

Anti-inflammatory Effect of Ethanolic Extract of *Euphorbia myrsinites* in Lipopolysaccharide-induced Septic Shock in Mice

Somayyeh Ahmadi Afshar¹,
Yaser.Jafari Khataylou²

¹ PhD Candidate in Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran

² Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

(Received August 21, 2019 ; Accepted December 29, 2019)

Abstract

Background and purpose: Many herbs including *Euphorbia* have immunomodulatory properties. The aim of this study was to evaluate the immunomodulatory effects of the ethanolic extract of *E.myrsinites*.

Materials and methods: In this experimental study, 40 Swiss albino male mice were randomly divided into 4 groups. Group A included healthy mice, group B was induced by lipopolysaccharide (LPS), group C received the ethanolic extract of *E.myrsinites* 7 days before LPS induction. Group D received the plant extract at the same time with LPS induction. Then, blood samples were collected (2 and 6 h after LPS induction) and IL-4, IL-10, TNF- α , and IFN- γ and nitric oxide production were evaluated.

Results: Two hours after LPS induction, the levels of IL-4 and IL-10 in groups C and D increased significantly and IFN- γ level decreased significantly compared to those in group B ($P=0.0425$). But, six hours after LPS induction, TNF- α level significantly increased in group B compared to that in groups C and D ($P=0.0473$), but IL-4 and IL-10 levels increased significantly in groups C and D compared to those in group B ($P=0.0411$). The levels of nitric oxide, 2 and 6 hours after LPS induction, significantly decreased in groups C and D compared to those in group B ($P=0.0421$).

Conclusion: *E.myrsinites* ethanolic extract has immunomodulatory effects and could be used as an effective drug in inflammatory diseases such as septic shock through reduced production of pro-inflammatory cytokines.

Keywords: *Euphorbia myrsinitis*, pro-inflammatory/anti-inflammatory cytokines, LPS, mice, nitric oxide

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 29 (181): 12-25 (Persian).

* Corresponding Author: Yaser.Jafari Khataylou- Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
(E-mail: y.jafari@tabrizu.ac.ir)

اثر ضد التهابی عصاره اتانولی گیاه فرفیون (*Myrsinites euphorbia*) در شوک سپتیک القاء شده با لیپوپلی ساکارید در موش های سوری

سمیه احمدی افشار¹یاسر جعفری خطایلو²

چکیده

سابقه و هدف: بسیاری از گیاهان دارای خواص ایمنومودولاتوری هستند که از این میان می توان جنس *Euphorbia* را به عنوان یک گیاه تعدیل کننده سیستم ایمنی نام برد. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات ضد التهابی عصاره اتانولی گیاه فرفیون (*E.myrsinites*) بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه ی تجربی، 40 موش نژاد Swiss albino به 4 گروه مساوی تقسیم شدند. گروه A (گروه کنترل)، گروه B (تحت تجویز با لیپوپلی ساکارید باکتریایی یا LPS) و گروه C (دریافت عصاره اتانولی گیاه *E.Myrsinites*، قبل از تجویز LPS) گروه D (دریافت عصاره اتانولی گیاه مورد نظر همراه با تجویز LPS). در نهایت از موش ها خونگیری شد (2 و 6 ساعت پس از تجویز LPS) و به بررسی سایتوکاین های $IFN-\gamma$ و $TNF-\alpha$ ، IL-4 و IL-10 و نیتریک اکساید پرداخته شد.

یافته ها: 2 ساعت بعد از تجویز LPS، میزان IL-4 و IL-10 در گروه C و D نسبت به گروه B افزایش معنی دار و میزان $IFN-\gamma$ در این گروه ها کاهش معنی دار داشت ($P=0/0425$)، اما 6 ساعت بعد از تجویز LPS، میزان $TNF-\alpha$ در گروه B نسبت به گروه C و D افزایش معنی دار داشت ($P=0/0473$) ولی در ارتباط با میزان IL-4 و IL-10 نتیجه عکس بود. سطح نیتریک اکساید، 2 و 6 ساعت پس از تجویز LPS، در موش های گروه C و D نسبت به گروه B کاهش معنی دار داشت ($P=0/0421$).
استنتاج: عصاره اتانولی گیاه *E.myrsinites* دارای اثرات تعدیل کننده سیستم ایمنی است و از طریق کاهش تولید سایتوکاین های پیش التهابی می تواند به عنوان داروی موثر در درمان بیماری های التهابی چون شوک سپتیک استفاده شود.

واژه های کلیدی: گیاه فرفیون، سایتوکاین های پیش التهابی / ضد التهابی، لیپو پلی ساکارید، موش، نیتریک اکساید.

مقدمه

به بدن راه یافته و در میزان تکثیر می شوند، LPS آن ها به داخل گردش خون آزاد شده و در خون توسط انواع مختلفی از سلول های در گردش تشخیص داده می شود که این امر موجب القاء سیتوکاین های پیش التهابی

لیپوپلی ساکارید باکتریایی (Lipopolysaccharides: LPS)، یک اندوتوکسین ضد التهابی است که در پوشش بیرونی همه باکتری های گرم منفی وجود دارد. هنگامی که باکتری های گرم منفی

