





دانشکده دامپزشکی

پایان نامه ی دکتری حرفه ای رشته ی دامپزشکی

ارزیابی سمیت سلولی ترکیب گیاهی آریا اورال در شرایط برون تنی

استاد راهنما:

دکتر جهانگیر کیوتری کتج

استادان مشاور:

دکتر سعید حبیبیان دهکردی

دکتر سید محمود عظیمی

پژوهشگر:

فهیمه نساجی زواره

اسفند ماه ۱۳۹۱



دانشکده دامپزشکی

گروه علوم پایه

پایان نامه خانم فهیمه نساجی زواره جهت اخذ درجه دکتری حرفه ای رشته ی دامپزشکی با عنوان  
ارزیابی سمیت سلولی ترکیب گیاهی آریا اورال در شرایط برون تنی در تاریخ ۱۳۹۳/۱۲/۶ با  
حضور هیأت داوران زیر بررسی و با رتبه/نمره ..... مورد تصویب نهایی قرار گرفت.

۱. استاد راهنمای پایان نامه

امضاء دکتر جهانگیر کبوتری کتج با مرتبه علمی استادیار

۲. استادان مشاور پایان نامه

امضاء دکتر سعید حبیبیان دهکردی با مرتبه علمی دانشیار

امضاء دکتر سید محمود عظیمی با مرتبه علمی استادیار پژوهشی

۳. استادان داور پایان نامه

امضاء دکتر علی پرچی با مرتبه علمی استادیار

امضاء دکتر عبدالناصر محبی با مرتبه علمی استادیار

مسئولیت کلیه عقاید و نظراتی که در این پایان نامه آورده شده است به عهده نگارنده بوده و دانشکده  
دامپزشکی هیچ مسئولیتی را در این زمینه تقبل نمی نماید.

دکتر حسین نورانی  
رئیس دانشکده دامپزشکی

دکتر سعید حبیبیان دهکردی  
معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی  
دانشکده دامپزشکی

کلیه حقوق مادی حاصله از نتایج مطالعات، ابتکارات  
و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه  
متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

پس مخصوص خداوندی است که تختین موجود است و پیش از او چیزی نبوده است و آخرین موجود است و بعد از او چیزی نیست. دیده بینندگان، از مشاهده او ناتوان است و اندیشه کوندگان از وصف او عاجز است، به وسیله قدرت خود، آفریدگان را آفرید و بار آورده خود آنها را از نیستی به وجود آورد.

اکنون که این مجموعه گرد آمده است لازم می دانم از کلیه کسانی که در طی این مسیر یاری نمودند تشکر و قدردانی نمایم از اساتید ارجمند راهنما و مشاور آقایان دکتر جهانگیر کبوتری، دکتر سعید حبیبیان، دکتر دی و دکتر سید محمود عظیمی که بارها بهمانی به ایشان مراد مسیر پیشرو پیمان نامه یاری نمودند کمال تشکر را دارم.

زحمات کاد محترم، بخش تب بر فکلی موسسه سرم سازی رازی راج می نهم که در این مسیریاری فرمودند.

از جناب آقای اسین دبیلی که در تمام طول این رساله زحمات بی شائبه ای متحمل شدند بسیار سپاسگزارم.

از برادر عزیزم آقای دکتر مجتبی نسابی که بارها بهمنموده اش این مسیر را برایم هموار کرد سپاسگزارم.

از کلیه اساتید دوره تحصیل که از محضرشان کسب فیض نمودم قدردانی می نمایم.

در نهایت از تمام دوستان و هم کلاسی هایم که دوران تحصیل در دانشگاه را برایم شیرین تر کردند ممنون و سپاسگزارم.

تقدیم به

پدر عزیزم مشوق و راه‌نمای زندگی ام که راه تحصیل را پیش رویم نهاد و در ادامه یاری ام نمود.

مادر مهربانم که از دریای محبتش بی‌شائبه عشق ورزید و عشق ورزیدن را به من آموخت.

خواهران عزیزم مریم و فاطمه که وجودشان برایم مایه آرامش است.

## چکیده

هدف از مطالعه پیش رو ارزیابی سمیت سلولی ترکیب دارویی جدید آریا اورال به روش Normal Human Keratinocyte Neutral Red Uptake (NHK NRU assay) می باشد. در این تحقیق از سه ماده تشکیل دهنده این ترکیب یعنی اوژینول، ریوند به همراه اسید سالیسیلیک و سرکه سیب و ترکیب آریا اورال رقت سریال تهیه شد. رقت های مورد استفاده برای ریوند از ۰/۰۰۴ تا ۸/۵ میلی گرم در میلی لیتر، اوژینول از ۰/۰۰۳ تا ۶/۴ میلی گرم در میلی لیتر، سرکه سیب از ۰/۰۰۰۰۱ تا ۰/۰۰۳ درصد و در مورد آریا اورال ۱۲ رقت سریال از ۰/۰۰۰۶ تا ۰/۱۲۸ درصد می باشد. پس از افزودن ۳ تکرار از هر رقت به سه چاهک کناری در پلیت ۹۶ خانه، ۲۴ چاهک نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. سپس پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور (گرمخانه) CO<sub>2</sub> دار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. رنگ آمیزی بوسیله رنگ حیاتی Neutral Red که جذب سلول های زنده می شود، انجام و توسط دستگاه خوانشگر الیزا (Elisa reader) در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد. نتایج به دست آمده نشان داد گرچه غلظت غیر کشنده در مورد هر کدام از این مواد متفاوت است اما روند یکسانی وجود دارد که با افزایش غلظت، Optical density (OD) کاهش یافته یعنی مرگ سلولی افزایش می یابد ( $p < 0.05$ ). در این تحقیق کمترین غلظت کشنده برای ریوند ۱/۰۶ و بیشترین غلظت غیر کشنده ۰/۵۳ میلی گرم در میلی لیتر و به ترتیب برای سرکه سیب ۰/۰۰۰۷۵ درصد و ۰/۰۰۰۳۷۵ درصد و برای اوژینول ۰/۰۵ و ۰/۰۲۵ میلی گرم در میلی لیتر می باشد. کمترین غلظت کشنده آریا اورال ۰/۰۰۰۲۵ درصد و بیشترین غلظت غیر کشنده ۰/۰۰۰۱۲۵ درصد می باشد.

