH oxidase and nitric oxide synthase in macrophage cells

Maryam Aminizadeh, Gholamreza Kavooosi*

Institute of Biotechnology, Shiraz University, Shiraz, Iran.

* Corresponding author e-mail: ghkavoosi@shirazu.ac.ir.

Abstract

Objective: In this study, inhibitory effect of *Zataria multiflora* essential oil on superoxide and nitric oxide production and NADH oxidase (NOX) and nitric oxide synthase (NOS) expression was examined.

Materials and Methods: Zataria essential oil was obtained by hydro-distillation and chemical composition was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Superoxide and nitric oxide scavenging effects of zataria essential oil were tested by biochemical assays. Then, LPS-stimulated macrophages were treated by different concentrations of essential oil and expression of superoxide-producing enzyme and nitric oxide-producing enzyme was investigated by Real-time PCR, also superoxide anion and nitric oxide levels was examined by biochemical assays.

Results: The main components of the zataria essential oil were linalool (32.9%), carvacrol (26.7%), thymol (12.5%), p-Cymene (4.5%) and α -Pinene (2%). Zataria essential oil sequestered superoxide anion (O_2^-) and nitric oxide (NO) in *in vitro* assay at low concentrations of 70-100 μ g/ml. Zataria essential oil at non-cytotoxic level strongly reduced intracellular reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) production in LPS-stimulated macrophages. Superoxide-producing enzyme and NO producing enzyme expression in LPS-stimulated murine macrophage (cell line J774) was declined by zataria essential oil.

Conclusion: Due to the results, the *in vivo* antioxidant activity of zataria essential oil may be attributed to down-production of NO and superoxide and also down-regulation of NOS and NOX expression.

Keywords: Nitric oxide, Superoxide anion, Nitric oxide synthase, NADH oxidase