E-mail: y.jafari@tabrizu.ac.ir

مؤلف مسئول: یاسر جعفری خطایلو- تبریز: دانشگاه تبریز، دانشکده دامپزشکی

1. دانشجوی دکتری ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

2. استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ تصویب: 1398/10/8

تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1398/6/3

تاریخ دریافت: 1398/5/30

وابسته به NF- κ B مانند TNF- α ، IL-1، پروستاگلاندین‌ها و اکسید نیتریک می‌شود (3-1) و این سیتوکاین‌ها و کموکاین‌ها پاسخ میزبان به عفونت باکتریایی را تقویت می‌کنند (4،5). با این حال آزادسازی بیش از حد سیتوکاین‌ها می‌تواند عواقب زیان‌آوری را برای بدن داشته باشد. به عنوان مثال، شوک سپتیک ناشی از LPS باعث تولید ذرات فعال اکسیژن (ROS) و اختلال عملکرد چندین ارگان می‌شود (2) که اختلال عملکرد در میکروکارد قلب علت اصلی مرگ و میر این موارد است (6). TNF- α اولین سیتوکاین تولید شده در مقادیر زیاد، در پاسخ به LPS می‌باشد و علت اصلی بسیاری از اثرات LPS نیز تولید همین سیتوکاین است (7،8). مطالعات اخیر نشان داده است که در طی شوک سپتیک و آسیب‌های مرتبط با آن، مقدار زیادی از سیتوکاین‌ها به ویژه TNF- α ، IL-1 β ، IFN- γ ، MCP1 و Cox-2 تولید می‌شود (6). از جمله مولکول‌های واسطه موثر دیگر تولید نیتریک اکساید توسط نیتریک اکساید سنتتاز است که در شرایط پاتولوژیک از جمله اندوتوکسمی ایجاد می‌شود و باعث عوارض مختلف از جمله نقص گردش خون، کاهش فشارخون و شوک سپتیک می‌شود (7). با وجود پیشرفت‌های قابل توجه در درمان ضد میکروبی، مرگ و میر در سپسیس ناشی از LPS همچنان در حدود 40 درصد است که منعکس‌کننده گزینه‌های محدود درمان می‌باشد (8). امروزه مطالعات مختلفی در مورد درمان شوک سپتیک صورت گرفته است (9،10). تعدیل پاسخ‌های ایمنی از طریق تحریک یا مهار کردن سیستم ایمنی به بهبود وضعیت بیماری کمک می‌کند و داروهایی که باعث تحریک یا مهار سیستم ایمنی در مدل‌های تجربی بیماری‌ها می‌شوند مواد تعدیل‌گر سیستم ایمنی یا ایمونومدولاتور نامیده می‌شوند، از سویی این مواد می‌توانند مکانیسم‌های دفاعی میزبان را در زمان نقص سیستم ایمنی بهبود بخشند. این مواد شامل میوه‌ها، سبزیجات خام، جلبک‌ها و غیره هستند که خیلی بهتر از درمان‌های معمول شیمیایی عمل می‌کنند (1،2). مطالعات مختلف نشان

می‌دهد که محصولات طبیعی مانند گیاهان نقش مهمی در سلامتی انسان در پیشگیری و درمان شرایط التهابی دارند. از این جمله، محصولات حاصل از ترپنوئیدها (Terpenoids) هستند که در گیاهان، حشرات، میکروب‌ها و ارگانیزم‌های دریایی وجود دارند. این محصولات نقش‌های مختلفی از جمله اثرات ضد میکروبی، ضد التهابی و حتی ضد توموری دارند و مشخص شده است که عملکرد ترپنوئیدها و بسیاری از عصاره‌های گیاهی از طریق تأثیری است که در فعال‌سازی فاکتور نسخه‌برداری موثر در التهاب یا همان فاکتور نسخه‌برداری هسته‌ای کاپا B (NF- κ B) دارند. NF- κ B نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های التهابی و ایمنی دارد و نتایج حاصل از تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که محصولات حاصل از گیاهان از طریق همین فاکتور نسخه‌برداری و مهار فعال‌سازی آن می‌توانند در خیلی از بیماری‌ها نقش درمانی خود را ایفا کنند (3).

محصولات گیاهی از طریق القاء فعال‌سازی نوتروفیل، چسبندگی و مهاجرت آن هم می‌توانند نقش‌های ضد التهابی خود را ایفا کنند (4). از طرفی بسیاری از گیاهان از طریق تأثیرات آنتی‌اکسیدانی چه در درون‌تنی و چه در برون‌تنی نقش‌های ایمونومدولاتوری خود را نشان می‌دهند (5). از طرف دیگر برخی از محصولات گیاهی چه در درون‌تنی و چه در برون‌تنی از طریق تأثیراتی که در پروفاایل سایتوکاینی بدن دارند می‌توانند اثرات درمانی خود را اعمال کنند (9،10). امروزه تعدیل پاسخ‌های ایمنی توسط مواد بیواکتیو که منجر به بهبود وضعیت بسیاری از بیماری‌ها می‌شود از موضوعات جدید تحقیقی بسیاری از دانشمندان می‌باشد و در این راستا بسیاری از محققین به طور گسترده از محصولات گیاهی که دارای خواص تعدیل‌کننده سیستم ایمنی می‌باشند استفاده می‌کنند (11-13). از میان گیاهان تعدیل‌کننده سیستم ایمنی جنس *Euphorbia* (که شامل بیش از 91 گونه است) وجود دارند که عصاره حاصل از این گیاه دارای فعالیت‌های بیولوژیکی

مواد و روش ها

عصاره گیری از گیاه

در این مطالعه ی تجربی *Euphorbia myrsinites* از اطراف شهر مراغه در ایران جمع آوری شد و در هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تأیید شد (Voucher Number #8512). بخش هوایی *E. myrsinites* به خوبی شسته شده و در سایه خشک شد. برای عصاره گیری از اتانول 96 درجه استفاده شد. 25 گرم خوشه خشک شده *E. myrsinites* در 250 میلی لیتر اتانول غوطه ور شده و در دمای اتاق به مدت 24 ساعت باقی ماند. عصاره از طریق کاغذ فیلتر Whatman No. 1 فیلتر گردید و در نهایت حلال به طور کامل از طریق تبخیر در خلاء حذف شد (23).

حیوانات مورد آزمایش

جمعیت مورد مطالعه، شامل موش های نر نژاد swiss albino با وزن 25-30 گرم بود که از مرکز نگهداری و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز خریداری شده و به طور تصادفی در 4 گروه تقسیم شدند (هر گروه شامل 10 سر موش). گروه A شامل 10 عدد موش سالم بود که فقط نرمال سالیन به آن ها تجویز شد. گروه B شامل 10 عدد موش هایی بود که تحت تجویز LPS (Sigma, Germany) با دوز 0/75 میلی گرم به ازای هر حیوان به صورت داخل صفاقی قرار گرفتند (22). گروه C شامل 10 عدد موش هایی بود که از 7 روز قبل از تجویز LPS هر 24 ساعت عصاره اتانولی گیاه *Euphorbia myrsinites* با دوز 5 میلی گرم به ازای هر حیوان (24) به صورت داخل صفاقی به آن ها تجویز شد. گروه D شامل 10 عدد موش هایی بود که عصاره اتانولی گیاه مورد نظر را همراه با تجویز LPS به تعداد چهار دوز هر 2 ساعت دریافت کردند. هر گروه از موش ها در قفس های مجزا و تمیز در اتاقی با دمای ثابت 25 درجه سانتی گراد و سیکل 12 ساعته روشنایی، تاریکی نگهداری می شدند و به مقدار کافی به آب و