**کلید واژه:** آریا اورال، سمیت سلولی، روش NHK NRU assay

## فهرست مطالب

شماره صفحه

عنوان

۵	فصل اول - مقدمه
۸	فصل دوم - کلیات
۸	۱-۲ اوژینول
۸	۱-۱-۲ گیاه شناسی و انتشار گل میخک
۸	۲-۱-۲ اندام دارویی
۸	۳-۱-۲ ترکیبات شیمیایی میخک
۹	۴-۱-۲ ویژگی های فیزیکی و شیمیایی اوژینول
۹	۵-۱-۲ اثرات اوژینول
۱۰	۲-۲ ریوند
۱۰	۱-۲-۲ گیاه شناسی و انتشار جغرافیایی ریوند
۱۰	۲-۲-۲ ویژگی ها و اثرات ریوند
۱۱	۳-۲-۲ اثرات سرکه سیب
۱۱	۳-۲ بیماری تب برفکی
۱۱	۱-۳-۲ تعریف بیماری
۱۱	۲-۳-۲ فراوانی تب برفکی
۱۲	۳-۳-۲ سویه های مختلف بیماری
۱۲	۴-۳-۲ راه های انتقال ویروس
۱۲	۵-۳-۲ روش ها و مواد درمانی در تب برفکی
۱۳	۶-۳-۲ ویژگی های ترکیب دارویی آریا اورال
۱۳	۴-۲ ارزیابی سمیت سلولی
۱۵	فصل سوم - مواد و روش کار
۱۵	۱-۳ مواد و لوازم مورد نیاز
۱۵	۱-۱-۳ دستگاه ها
۱۶	۲-۱-۳ مواد مورد نیاز
۱۶	۲-۳ روش کار
۱۶	۱-۲-۳ روش کشت سلولی
۱۷	۲-۲-۳ آماده سازی پلیت حاوی سلول
۱۷	۳-۲-۳ رقت سازی
۱۸	۱-۳-۲-۳ رقت سازی ریوند
۱۸	۲-۳-۲-۳ رقت سازی سرکه سیب
۱۹	۳-۳-۲-۳ رقت سازی اوژینول
۲۰	۴-۳-۲-۳ نحوه ساخت آریا اورال

۲۰	..... رقت سازی آریا اورال..... ۵-۳-۲-۳
۲۱	..... تهیه پلیت حاوی ترکیب دارویی..... ۴-۲-۳
۲۱	..... رنگ آمیزی پلیت و خواندن نتایج..... ۵-۲-۳
۲۲	..... بررسی آماری داده ها..... ۳-۳
۲۳	..... <b>فصل چهارم نتایج</b> .....
۲۳	..... ۱-۴ نتایج بررسی سمیت سلولی.....
۲۳	..... ۲-۴ بررسی سمیت سلولی ریوند.....
۲۴	..... ۱-۲-۴ امتیاز بندی ریخت شناسی سلول در غلظت های ریوند.....
۲۵	..... ۳-۴ بررسی سمیت سرکه سیب.....
۲۶	..... ۱-۳-۴ امتیاز بندی ریخت شناسی سلول در غلظت های سرکه سیب.....
۲۶	..... ۴-۴ بررسی سمیت سلولی اوژینول.....
۲۷	..... ۱-۴-۴ امتیاز بندی ریخت شناسی سلول در غلظت های اوژینول.....
۲۷	..... ۵-۴ بررسی سمیت سلولی آریا اورال.....
۲۸	..... ۱-۵-۴ امتیاز بندی ریخت شناسی سلول در غلظت های آریا اورال.....
۲۹	..... <b>فصل پنجم بحث و نتیجه گیری</b> .....
۲۹	..... ۱-۵ بحث.....
۲۹	..... ۱-۱-۵ ریوند.....
۳۰	..... ۲-۱-۵ سرکه سیب.....
۳۰	..... ۳-۱-۵ اوژینول.....
۳۱	..... ۴-۱-۵ آریا اورال.....
۳۲	..... ۲-۵ نتیجه گیری.....
۳۳	..... <b>منابع</b> .....

## فهرست شکل ها

شماره صفحه

عنوان

۲۴	شکل ۱-۴ مقایسه کشت سلولی ریوند با گروه شاهد
۲۵	شکل ۲-۴ کشت سلولی سرکه سیب در گروه ۱۲
۲۶	شکل ۳-۴ کشت سلولی در گروه ۴ اوژینول
۲۸	شکل ۴-۴ مقایسه کشت سلولی گروه شاهد با گروه ۵ آریا اورال

## فهرست جدول ها

شماره صفحه

عنوان

۱۵.....	۱-۳ دستگاه های مورد نیاز .....
۱۶.....	۲-۳ مواد مورد نیاز .....
۱۸.....	۳-۳ رقت سازی ریوند .....
۱۹.....	۴-۳ رقت سازی سرکه سیب .....
۲۰.....	۵-۳ رقت سازی اوژینول .....
۲۱.....	۶-۳ رقت سازی آریا اورال .....
۲۳.....	۱-۴ میانگین نتایج غلظت های ریوند و گروه شاهد .....
۲۴.....	۲-۴ تعریف امتیاز بندی .....
۲۴.....	۳-۴ امتیاز بندی غلظت های ریوند.....
۲۵.....	۴-۴ میانگین نتایج غلظت های سرکه سیب و گروه شاهد .....
۲۶.....	۵-۴ امتیاز بندی غلظت های سرکه سیب.....
۲۶.....	۶-۴ میانگین نتایج غلظت های اوژینول و گروه شاهد .....
۲۷.....	۷-۴ امتیاز بندی غلظت های اوژینول.....
۲۷.....	۸-۴ میانگین نتایج غلظت های آریا اورال و گروه شاهد .....
۲۸.....	۹-۴ امتیاز بندی غلظت های آریا اورال .....

## فصل اول

### مقدمه

بیماری تب برفکی بیماری ویروسی است که در بیشتر کشورها وجود دارد و عامل واگیری شدید و بروز همه گیری های بزرگ در گله های گاو، خوک و گوسفند می باشد [۷،۱۱]. ۷۰ گونه از پستانداران وحشی در برابر عفونت طبیعی و یا آزمایشگاهی این ویروس حساسیت نشان داده اند [۲]. بیماری به لحاظ شدت خسارت های اقتصادی یکی از مانع های اصلی در تامین بهداشت و تولید دام و فرآورده های دامی به شمار می رود. این بیماری سبب کاهش شدید تولید دام شده، نقش اساسی در تجارت دام و فرآورده های خام دارد. شاید بتوان گفت تمامی دام های زوج سم از جمله گونه های نشخوارکننده اهلی مانند گاو، گاو میش، گوسفند و بز مورد هدف ویروس عامل بیماری قرار می گیرند. شدت واگیری در دام های حساس، بسیار بالا (۱۰۰٪) ولی میزان مرگ و میر پائین می باشد [۷].

عامل بیماری تب برفکی یک RNA ویروس از جنس آفتوویروس (Aphthovirus) و خانواده پیکورناویریده (Picornaviridae) می باشد که فقط عامل بیماری تب برفکی هستند و بوسیله ی آزمون های سرمی مانند تثبیت مکمل، خنثی ساختن ویروس بوسیله ی سرم و واکنش الایزا شناسایی می شود [۷،۸،۱۱]. تاکنون ۷ سروتیپ SAT1, O, A, C, Asia1, SAT2 و SAT3 ویروس تب برفکی شناخته شده است. در هر تیپ بیش از ۷۰ درصد تشابه ژنتیکی و بین تیپ ها ۴۰-۲۵ درصد تشابه ژنتیکی دیده می شود [۷،۱۱]. انتقال بیماری در بین دام های یک گله بوسیله ی ترشح بزاق صورت می گیرد [۷]. تنفس ذره های آلوده به ویروس مهم ترین راه آلودگی دام ها است [۱۱،۱۶]. بیماری در مناطق اندمیک (رایج) به وقوع می پیوندد و در بره های تازه متولد شده به دلیل انجام نگرفتن واکسیناسیون، اقدام های درمانی جهت بازگردانی هر چه سریع تر حیوان به وضعیت طبیعی بسیار ضروری است. فراوانی تحت تیپ های ویروسی و قدرت انتقال بالا، واکسیناسیون را مشکل و پرهزینه کرده است. از جمله درمان های رایج استفاده از محلول های دهان شویه مانند سرکه، گلیسیرین یده، جوش شیرین، شستشوی محل آسیب ها با کربنات سدیم ۵ درصد، درمان با پادزیست هائی مثل اکسی تتراسیکلین (Oxytetracycline) ۱۰ درصد، تجویز آنتی هیستامین (Antihistamine) مانند

تریپلن آمین (Tripeleminam), استفاده از ضد آماس های غیر استروئیدی موضعی و عمومی مانند داروی فلونکسین مگلو مین (Flunixin Meglumine), پودر اشتها آور، استفاده از مواد غذایی غیر خشبی و تجویز ویتامین ها می باشد [۴۰،۸،۱۵].

استفاده از ترکیبات گیاهی، یکی از روش های درمانی است که امروزه در سطح دنیا مورد توجه بیشتری قرار گرفته است و به دلیل پیامدهای کمتری که نسبت به مواد شیمیایی دارد توجه بیشتر دانشمندان را به این سمت جلب کرده است. استفاده از گیاهان دارویی در طب قدیم جایگاه ویژه ای داشته است. بقراط در یونان، پور سینا و رازی در ایران در طب گیاهی مهارت داشته و از آن استفاده های درمانی زیادی می کردند. بر اساس پژوهش های انجام شده در مادر اسکای هند از زیتون تلخ به عنوان یک ضد عفونی کننده در تب برفکی استفاده می شده است که این خود اهمیت این یافته ها را در مورد بیماری های دامی بیشتر نمایان می سازد [۶،۵۸]. شرکت باریج اسانس از گیاه آس برای درمان تب برفکی و اکتیمای واگیر (Contagious Ecthyma) استفاده می نماید.