و بیواکتیوی می باشد (14). با توجه به غلظت بالای ترکیبات ترپنوئید (terpenoid) در گیاهان خانواده *Euphorbiaceae* ممکن است برخی از گونه ها دارای خواص دارویی باشند که می تواند برای اهداف درمانی مورد بهره برداری قرار گیرند (15,9). گونه *Euphorbia myrsinites* (فرسیون) از این جنس، گیاه کوچکی است که در گذشته توسط بومیان مناطق شمالی و مرکزی ایران به عنوان گیاه دارویی استفاده می شده است (10) و محصولات حاصل از عصاره این گیاه فعالیت های ضد التهابی، بیواکتیوی و تعدیل کنندگی سیستم ایمنی را دارا می باشد. این گیاه و عصاره حاصل از آن در خیلی از حالت های التهابی و عفونی چه در درون تنی و چه در برون تنی می تواند اثرات ضد التهابی و درمانی داشته باشد (18,17,16,3) و این اثرات را از طریق کاهش تولید نیتریک اکساید (19) و کاهش بیان مولکول های چسبان بین سلولی و کاهش فعالیت فاکتور نسخه برداری NF- κ B (20) انجام می دهد. از دیگر فعالیت های ضد التهابی جنس *Euphorbia* تاثیراتی است که در پروفایل سایتوکاین ها دارد و می تواند باعث افزایش سایتوکاین های ضد التهابی مثل IL-4 و IL-5 و کاهش سایتوکاین های پیش التهابی مثل IFN- γ و TNF- α در سرم موش های مبتلا به شوک سپتیک تحت تجویز با عصاره اتانولی این گیاه شود (21). از حالت های التهابی که می توان اثرات ایمونومدولاتوری عصاره گیاه را در آن بررسی کرد، التهاب ایجاد شده توسط تجویز لیپوپلی ساکارید (LPS) به موش های آزمایشگاهی می باشد. تحقیقات نشان می دهد تجویز LPS به صورت داخل صفاقی در موش ها باعث افزایش سایتوکاین های پیش التهابی و کاهش سایتوکاین های ضد التهابی می شود (22). لذا هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثرات ایمونومدولاتوری عصاره گیاه مورد نظر از طریق بررسی میزان سایتوکاین های التهابی و ضد التهابی و میزان تولید نیتریک اکساید در سرم خون موش های تحت تجویز با LPS، می باشد.

غذا دسترسی داشتند. مطالعات انجام گرفته بر روی موش‌ها تحت تایید کمیته اخلاق دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز می‌باشد (کد D/R-110-2016).

خون‌گیری از موش‌ها

خون‌گیری از ورید دمی موش‌های مقید شده با استفاده از سرنگ انسولینی 2 و 6 ساعت بعد از تجویز LPS انجام شد و میزان سایتوکاین‌های $TNF-\alpha$ ، $IL-4$ ، $IL-10$ موجود در نمونه‌های سرم خون موش‌ها با استفاده از کیت تجزیه الیزا (Bender Med Co., Austria)، اندازه‌گیری شد.

سنجش سایتوکاین‌ها در سرم

سنجش هر یک از سایتوکاین‌های $TNF-\alpha$ ، $IFN-\gamma$ ، $IL-4$ ، $IL-10$ به صورت جداگانه و به شیوه الیزای ساندویچی صورت گرفت که به دلیل مشابهت فرآیند کار به صورت یکجا توضیح داده می‌شود. قبل از آغاز کار، لازم بود که برخی از محلول‌ها به شرح زیر تهیه شود:

الف) بافر شست و شو (20X): قبل از شروع کار با استفاده از آب دیونیزه محلول 1X آن تهیه شد.

ب) بافر سنجش (Assay buffer): استوک آن همانند بافر قبلی به صورت 20X بوده که با استفاده از آب دیونیزه محلول 1X آن تهیه شد.

ج) پادتن ثانویه کنژوگه با بیوتین که قبل از مصرف به نسبت 1 به 100 با Assay buffer رقیق می‌گردد.

د) کنژوگه استرپ آویدین به آنزیم پراکسیداز ترب کوهی (HRP) که همانند مرحله (ج) آماده می‌شود.

1- برای هر نمونه دو خانه در نظر گرفته شد و یک جفت خانه به عنوان شاهد Blank و هفت جفت خانه نیز برای نمونه استاندارد در نظر گرفته شد. در ابتدا چاهک‌های پلیت دو بار با بافر شست و شو و هر بار با حجم تقریبی 400 μ l، شسته شدند. قبل از برگرداندن و تخلیه پلیت‌ها به مدت 10 تا 15 ثانیه فرصت داده شد و سپس با دستمال کاغذی آب اضافی پلیت گرفته شد.

2- رقت‌های استاندارد در ارتباط با سنجش هر یک از سایتوکاین‌ها، در چاهک‌های در نظر گرفته تهیه شد. بدین منظور به کلیه هفت جفت چاهک در نظر گرفته شده 225 μ l از رقیق‌کننده نمونه (sample diluents) افزوده شد. از محلول استوک استاندارد سایتوکاین مد نظر، 225 μ l به هر یک چاهک‌های اول افزوده شده و خوب با محتوی چاهک چندین بار مخلوط شد. سپس 225 μ l از این مخلوط به چاهک دوم افزوده و کار به همین صورت ادامه یافت تا در نهایت از چاهک هفتم 225 μ l از مخلوط به دور ریخته شد.

3- نمونه‌های مورد آزمایش (مابع رویی کشت سلول‌های طحالی)، به میزان 50 μ l به چاهک‌های مورد نظر افزوده شد. به دنبال آن به هر کدام از این چاهک‌ها بافر رقیق‌کننده به میزان 50 μ l اضافه شد و با نمونه مورد آزمایش مخلوط گردید. به چاهک‌های مربوط به بلانک 100 μ l بافر رقیق‌کننده اضافه شد.

4- در مرحله بعد به همه چاهک‌ها 50 μ l از پادتن ثانویه کنژوگه با بیوتین (1X) اضافه شد، سپس سطح پلیت‌ها پوشانیده شد و به مدت 2 ساعت در حرارت اتاق انکوبه گردیدند.

5- پس از طی این مدت پلیت‌ها سه بار همانند مرحله اول با بافر شست‌شو شسته شدند.

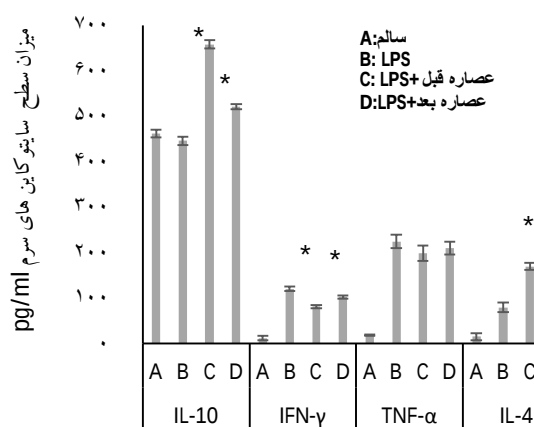
6- به کلیه چاهک‌ها 100 μ l از محلول استرپ آویدین (X1 HRP) اضافه شد و پس از پوشانیدن سطح پلیت‌ها به مدت یک ساعت دیگر در حرارت اتاق انکوبه شدند.