یکی از ترکیب های جدید گیاهی بر ضد بیماری تب برفکی ترکیب آریا اورال است که از دو ماده موثر اوژینول (Eugenol) و ریوند (Rhubarb) با سرکه سیب، سالیسیلیک اسید (Salicylic acid) و اتانول ۹۶ درصد به عنوان نگهدارنده و حلال ساخته شده است. اوژینول ترکیبی است که از عصاره گل میخک (Clove) گرفته می شود. از این ترکیب برای درمان دندان درد و درد گوش، تقویت حافظه و درمان سر درد استفاده می شود. امروزه پژوهش ها، ویژگی های بسیاری از اوژینول را بیان می کند [۴۴،۵۶]. این ماده دارای ویژگی ضد شوک آنافیلاکسی (Antianaphylactic Shok)، ضد آماسی، گند زدائی، ضد لیپید پرواکسیداز (Antilipid Peroxidase) و ویژگی ضد اکسیدانی (Antioxidant) می باشد [۱۴،۱]. اوژینول به عنوان یک ترکیب شیمیایی طبیعی در مرگ برنامه ریزی شده سلولی (Apoptosis) و به طور انتخابی، تنظیم کننده مرگ سلولی و رگ زایی در تومورها می باشد [۴۷،۵۵]. اوژینول از جمله موادی است که در صنعت داروسازی در فرموله کردن حشره کش ها، ضد اکسیدان ها، گند زداها و به عنوان بی حسی استفاده می شود [۲۰،۳۶]. اثرات ضد قارچی عصاره روغنی گل میخک ثابت شده و نتایج خوبی از آن ارائه شده است [۴۹]. وجود ترکیبات فنولی در اوژینول باعث ویژگی ضد اکسیدانی، ضد توموری، گند زدائی، ضد باکتریایی و ضد ویروسی شده است [۳،۵۳].

یکی دیگر از ترکیبات استفاده شده عصاره ریوند می باشد که به صورت ترکیب با اسید سالیسیلیک با نام ایرالوکس (Iralvex) از شرکت گل دارو اصفهان تهیه شده است. ریوند قرن ها در پزشکی و معالجه ی مردم مورد استفاده قرار می گرفته است. ریوند به طور مستقیم به عنوان ناقل نمک صفر عمل می کند. از این رو می تواند در زمره ی محرک های کبدی قرار گیرد و نخستین عمل گوارشی خود را در دهان، با تحریک جوانه های چشایی، با طعم تند خود آغاز می کند [۵۹]. ریوند دارای مواد موثر از جمله آنترآگلیکوزیدها (Antraglycosid) شامل: پالمیدن (Palmidin)، آلوامودین (Aloe-emodin)، امودین (Emodin)، کریزوفانول (Chrysophanol)، گلیکوزید های دیانترون (Dianthrones)، رئين ها (Rheins) و نمک های اگزالاته ی (Oxalate Salts) آن ها، هترودیانترون ها (Heterodianthron) شامل: پالمیدین A, B, C و آنترآکینون هایی (Anthraquinones) مانند رئين می باشد. ریوند افزون بر این ترکیبات دارای تانن (Tannin)، گلوکوکالین (Glycocalyn) و اسیدگالیک (Acid gallic) می باشد [۳۴]. ویژگی های ضد میکروبی، ضد قارچی تانن

موجب جلوگیری از عفونت های میکروبی و قارچی در بافت آسیب دیده می گردد [۱۷،۳۴]. اسید سالیسیلیک به وسیله آمینو اسیدی به نام فنیل آلانین (Phenylamine) به صورت زیستی ساخته می شود. در واقع از اسیدی کردن سدیم سالیسیلات (Sodium Salicylate) به وسیله اسید سولفوریک (Sulfuric Acid)، اسید سالیسیلیک به دست می آید. اسید سالیسیلیک برای درمان موضعی نارسائی های پوست، عفونت های قارچی پوست، شوره سر و آماس های سبوره ای پوست سر به کار می رود. اسید سالیسیلیک از طریق حل کردن ماده چسباننده بین سلولی که پوسته ها را در لایه شاخی به هم متصل می کند باعث سرعت بخشیدن به پوسته ریزی و در نتیجه باعث سست شدن کراتین می شود. این اثر اسید سالیسیلیک ممکن است باعث یک اثر ضد قارچی نیز شود چون برداشت لایه شاخی رشد قارچ را ضعیف می نماید. اسید سالیسیلیک دارای اثر ضد عفونی کننده اندک نیز می باشد [۵۴].

به نظر می رسد ترکیب آریا اورال به دلیل حضور آنتراکینون های موجود در ریوند بتواند از رشد باکتری های *استافیلوکوکوس طلایی (Golden Staphylococcus)*، *استرپتوکوکوس (Streptococcus)* و *کاندیدا آلبیکنس (Candida Albicans)* جلوگیری نماید. ترکیبات گفته شده باعث تغییر شکل پروتئین ها شده، با واکنش با فسفو لیپید غشا باعث نشت سینتوپلاسم میکروارگانیزم ها (ریز اندامکان) می گردد [۴۴]. بر اساس جدید ترین پژوهش های انجام شده گونه ای از ریوند (*Rheum Emodi*) باعث القای ساخت نیتریک اکساید (Nitric Oxide) در ماکروفاژ ها می شود [۶۰]. رئین القاکننده ی آپوپتوز در میان فضای شبکه آندوپلاسمیک و میتوکندری وابسته به مسیر سلول های توموری سنگفرشی زبان انسان می باشد [۵۲]. اثرات ترمیمی امودین که یک آنتراکینون برگرفته از گونه ی ریوند (*Rheum Officinale*) است در زخم های پوستی موش صحرایی مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج خوبی از این ترکیب ارائه شده است [۱۰]. اثرات القا کنندگی امودین و آمیلورت (*Amiloride*) در ساخت ماده زمینه ای سلول های مزوتلیال (*Mesotelial*) شکمی انسان به اثبات رسیده است [۱۵]. آنتراکینون های ناشی از امودین ریوند مهارکننده ی رگ زایی وابسته به تومور هستند که به واسطه ی مهار سیگنال های خارج سلولی تاثیر خود را بروز می دهد [۲۵].

همه این ترکیبات مورد استفاده با وجود اثر بخشی، دارای پیامدهائی می باشد، از این رو بر آن شدیم تا اثرات و پیامدهای احتمالی این ترکیب دارویی جدید قبل از بررسی اثرات آن بر بیماری تب برفکی بررسی شده، به بررسی میزان سمیت سلولی این ترکیب به عنوان بخشی از فرآیند کسب مجوزهای لازم برای ورود دارو به بازار پرداخته شود و با بررسی سمیت سلولی به تعیین حد مجاز و امنیت دارو دست یابیم.

## فصل دوم

### کلیات

#### ۲-۱-۱- اوژینول

#### ۲-۱-۱- گیاه شناسی و انتشار گل میخک

گل میخک گیاهی است از خانواده میرتاسه (Myrtaceae) که نام علمی آن *Syzygium Aromaticum* و هم معنی با *Eugenia Caryophylla* می باشد. میخک تیره ای بزرگ از گیاهان گلدار و دارای نمونه های فراوانی با حدود ۲۰۰۰ گونه است که بیشتر در نواحی معتدل و سرد کره ای زمین به ویژه در نیمکره ی شمالی می روید. در کشور ما نیز نمونه های فراوانی از آن ها (به ویژه از جنس *Silene*) در نواحی گوناگون پراکندگی دارد. شمار زیادی از این گیاهان به علت دارا بودن گل های زیبا و عطر آگین، پیوسته پرورش می یابند [۵].

#### ۲-۱-۲ اندام دارویی

غنچه های باز نشده درخت میخک، بخش دارویی این گیاه می باشد. هر غنچه شامل دو قسمت سر و دنباله است. دنباله میخک شکل استوانه ای داشته و در انتها به نوک باریک می رسد در حالی که سر میخک شامل چهار کاسبرگ بسته کروی واقع در میان کاسه گل است [۶].

#### ۲-۱-۳ ترکیب شیمیایی میخک

از نظر ترکیب شیمیایی، میخک دارای مقدار قابل ملاحظه ای اسانس روغنی فرار می باشد. علاوه بر روغن های فرار، میخک دارای ۱۰ تا ۱۳ درصد تانن و یک ماده بلورین به نام کاریوفیلین (Caryophyllen) و مقادیر مختلفی از اسیدهای تری ترین (Tree Tropaen Acid) و استر (Esters) می باشد. گلیکوزیدهای میخک شامل الکل های آلیفاتیک (Aliphatic)، مونوترپنوئیدها (Monoterpenoid)، اوژینول، ایزواوژینول

(Isoeugenol)، فarnesol)، سیتوسترول (Sitosterol)، نرولیدول (Nerolidol) و کمپسترول (Campesterol) می باشد [۳۷].

## ۲-۱-۴ ویژگی های فیزیکی و شیمیایی اوژینول

میخک درختی کوچک و همیشه سبز است ولی ممکن است ارتفاع آن تا ۱۰ الی ۱۲ متر برسد و برداشت محصول به صورت غنچه های آن از سال دهم آغاز می گردد. غنچه های خشک شده این درخت ظاهری شبیه به میخ کوچک دارد و از این رو به نام میخک خوانده می شود. گیاه میخک دارای اسانسی است که بیشتر از اوژینول تشکیل شده است. مقدار اسانس در غنچه درخت میخک بیشتر از قسمت های دیگر گیاه است. این مقدار حدود ۱۵ درصد وزنی گزارش شده است [۴۴]. ماده موثر روغن میخک، اوژنول با نام شیمیایی ۴-آلیل - ۲ - متوکسی فنول و فرمول  $C_{10}H_{12}O_2$  می باشد [۵۲].

اوژینول مایعی است بی رنگ و یا زرد کم رنگ با مزه ی تند ادویه ای، وزن مولکولی آن  $164/20$  و وزن مخصوص آن  $1/064$  تا  $1/068$  و نقطه جوش آن  $245$  درجه سانتیگراد می باشد [۴۴]. در آب غیر محلول بوده و به نسبت ۱ به ۲ در الکل  $70$  درجه محلول است. با الکل، کلرفرم، اتر، روغن های غیر فرار و اسید استیک گلاسیال (Acid Acetic Glacial) مخلوط می گردد. در محلول هیدروکسید سدیم قابل حل است. سوسپانسیون  $10$  درصد صاف شده آن در آب، pH برابر  $4-7$  دارد. با گذشت زمان و یا در برابر هوا رنگ آن تیره می شود. از تماس آن با روی و آهن بایستی جلوگیری شود. باید در درجه حرارت کمتر از  $25$  درجه سانتیگراد و در ظروف در بسته و دور از نور نگهداری شود [۴۴].