7- همانند مرحله اول پلیت‌ها سه بار شسته شده و بلافاصله به آن‌ها 100 μ l از سوبسترای آنزیم HRP (تترا متیل بنزیدین، TMB) افزوده شد. بار دیگر سطح پلیت‌ها پوشیده شد و به حدود ده دقیقه در حرارت اتاق انکوبه شدند. شدت رنگ ایجاد شده در طول موج 620nm توسط الیزا نگار ارزیابی شده و به محض این که استاندارد شماره 1، جذب نوری در حد 0/9 الی 0/95 را نشان داد، ادامه واکنش توسط افزودن 100 μ l از

یافته ها

تغییرات سطح هر یک از سایتوکاین ها 2 ساعت بعد از تجویز LPS

ارزیابی سطح $\text{IFN-}\gamma$ در سرم خون گرفته شده در 2 ساعت پس از تجویز LPS نشان داد که میزان سطح این سایتوکاین در موش های گروه B نسبت به موش های گروه C و D افزایش داشته که این تغییرات معنی دار بوده است ($P=0/0432$). در ارتباط با $\text{TNF-}\alpha$ نیز نتیجه به همین ترتیب بوده ولی تغییرات معنی دار نبوده است. ارزیابی سطح IL-4 در سرم خون گرفته شده بعد از 2 ساعت نشان داد که میزان سطح سایتوکاین IL-4 در موش های گروه تحت درمان نسبت به گروه B افزایش معنی دار داشته ($P=0/0471$) و در گروه C نسبت به گروه D این افزایش به طور معنی دار بیش تر بوده است ($P=0/0411$). ارزیابی سطح IL-10 نیز نشان داد که میزان سطح این سایتوکاین در موش های گروه تحت درمان نسبت به گروه B افزایش معنی دار داشته ($P=0/0422$) و در گروه C نسبت به گروه D این افزایش به طور معنی دار بیش تر بوده است ($P=0/0451$) (نمودار شماره 1).



نمودار شماره 1: میزان سطح سایتوکاین ها در سرم خون موش ها 2 ساعت پس از تجویز LPS
(*) نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ($P < 0/05$) با گروه B

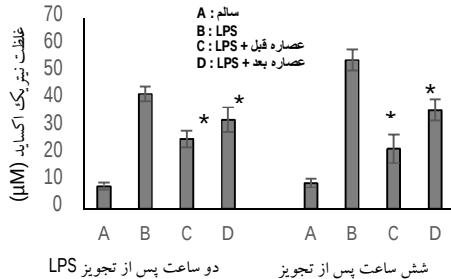
محلول 1مولار اسید فسفریک متوقف شد و بلافاصله پلیت ها توسط دستگاه الیزا نگار و با طول موج 450nm خوانده شد.

8- متوسط OD به دست آمده محاسبه و منحنی استاندارد بر روی کاغذ لگاریتمی رسم شد. به کمک منحنی استاندارد ترسیم شده مقدار هر یک از سایتوکاین های موجود در نمونه تعیین و به صورت pg/ml تعیین گردید. ملاک مورد نظر جهت اطمینان صحت کار عدم اختلاف بیش از 20 درصد هر یک از نمونه های مضاعف با میانگین محاسبه شده می باشد. لازم به ذکر است از آنجایی که در مرحله سوم نمونه مورد آزمایش به نسبت یک به دو رقیق شده است، غلظت نهایی سایتوکاین ها با دو برابر کردن اعداد به دست آمده از روی منحنی استاندارد مشخص می شود.

اندازه گیری نیتریک اکساید

سطح اکسید نیتریک توسط معرف Greiss با استفاده از پروتکل که در ابتدا توسط گریس توصیف شده بود، برآورد شد (25). به طور خلاصه می توان گفت که ماکروفاژهای صفافی جمع آوری گردیده و به پلیت های 96 خانه ای در غلظت 0.5×10^6 cells/ml LPS ($1\mu\text{g/ml}$ ex-vivo) اضافه شد. این پلیت ها در دمای 37 درجه سانتیگراد و CO_2 5 درصد به مدت 48 ساعت انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، تولید نیتريت توسط سلول ها با معرف گریس تعیین شد. غلظت نیتريت در هر نمونه با نمودار استاندارد غلظت شناخته شده (در μM) نیتريت سدیم (NaNO_2) اندازه گیری شد (24). جهت تجزیه و تحلیل داده ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه One-way Analysis of variance Scheffe (ANOVA) test نرم افزار SPSS ویراست 19 استفاده شد. تمام بررسی ها مقدار ($P < 0/05$) به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد. تمام داده ها به صورت میانگین $\pm$ SEM بیان شده است.

معنی داری کاهش داشته است ($P=0/0441$) که این کاهش حتی در ارتباط با گروه C نسبت به گروه D بیش تر بوده است ($P=0/0491$) (نمودار شماره 3).



نمودار شماره 3: ارزیابی سطح نیتریک اکساید دو و شش ساعت پس از تجویز LPS
(*) نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ($P < 0/05$) با گروه B)

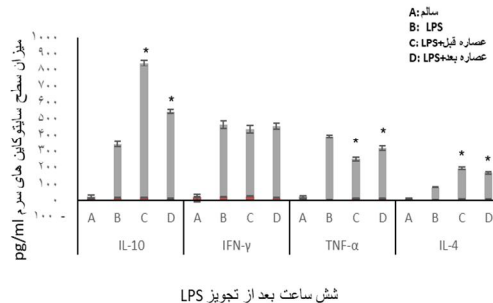
بحث

در سال‌های اخیر، افزایش محبوبیت طب مکمل و جایگزین، باعث شده است که تحقیقات علمی در ارزیابی و درک فعالیت‌های دارویی و مکانیسم‌های داروهای گیاهی افزایش یابد. در این مطالعه ما برای اولین بار به بررسی اثرات گیاه *Euphorbia myrsinites* به عنوان تعدیل کننده پاسخ سایتوکاین‌های پیش التهابی و ضد التهابی در موش آزمایشگاهی مبتلا به شوک سپتیک القا شده توسط LPS پرداختیم. نتایج به دست آمده نشان داد تجویز عصاره الکلی گیاه *E. myrsinites* می‌تواند باعث افزایش معنی دار سایتوکاین‌های ضد التهابی IL-4 و IL-10 و کاهش معنی دار سایتوکاین‌های پیش التهابی TNF- α و IFN- γ در گروه‌های تحت درمان با عصاره اتانولی گیاه شود و از طرف دیگر در همین گروه‌ها میزان تولید نیتریک اکساید به طور معنی دار کاهش یافت ($P=0/0421$).