## ۲-۱-۵ اثرات اوژینول

روغن گل میخک که از گلبرگ های آن به دست می آید، کاربردهای پزشکی فراوانی دارد و در ساخت داروها و مواد آرایشی بهداشتی مورد استفاده قرار می گیرد. اوژینول یک ماده غیر سرطانزا و غیر موتازن می باشد [۴۱، ۵۲]. از طرف سازمان غذا و داروی آمریکا (Food and Drug Administration (FDA) به عنوان یک ماده به طور کلی ایمن معرفی شده است [۴۱]. این ماده دارای ویژگی های ضد سرطان زایی، ضد ویروس، ضد میکروب و ضد قارچ می باشد [۲۱، ۲۲، ۵۲، ۶۱]. اوژینول به علت مهار ساخت پروستاگلندین (PG) (Prostaglandin) اثرات ضد دردی و بی حسی موضعی مانند گایاکول (Guayacol) دارد [۴۹]. در دندانپزشکی به عنوان یک ماده طعم دهنده و ضد عفونی کننده مصرف می شود. همچنین به عنوان آرام بخشی قوی در پر کردن دندان به کار می رود [۱۳]. در داروهای تجاری ضد دندان درد به کار می رود [۵۷]. اوژینول را می توان در سل ریوی و قانقاریا استفاده کرد. در موارد عمومی به مقدار  $0/5$  تا  $1$  گرم به صورت کپسول مصرف می شود. به صورت تزریق زیر جلدی نیز در بیماری های پوستی و درمان لوپوس (به صورت محلول روغنی) به کار می رود [۱۳].

این روغن ویژگی ضد میکروبی داشته، دارای مواد معدنی و ویتامین هایی مانند کلسیم، ویتامین آ، ویتامین ث، پتاسیم، فسفر، سدیم، آهن و اسید هیدروکلریک (Hydrochloric Acid) است [۳۳]. کاهش درد دندان، تورم لثه و تب خال در ناحیه دهان از ویژگی روغن گل میخک می باشد. اوژینول همانند بی حس کننده های موضعی موجب مهار هدایت پیام ها از گیرنده های حس درد می شود و با مهار آماس و اثر بر

مسیر درد به صورت مرکزی موجب کاهش درد مزمن نیز می گردد. ساخت دهان شویه با استفاده از این روغن به دلیل اسانس آن باعث می شود تا بوی بد دهان از بین برود. از این روغن در ساخت انواع دهان شویه یا خمیر دندان استفاده می شود. از ترکیب اکسید روی (Zinc Oxide) با روغن ادویه میخک به عنوان ترکیب پرکننده موقت در عصب کشی استفاده می شود [۴۴].

روغن گل میخک برای درمان زخم و آسیب، آثار گزیدگی یا نیش حشرات بویژه در پوست های حساس مفید شناخته شده است. از این روغن در ساخت ترکیبات ضد جوش استفاده شده و در درمان جوش های چرکی کارآمد شناخته شده است [۳۲].

تحریک سیستم عصبی از دیگر ویژگی روغن ادویه گل میخک است. پژوهش ها نشان می دهد، بوئیدن این روغن در رژیم درمانی به طور مستقیم بر سیستم عصبی اثر گذاشته، علاوه بر کاهش خستگی های ذهنی، نشانه های ناشی از استرس را کاهش می دهد. از طرف دیگر از این روغن برای بهبود یا کاهش نشانه های بیماران مبتلا به افسردگی، اضطراب شدید و از دست دادن حافظه استفاده می شود. کاهش حالت تهوع و استفراغ به دلیل اثر بی حسی موضعی، تقویت سیستم گوارش از طریق افزایش جریان آنزیمی از دیگر ویژگی این روغن است [۳۳].

## ۲-۲ ریوند

### ۲-۲-۱ گیاه شناسی و انتشار جغرافیایی ریوند

ریوند عصاره گیاه ریواس می باشد. گیاه ریواس گیاهی علفی از خانواده علف هفت بند است، رنگ سطح گیاه قرمز و در وسط، زرد رنگ است و به آن ریواس چینی می گویند. نام علمی آن *Rheum Officinale* می باشد. این گیاه، گیاهی چند ساله، پایا و به طور طبیعی ارتفاعی ۲ متری دارد. خاستگاه آسیایی داشته و با منطقه ایالات متحده نیز سازگار می باشد. ساقه برگری آن مصرف خوراکی داشته و ریزوم (Rhizome) یا ساقه زیر زمینی آن جنبه دارویی دارد [۳۰].

### ۲-۲-۲ ویژگی ها و اثرات ریوند

در عصاره ریوند علاوه بر آنتراکینون ها، رنین و تانن، موادی مثل نشاسته، آهن، منیزیم و ویتامین های ب و ث وجود دارد که باعث ایجاد تنگی رگ های خونی و مسهل شدن می شود. در پژوهش های انجام شده، ریوند استفاده شده در دهان شویه ها دارای اثر خوب ضد باکتریایی بوده، البته ویژگی ضد قارچی آن ضعیف گزارش شده است [۹].

ریوند دارای تانویدهایی (Tenuate) از جمله کاتشین (Catechine) و نیز مشتقات آنتراکینون نظیر امودین است. مقادیر کم ریوند (۳۰۰-۱۰۰ میلی گرم) تلخ، اشتها آور و تحریک کننده هضم می باشد ولی مقادیر زیادتر و درمانی آن اثر ملین و مسهلی ملایم دارد [۳۴، ۶۰].