مطالعات مختلف نشان می‌دهد که محصولات طبیعی مانند گیاهان نقش مهمی در پیشگیری و درمان شرایط التهابی دارند. از جمله این محصولات ترپنوئیدها (Terpenoids) هستند که در گیاهان، حشرات، میکروب‌ها

تغییرات سطح هر یک از سایتوکاین‌ها 6 ساعت بعد از تجویز LPS

ارزیابی سطح TNF- α در سرم خون گرفته شده از موش‌ها بعد از 6 ساعت از تجویز LPS نشان داد که میزان این سایتوکاین در موش‌های گروه C و D نسبت به گروه B به صورت معنی داری کاهش داشته است ($P=0/0481$) که این کاهش در گروه C نسبت به گروه D به طور معنی داری کم تر بوده است ($P=0/0473$). نتایج ما در ارتباط با IL-10 و IL-4 نشان داد که میزان سطح این دو سایتوکاین در موش‌های گروه C و D نسبت به گروه B به طور معنی داری افزایش داشته است ($P=0/0406$) که این افزایش در گروه C نسبت به گروه D بیش تر بوده است ($P=0/0433$). نتایج ما در ارتباط با IFN- γ تغییرات معنی داری را نشان نداد (نمودار شماره 2).



نمودار شماره 2: میزان سطح سایتوکاین‌ها در سرم خون موش‌ها 6 ساعت پس از تجویز LPS
(*) نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ($P < 0/05$) با گروه B)

میزان تولید نیتریک اکساید در 2 و 6 ساعت پس از تجویز LPS

ارزیابی سطح نیتریک اکساید 2 ساعت پس از تجویز LPS نشان داد که میزان آن در موش‌های گروه C و D نسبت به گروه B کاهش داشته است که این کاهش در ارتباط با گروه C به طور معنی داری کم تر بوده است ($P=0/0401$) (نمودار شماره 3). ارزیابی سطح نیتریک اکساید 6 ساعت پس از تجویز LPS نشان داد که میزان آن در موش‌های گروه C و D نسبت به گروه B به طور

و ارگانسیم‌های دریایی وجود دارند و نقش‌های مختلفی از جمله اثرات ضد میکروبی، ضد التهابی و حتی ضد توموری دارند. مشخص شده است که عملکرد ترپنوئیدها و بسیاری از عصاره‌های گیاهی از طریق تأثیری است که در فعال‌سازی فاکتور نسخه‌برداری موثر در التهاب یا همان فاکتور نسخه‌برداری هسته‌ای کاپا B (NF- κ B) دارند. NF- κ B نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های التهابی و ایمنی دارد.

در مطالعه‌ای که توسط Heras و همکاران در سال 2009 انجام شد مشخص گردید که محصولات حاصل از گیاهان از طریق همین فاکتور نسخه‌برداری و مهار فعال‌سازی آن می‌توانند در بسیاری از بیماری‌ها نقش درمانی خود را ایفا کنند (3). یکی از دلایل اثرات ضدالتهابی گیاه *Euphorbia* کاهش فعالیت فاکتور نسخه‌برداری NF- κ B است (20) که جزء حیاتی در تنظیم پاسخ‌های التهابی می‌باشد (25).

Garipelli و همکاران نشان دادند که *Euphorbia thymifolia* دارای عملکرد ضد التهابی است (26) که این کار را از طریق کاهش تنظیم بیان ژن پیش التهابی، القاء بیان ژن آنتی‌اکسیدان و تعدیل فعال‌سازی MAPK و NF- κ B اعمال می‌کند، در این آزمایش علاوه بر *E.thymifolia* گیاه دیگری به نام *Cleome rutidosperma* نیز بررسی شد که مکانیسمی مشابه با *E.thymifolia* به عنوان یک گیاه ضد التهابی نشان داد و این دو گیاه مطابق با نتایج مطالعه حاضر، مانع تولید IFN- γ ، TNF- α و IL-6 و از طرفی باعث افزایش میزان IL-4 در حالت وابسته به دوز شدند. از دیگر نتایج مشاهده شده این دو گیاه کاهش بیان mRNA IL-1 و کموکاین CCL2 به صورت وابسته به دوز بود (27). کاهش بیان مولکول‌های چسبان بین سلولی از دلایل دیگر اثرات ضد التهابی گیاهان *Euphorbia* می‌باشد. این مولکول‌های چسبندگی مانند E-selectin، ICAM-1 و VCAM-1 می‌توانند توسط چندین نوع از سیتوکین‌های پیش التهابی، از جمله TNF- α ، IL-1 و

IFN- γ ایجاد شوند و ماکروفاژهای فعال شده با LPS باعث تولید سطح بالایی از TNF- α ، IFN- γ و IL-6 می‌شوند. بنابراین، ماکروفاژهای فعال شده با LPS می‌تواند باعث تحریک تولید محصولات CAM شوند (28،29). اما در مطالعه ما استفاده از عصاره الکلی *E.myrsinites* باعث کاهش یافتن میزان سطح TNF- α و IFN- γ در سرم موش‌ها شد پس به صورت غیرمستقیم می‌تواند در تولید محصولات CAM نیز موثر باشد. از طرف دیگر خیلی از مطالعات نشان می‌دهند که محصولات گیاهی چه در درون تنی و چه در برون تنی از طریق تأثیراتی که در پروفایل سایتوکاین‌های بدن دارند می‌تواند اثرات درمانی خود را ایفا کنند. سیتوکاین‌ها تنظیم‌کننده پاسخ‌های میزبان به عفونت، واکنش‌های ایمنی، التهاب و تروما هستند و بعضی از سیتوکین‌ها باعث بدتر شدن بیماری (سایتوکاین پیش التهابی) می‌شوند، در حالی که برخی دیگر (سایتوکاین ضد التهابی) برای کاهش التهاب و تسکین عمل می‌کنند. IL-1 و TNF- α سیتوکاین‌های پیش التهابی هستند و زمانی که به انسان تزریق می‌شوند باعث تب، التهاب، تخریب بافت و بعضی موارد شوک و حتی مرگ را باعث می‌شوند (30). ایجاد شوک توسط LPS، به دلیل تأثیر این اندوتوکسین بر روی سایتوکاین‌های التهابی مانند TNF- α و IFN- γ می‌باشد که از بین این دوسایتوکاین به خصوص TNF- α در دوزهای بالا می‌تواند باعث شوک سپتیک شود (31،32). تحقیقات نشان می‌دهد که تجویز LPS به صورت داخل صفاقی در موش‌ها باعث افزایش سایتوکاین‌های پیش التهابی و کاهش سایتوکاین‌های ضد التهابی می‌شود (33-36) که در راستای نتایج مطالعه حاضر است. در مطالعه‌ای که در سال 2010 توسط Mei Fen Shih و همکاران انجام شد معلوم گردید که استفاده از محصولات گیاه *Euphorbia hirta* در محیط کشت سلولی تحت تأثیر LPS می‌تواند باعث مهار تولیدات نیتریک اکساید، TNF- α ، IL-6 و پروستاگلندین E₂ در محیط کشت

شود که شرایط بهتری را برای رشد سلول‌ها در محیط کشت فراهم می‌نمود (37) که مطابق با داده‌های مطالعه حاضر می‌باشد.