ریوند در درمان اسهال، یرقان (زردی)، خونریزی معده و روده، نارسائی های وابسته به قاعدگی، ورم ملتحمه، زخم های جراحی، زخم های چرکی سطحی، و زخم معده مورد استفاده قرار می گیرد. همچنین کاربرد موضعی برای درمان سوختگی ها دارد. به دلیل داشتن پتاسیم بالا باعث کاهش سدیم می شود و در نتیجه

فشار خون را کاهش می دهد. لوتئین موجود در آن در خنثی سازی رادیکال های آزاد که به بروز سرطان منجر می شوند، موثر است [۳۰].

## ۲-۲-۳ اثرات سرکه سیب

سرکه سیب یکی از فرآورده های سیب و دارای انواع فلاونوئیدها از جمله کامپفرول (Kaempferol)، کاتچین (Catechin)، آنتوسیانین (Anthocyanin)، سیانیدین (Cyanidin)، گلوکوزیدها (Glycoside) و اسید های آلی مانند اسید استیک (Acetic Acid) و اسید مالئیک (Malic Acid) می باشد [۵۱]. سرکه ویتژیکی ضد ویروسی دارد و به دلیل آزاد کردن هیدروژن باعث نابودی سلول های ویروسی و باکتریایی می شود [۵۰، ۱۷]. سرکه سیب در پیشگیری از فشار خون کارآمد بوده، هم چنین باعث سم زدایی در بدن می شود. بتاکاروتن ( $\beta$ -Carotene) آن ویتژیکی ضد اکسیدانی و ضد رادیکال های سوپراکسید (Superoxide) و هیدروکسیل (Hydroxyl) دارد و برای درمان کلسترول بالا، دیابت، سنگ های صفراوی و کاهش وزن مورد استفاده قرار می گیرد [۵۱].

## ۳-۲-۳ بیماری تب برفکی

### ۱-۳-۲ تعریف بیماری

تب برفکی یکی از بیماری های ویروسی بومی ایران است که با راه اندازی واحد های دامی فشرده صنعتی سالانه باعث خسارت زیادی به واحد های دامی کشور می شود. فراوانی زیر تیپ های ویروسی و قدرت انتقال بالا، واکسیناسیون را مشکل و پرهزینه کرده است. استفاده از ترکیبات گیاهی، یکی از روش های درمانی است که امروزه در سطح دنیا به دلیل پیامدهای کمتری که نسبت به مواد شیمیایی دارد مورد توجه بیشتری قرار گرفته است [۱۴].

## ۲-۳-۲ فراوانی تب برفکی

بیماری تب برفکی در جریان قرن ۱۹ در بیشتر مناطق اروپا، آسیا، آفریقا، آمریکای شمالی و جنوبی فراگیر بوده. یک بار نیز در استرالیا شیوع پیدا کرده است [۷، ۸]. این بیماری در کشورهای زیادی وجود دارد و عامل واگیری شدید بین گاوها، گوسفندان و خوک می باشد [۷]. علاوه بر این ۷۰ گونه از پستانداران وحشی در برابر عفونت طبیعی و یا آزمایشگاهی این ویروس حساسیت نشان داده اند [۷]. گوناگونی شمار سویه ها و تحت تیپ های این ویروس باعث پیچیدگی برنامه های کنترل و پیش گیری در بیماری شده است [۷، ۸، ۱۵]. این بیماری به عنوان یک مشکل جهانی به درجه ای از اهمیت رسیده است که بانک جهانی به کشورها برای جلوگیری و پیش گیری از آن کمک می نماید. این بیماری در بیشتر مناطق دنیا به شکل همه گیری های بزرگی در گله های گاو و خوک دیده می شود. البته گوسفندان در بسیاری از گونه های وحشی هم نسبت به بیماری حساس هستند و میزان ابتلا به بیماری زیاد می باشد [۱۱]. بر اساس اطلاعات موجود در آمریکای جنوبی سویه های O, A, C در بیشتر کشورهای این منطقه بومی می باشند، در اروپا میزان رخداد بیماری کم است و در آفریقا سویه های SAT1, SAT2, SAT3, O, A, C در بیشتر کشورهای این منطقه بومی است [۷].

## ۲-۳-۳ سویه های مختلف بیماری

ویروس تب برفکی از خانواده پیکورناویریده و جنس آفتووایروس می باشد. جنس آفتووایروس بدون غشاء و کپسول بوده، به شکل بیست وجهی متقارن و با قطر بین ۲۷ الی ۳۰ میکرون می باشد. افزایش شمار ویروس در داخل سیتوپلاسم سلول های میزبان رخ می دهد. جنس آفتووایروس دارای سروتیپ های زیر می باشد. A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3 و Asia که به وسیله آزمون های سرمی مانند ثبوت مکمل، خنثی ساختن ویروس به وسیله سرم و واکنش الایزا و هم چنین ایمنی متقاطع، شناسایی می شوند [۷،۸،۱۱]. این تیپ ها را می توان به وسیله آزمون های دو رگه سازی RNA به دو گروه تقسیم کرد. یکی شامل تیپ های A, C, O و Asia و دیگر تیپ ها شامل SAT1, SAT2, SAT3 می باشد [۷]. تیپ های بومی ویروسی تب برفکی در ایران تیپ های A, O می باشد که در سال ۱۳۸۷ نیز گزارش گردید [۷].