Sheikh Fayaz در سال 2013 نشان داد که استفاده از عصاره الکلی گیاه *Euphorbia hirta* در موش‌های مبتلا به التهاب زانوی القاء شده با LPS می‌تواند باعث کاهش میزان سطح سایتوکاین $TNF-\alpha$ در مایع مفصلی و نوتروفیل‌ها در موش‌های درمان شده با عصاره گیاه شود که این امر باعث کاهش عوارض بیماری در آن‌ها شد (38) که تا حدودی با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. در مطالعه‌ای که بر روی لنفوسیت‌های محیطی افراد سالم در سال 2011 انجام شد، مشاهده گردید که انکوباسیون لنفوسیت‌ها به مدت 4 ساعت با عصاره لاتکس گیاه *Euphorbia tirucalli* باعث تأثیرات مثبت در پروفایل سایتوکاینی محیط کشت به‌خصوص سایتوکاین‌های $TNF-\alpha$ ، $IFN-\gamma$ ، IL-4 و IL-10 می‌شود که مطابق با مشاهدات ما بود (39). در مطالعه‌ای که تأثیرات احتمالی بعضی از گونه‌های *Euphorbia* را در محیط‌های کشت سلولی بررسی می‌کرد، مشخص شد که عصاره اینترجیحا معادل گیاهان می‌تواند باعث افزایش پروفایل سایتوکاین TH_2 مثل IL-4 و IL-5 و کاهش سایتوکاین‌های TH_1 مثل $IFN-\gamma$ شود که این یافته‌ها مطابق با مشاهدات ما بود (40). البته در سال 2014 Sheikh Fayaz و همکاران نشان دادند که استفاده از عصاره الکلی گیاه *Euphorbia hirta* در موش‌های مبتلا به آرتریت القاء شده توسط اجوانت می‌تواند باعث کاهش سطح سرمی سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مثل $TNF-\alpha$ ، $IFN-\gamma$ و IL-2 و افزایش سطح سرمی سایتوکاین‌های ضد التهابی مثل IL-4 و IL-5 شود (41) که در راستای نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. از سویی در مطالعه‌ای دیگر که آن هم توسط Sheikh Fayaz و همکاران در سال 2012 انجام گرفت معلوم شد که استفاده از عصاره الکلی *Euphorbia hirta* در مدل تجربی در موش‌ها می‌تواند باعث مهار ایمنی سلولار و

سایتوکاین‌های TH_1 مثل IL-2، $TNF-\alpha$ و $IFN-\gamma$ شود و از طرف دیگر پاسخ‌های ازدیاد حساسیت تاخیری را هم در این موش‌ها کاهش دهد (42) در همین راستا در مطالعه‌ای مشابه در سال 2012 Sheikh Fayaz و همکاران نشان دادند که استفاده از عصاره گیاه *Euphorbia hirta* در موش‌های مبتلا به آرتریت القاء شده توسط اجوانت باعث تعدیل سایتوکاین‌های TH_1 مثل IL-1 β ، IL-2، $TNF-\alpha$ و $IFN-\gamma$ (مطابق با مطالعه حاضر) می‌شود و از طرف دیگر عصاره این گیاه می‌تواند تولید نیتریک اکساید را در ماکروفاژهای تحت تأثیر با LPS در محیط کشت را نیز کاهش دهد (43).

البته گیاهان از جنس *Euphorbia* می‌توانند پارامترهای مولکولی و سلولی سیستم ایمنی بدن را تغییر دهند (3، 15) که از دلایل ایجاد این اثرات ضد التهابی کاهش تولید نیتریک اکساید (NO) (19) و افزایش سایتوکاین‌های ضد التهابی مثل IL-4 و IL-5 و کاهش سایتوکاین‌های پیش التهابی مثل $IFN-\gamma$ و $TNF-\alpha$ در سرم موش‌های تحت تجویز با عصاره‌ی اتانول این گیاه است (21) که در راستای داده‌های حاصله از مطالعه حاضر می‌باشد.

Bethânia و همکاران در سال 2011 در مقاله خود پیشنهاد کردند که اقدامات درمانی مربوط به *E. tirucalli* می‌تواند منجر به تغییرات پاسخ ایمنی توسط گیاه شود، در این مطالعه، اثرات برون تنی لاتکس خام *E. tirucalli* در تولید سایتوکاین‌های نوع 1 مثل $IFN-\gamma$ و $TNF-\alpha$ و سایتوکاین‌های نوع 2 مثل IL-4 و IL-10 با استفاده از جمعیت‌های لکوسیت انسانی مورد بررسی قرار گرفت، که افزایش درصد سلول‌های IL-10 در نتایج این مطالعه مشاهده شد که مطابق با نتایج مطالعه ما می‌باشد (39).

Hong و همکاران در سال 2002 اثر گیاه *Polygala tenuifolia* را بر روی IL-4، $TNF-\alpha$ و $IFN-\gamma$ موش مورد آزمایش قرار دادند و نتیجه مشاهده شده افزایش در سطح میزان سایتوکاین IL-4 و کاهش میزان سایتوکاین‌های $IFN-\gamma$ و $TNF-\alpha$ بود (45) از طرف

دیگر Piuvezam و همکاران در سال 2010 اثر گیاه *Cissampelos sympodialis* را با دوز 6/25 میکروگرم به ازای میلی لیتر روی سایتوکاین IL-10 و با دوز 12/5 میکروگرم به ازای میلی لیتر روی سایتوکاین IL-4 و IFN- γ در موش مورد بررسی قرار دادند که نتیجه آن افزایش درمیزان سطح IL-10 و IL-4 و کاهش در میزان IFN- γ بود (46)، که مشابه با نتایج ما می باشد. همین طور Wilasrusmee و همکاران در سال 2002 به بررسی اثر عصاره متانولی میوه و دانه گیاه *Silybum marianum* بر روی سایتوکاین IL-10 و IL-4 پرداختند و متوجه شدند که این گیاه باعث افزایش میزان سطح هر دو سایتوکاین شد (47).

Hodge و همکاران در سال 2002 بر روی اثر عصاره له شده سیر (*Allium sativum*) روی سایتوکاین های مختلف انسان مطالعه کردند و در نتیجه آن افزایش در میزان سطح سایتوکاین IL-10 و کاهش در میزان IFN- γ و TNF- α مشاهده گردید و پیشنهاد دادند با توجه به پتانسیل سیر برای کاهش سیتوکین های ضد التهابی IL-1، TNF و IL-8 و تحریک ترشح IL-10 (آنتاگونیست سیتوکین های ضد التهابی)، می توان از این عصاره در بیماری های التهابی مختلف به عنوان یک داروی موثر استفاده کرد (48).

مطالعات مختلف نشان دهنده کاهش میزان سطح IFN- γ ، TNF- α و میزان تولید نیتریک اکساید در اثر استفاده از عصاره گیاهان مختلفی چون عصاره آبی

دانه گیاه *Acanthopanax senticosus* (48)، عصاره آبی گل گیاه *Acer nikoense* (49)، عصاره آبی ریشه گیاه *Dichroa febrifuga* (50) عصاره آبی پوست گیاه *Uncaria tomentosa* (51) عصاره اتانولی (80 درصد) گیاه *Tinospora cordifolia* (52)، عصاره متانول (70 درصد) ریشه گیاه *Scutellaria baicalensis* (53) در موش بوده است که در راستای نتایج مطالعه حاضر می باشد.

مطالعه حاضر اولین آزمایش بالینی تاثیر عصاره اتانولی *E. mirsinites* در کنترل شوک ناشی از LPS می باشد. در مجموع به نظر می رسد که درمان با عصاره *E. myrsinites* دارای تاثیرات مثبتی می باشد به طوری که این موش ها سطح پایین تری از TNF- α ، IFN- γ و سطح بالاتری از IL-4، IL-10 نسبت به موارد درمان نشده با این گیاه نشان دادند و از طرف دیگر میزان تولید نیتریک اکساید در موش های تحت درمان با عصاره اتانولی گیاه نسبت به موش های درمان نشده به طور معنی داری پایین تر بوده است ($P < 0/05$) از این رو به نظر می رسد عصاره اتانولی *E. mirsinites* می تواند به عنوان یک استراتژی مفید در درمان شوک ناشی از LPS در نظر گرفته شود.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز انجام شد. نویسندگان مقاله مراتب تشکر خود را از خانم دکتر فائزه رحیمی اعلام می نمایند.

References

- Mukherjee PK, Nema NK, Bhadra S, Mukherjee D, Braga FC, Matsabisa MG. immunomodulatory leads from medicinal plants. Indian Journal of Traditional Knowledge 2014; 13(2): 235-256.
- Shukla S, Bajpai VK, Kim M. Plants as potential sources of natural immunomodulators. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology 2014; 13(1): 17-33.
- de las Heras B, Hortelano S. Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids. Inflamm Allergy Drug Targets 2009; 8(1): 28-39.
- Pereira-da-Silva G, Caroline Carvalho F, Cristina Roque-Barreira M. Neutrophil Activation Induced by Plant Lectins: Modulation of

- Inflammatory Processes. *Inflammation & Allergy-Drug Targets* 2012; 11(6): 433-441.
5. Yoshida T, Amakura Y, Yoshimura M. structural features and biological properties of ellagitannins in some plant families of the order myrtales. *Int J Mol Sci* 2010; 11(1): 79-106.
 6. Kilbourn RG, Griffith OW. Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84(11): 827-831.
 7. Gold JA, Parsey M, Hoshino Y, Hoshino S, Nolan A, Yee H, et al. CD40 contributes to lethality in acute sepsis: in vivo role for CD40 in innate immunity. *Infect Immun* 2003; 71(6): 3521-3528.
 8. Kuo PL, Cho CY, Hsu YL, Lin TC, Lin CC. Putranjivain A from *Euphorbia jolkini* inhibits proliferation of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells via blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 213(1): 37-45.
 9. Lage H, Duarte N, Coburger C, Hilgeroth A, Ferreira MJU. Antitumor activity of terpenoids against classical and atypical multidrug resistant cancer cells. *Phytomedicine* 2010; 17(6): 441-448.
 10. Aynehchi Y, Mojtabai M, Yazdizadeh K. Chemical examination of *Euphorbia myrsinitis* linn. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1972; 61(2): 292-293.
 11. Upadhyay SN, Plant products as immune response modulators. *Proceeding of the international Ayurveda Conference-97*. Sanjay Gandhi, Post Graduate Institute of Medical Sciences, Lucknow 1997: 10.
 12. Arshad Ahmed S, Nazim S, Siraj S, Siddik PM, AbWahid C. *Euphorbia Neriifolia* Linn: A phytopharmacological review. *International Research Journal of Pharmacy* 2011; 2(2): 41-48.
 13. Sen T, Samanta SK. Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2015; 147: 59-110.
 14. Oksüz S, Gürek F, Gil RR, Pengsuparp T, Pezzuto JM, Cordell GA. Four diterpene esters from *Euphorbia myrsinites*. *Phytochemistry* 1995; 38(6): 1457-1462.
 15. Pusztai R, Ferreira MJ, Duarte N, Engi H, Molnar J. Macrocyclic lathyrane diterpenes as antitumor promoters. *Anticancer Res* 2007; 27(1A): 201-205.
 16. Jassbi AR. Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran. *Phytochemistry* 2006; 67(18): 1977-1984.
 17. Somani SJ, Modi KP, Majumdar AS, Sadarani BN. Phytochemicals and Their Potential Usefulness in Inflammatory Bowel Disease. *Phytotherapy Research* 2015; 29(3): 339-350.
 18. Fernandez-Arche A, Saenz MT, Arroyo M, de la Puerta R, Garcia MD. Topical anti-inflammatory effect of tirucallol, a triterpene isolated from *Euphorbia lactea* latex. *Phytomedicine* 2010; 17(2): 146-148.
 19. Lee JW, Lee C, Jin Q, Jang H, Lee D, Lee HJ, et al. Diterpenoids from the Roots of *Euphorbia fischeriana* with Inhibitory Effects on Nitric Oxide Production. *J Nat Prod* 2016; 79(1): 126-131.
 20. Ashour M, Ebada S. Plant natural products as potential modulators of the transcription factor NF- κ B. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* 2012; 6: 10-12.
 21. Ramesh KV, Padmavathi K. Assessment of Immunomodulatory Activity of *Euphorbia hirta* L. *Indian J Pharm Sci* 2010; 72(5): 621-625.
 22. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Naji L, Fernández-Santos JM, Martín-Lacave I, Guerrero JM, et

- al. Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. *J Pineal Res* 2005; 39(4): 400-408.
23. Jayashankar B, Mishra KP, Ganju L, Singh SB. Supercritical extract of Seabuckthorn Leaves (SCE200ET) inhibited endotoxemia by reducing inflammatory cytokines and nitric oxide synthase 2 expression. *International Immunopharmacology* 2014; 20(1): 89-94.
 24. Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs jr JB. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods in Enzymology* 1996; 268: 142-151.
 25. Natoli G, De Santa F. Shaping alternative NF- κ B-dependent gene expression programs: New clues to specificity. *Cell Death Differ*. 2006 13: 693-696.
 26. Garipelli N, Runja C, Potnuri N, Pigili RK. Anti-inflammatory and anti-oxidant activities of ethanolic extract of *Euphorbia thymifolia* linn whole plant. *Int J Pharm Pharm Sci* 2012; 4(3): 516-519.
 27. Ding HY, Wu PS, Wu MJ. *Cleome rutidosperma* and *Euphorbia thymifolia* Suppress Inflammatory Response via Upregulation of Phase II Enzymes and Modulation of NF- κ B and JNK Activation in LPS-Stimulated BV2 Microglia. *Int J Mol Sci* 2016; 17(9): 1420.
 28. Shih MF, Cheng YD, Shen CR, Cherng JY. A molecular pharmacology study into the anti-inflammatory actions of *Euphorbia hirta* L. on the LPS-induced RAW 264.7 cells through selective iNOS protein inhibition. *J Nat Med* 2010; 64(3): 330-335.
 29. Cherng JY, Lio CC, Shen CR, Lin HH, Shih MF. Beneficial effects of *Chlorella-11* peptide on blocking the LPS-induced macrophage activation and alleviating the thermal injury- induced inflammation in rats. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010; 23(3): 811-820.
 30. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118(2): 503-508.
 31. Fransen L, Müller R, Marmenout A, Tavernier J, Van der Heyden J, Kawashima E, et al. Molecular cloning of mouse tumour necrosis factor cDNA and its eukaryotic expression. *Nucleic Acids Res* 1985; 13(12): 4417-4429.
 32. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988; 53(1): 45-53.
 33. Yan SS, Li Y, Wang Y, Shen SS, Gu Y, Wang HB, et al. 17-Acetoxyjolkinoide B irreversibly inhibits IkappaB kinase and induces apoptosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther* 2008; 7(6): 1523-1532.
 34. Amirghofran Z, Bahmani M, Azadmehr A, Javidnia K. Induction of apoptosis in leukemia cell lines by *Linum persicum* and *Euphorbia cheiradenia*. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132(7): 427-432.
 35. Yang CM, Cheng HY, Lin TC, Chiang LC, Lin CC. *Euphorbia thymifolia* suppresses herpes simplex virus-2 infection by directly inactivating virus infectivity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32(5-6): 346-349.
 36. Lage H, Duarte N, Coburger C, Hilgeroth A, Ferreira MJU. Antitumor activity of terpenoids against classical and atypical multidrug resistant cancer cells. *Phytomedicine* 2010; 17(6): 441-448.

37. Shih MF, Cheng YD, Shen CR, Cherng JY. A molecular pharmacology study into the anti-inflammatory actions of *Euphorbia hirta* L. on the LPS-induced RAW 264.7 cells through selective iNOS protein inhibition. *J Nat Med* 2010; 64(3): 330-335.
38. Ahmad SF, Bani S, Sultan P, Ali SA, Bakheet SA, Attia S, et al. TNF- α inhibitory effect of *Euphorbia hirta* in rats. *Pharmaceutical Biology* 2013; 51(4): 411-417.
39. Avelar BAD, Lelis FJN, Avelar RS, Weber M, Souza-Fagundes EM, Lopes MTP, et al. The crude latex of *Euphorbia tirucalli* modulates the cytokine response of leukocytes, especially CD4+ T lymphocytes. *Rev Bras Farmacogn* 2011; 21(4): 662-667.
40. Ghafourian Boroujerdnia M, Khosravi N, Malek-Hosseini S, Amirghofran Z. Augmentation of lymphocytes activation and T cell modulation by the extracts from some *Euphorbia* species. *Pharm Biol* 2014; 52(11): 1471-1477.
41. Ahmad SF, Attia SM, Bakheet SA, Ashour A, Zoheir KMA, Abd-Allah ARA. Anti-inflammatory effect of *Euphorbia hirta* in an adjuvant-induced arthritic murine model. *Immunological Investigations* 2014; 43(3): 197-211.
42. Ahmad SF, Khan B, Bani S, Kaul A, Sultan P, Ali SA, et al. Immunosuppressive effects of *Euphorbia hirta* in experimental Animals. *Inflammopharmacol* 2013; 21(2): 161-168.
43. Ahmad SF, Sultan P, Ashour AE, Khan TH, Attia SM, Bakheet SA, et al. Modulation of Th₁ Cytokines and Inflammatory Mediators by *Euphorbia hirta* in Animal Model of Adjuvant-induced Arthritis. *Inflammopharmacol* 2013; 21(5): 365-375.
44. Hong T, Jin GB, Yoshino G, Miura M, Maeda Y, Cho S, et al. Protective effects of *Polygalae* root in experimental TNBS-induced colitis in mice. *J Ethnopharmacol* 2002; 79(3): 341-346.
45. Piuvezam MR, Pecanha LMT, Alexander J, Thomas G. *Cissampelos sympodialis* Eichl. leaf extract increases the production of IL-10 by concanavalin- A-treated BALB/c spleen cells. *J Ethnopharmacol* 1999; 67(1): 93-101.
46. Wilasrusmee C, Kittur S, Shah G, Siddiqui J, Bruch D, Wilasrusmee S, et al. Immunostimulatory Effect of *Silybum Marianum* (Milk Thistle) Extract. *Med Sci Monit* 2002; 8(11): BR439-BR443.
47. Hodge G, Hodge S, Han P. *Allium sativum* (garlic) suppresses leukocyte inflammatory cytokine production in vitro: potential therapeutic use in the treatment of inflammatory bowel disease. *Cytometry* 2002; 48: 209-215.
48. Yi JM, Hong SH, Kim JH, Kim HK, Song HJ, Kim HM. Effect of *Acanthopanax senticosus* stem on mast cell dependent anaphylaxis. *J Ethnopharmacol* 2002; 79(3): 347-352.
49. Fujiki H, Suganuma M, Kurusu M, Okabe S, Imayoshi Y, Taniguchi S, et al. New TNF- α Releasing Inhibitors As Cancer Preventive Agents From Traditional Herbal Medicine And Combination Cancer Prevention Study With EGCG And Sulindac or Tamoxifen. *Mutat Res* 2003; 523-524: 119-125.
50. Kim YH, Ko WS, Ha MS, Lee CH, Choi BT, Kang HS, et al. The production of nitric oxide and tnf-alpha in peritoneal macrophages is inhibited by *dichroa febrifuga* Lour. *J Ethnopharmacol* 2000; 69(1): 35-43.
51. Kim YO, Leem K, Park J, Lee P, Ahn DK, Lee BC, et al. Cytoprotective Effect of *Scutellaria Baicalensis* In CA1 Hippocampal Neurons of Rats After Global Cerebral Ischemia. *J Ethnopharmacol* 2001; 77(2-3): 183-188.

52. Dhuley JN. Effect of Some Indian Herbs on Macrophage Functions In Ochratoxin A Treated Mice. J Ethnopharmacol 1997; 58(1): 15-20.
53. Sandoval M, Okuhama NN, Zhang XJ, Condezo LA, Lao J, Angeles FM, et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. Phytomedicine 2002; 9(4): 325-337.