Asia1 نیز در چندین مورد از واگیری ها جدا شده و تیپ SAT1 نیز یکبار در ایران رخنه نمود و یک تا دو سال در کشور باقی ماند. تیپ O اولین بار در سال ۱۳۲۵ در ایران جدا شد و پس از آن همه ساله واگیری های فراوانی در اثر این تیپ بروز می کند [۱۱،۱۸]. همه گیری تیپ Asia1 تب برفکی چندین بار در سال های مختلف وجود داشته است که مهم ترین این موارد در سال ۱۳۵۲ بوده است که شدیدترین و پرخسارت ترین واگیری تب برفکی در ایران به شمار می رود [۷،۱۱]. همچنین در سال ۱۳۷۹ و ۱۳۸۰ در ایران از بافت پوششی ۳۴ گوسفند و ۳۳۸ گاو، سویه های Asia1, A, O ویروس تب برفکی جدا شده است [۱۶].

## ۲-۳-۴ راه های انتقال ویروس

در بیشتر واگیری های تب برفکی سرعت انتشار بیماری خیلی زیاد است. در دام های بیمار ترشح و تاول بیش از سایر قسمت ها دارای ویروس هستند [۱۶]. انتقال بیماری در بین دام های یک گله شاید به وسیله ی ترشحات بزاق صورت گیرد [۷،۸]. تنفس ذرات آلوده به ویروس، مهم ترین راه آلودگی دام ها است [۱۱،۱۶]. دفع زیاد ویروس از طریق ذره های معلق شیر از نظر همه گیرشناسی و کنترل بیماری دارای اهمیت بسیار است و نیز انتشار ویروس به مناطق دور دست توسط ذره های معلق صورت می گیرد [۱۱].

## ۲-۳-۵ روش ها و مواد درمانی در تب برفکی

در کشورهای اندمیک در مرحله اول، پیش گیری با واکسیناسیون انجام می شود [۱۲،۵۷]. در بعضی کشورها کشتار دام های مبتلا لازم است بنابراین در این گونه کشورها به درمان بیماری پرداخته نمی شود [۸،۱۶]. از جمله کارهای مهم برای درمان، قرار دادن دام در یک محل گرم است، که در روند بهبودی خیلی مهم می باشد و از پدیدار شدن پیامدهای ریوی بیماری که اغلب کشنده است، جلوگیری می نماید. همچنین واکسینه کردن با واکسن های کشته و واکسن های چندگانه مورد استفاده قرار می گیرد [۹]. به منظور جلوگیری از پیامدها و عفونت های بعدی، درمان های عمومی صورت می گیرد [۱۶]. درمان شامل استفاده از محلول های دهان شویه مانند سرکه و گلیسیرین یده، جوش شیرین، پادزیست های (آنتی بیوتیک) عمومی و داروهای ضد آماس موضعی و عمومی مانند داروی فلونکسین مگلو مین می باشد [۱۵].

به دلیل پیامدهای جانبی داروهای شیمیایی امروزه نه تنها در ایران، بلکه در سراسر جهان گرایش به طب گیاهی افزایش یافته است [۶۰]. از ترکیب های درمانی گیاهی موجود در بازار میرتووت (Mirtovet) یک فرآورده گیاهی و دارای ۵٪ اسانس از گیاه گل میخک می باشد. این اسانس می تواند از رشد باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*)، پseudوموناس ائروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) و اشرشیا کلای (*E-Coli*) جلوگیری کند [۳۵]. عرق پونه (*Ziziphora*) با ویژگی چندگانه (ضد ویروس، ضد میکروب، ضد آماس، ضد درد، بی حس کنندگی و بهبود بخشی) ویژگی های لازم را برای درمان آسیب های دهانی و تاول های سمی بیماری تب برفکی دارا است و از سرعت پیشرفت و خسارات ناشی از بیماری می کاهد [۴۷].

## ۲-۳-۶ ویژگی های ترکیب دارویی آریا اورال

ترکیب دارویی آریا اورال از اوژینول و ریوند به عنوان اجزای اصلی و اتانول و سرکه سیب به عنوان نگهدارنده تشکیل شده است. اوژینول ترکیبی است که از عصاره گل میخک (Clove) گرفته می شود. اوژینول یک خانواده ی بزرگ از ترکیبات هستند که در صنعت دارو سازی از آنها در فرموله کردن حشره کش ها به علت ویژگی ضد اکسیدانی آنها استفاده می شود [۳۱، ۵۰]. اثرات مفیدی از اوژینول گزارش شده است که یکی از آنها ویژگی ضد باکتریایی آن بر باکتری های گرم مثبت شامل استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس آگلالتیه (*Streptococcus agalactiae*)، کورینه باکتریوم پseudوتوبرکولوزیس (*Corynebacterium pseudotuberculosis*)، انتروکوکوس فیکالیس (*Enterococcus faecalis*)، باسیلوس سرئوس (*Bacillus*)، کلسترییدیوم پرفرنژانس (*Clostridium perfringens*)، لیستریا مونوسیتوژنز (*Listeria monocytogenes*) و باکتری های گرم منفی شامل اشرشیا کلای، سالمونلا تیفی موریوم (*Salmonella typhimurium*)، پاستورلا مولتوسیدا (*Pasteurella multocida*)، و پseudوموناس ائروژینوزا می باشد [۴۸]. میزان بالای اوژینول در اسانس گل میخک سبب به دام انداختن رادیکال های آزاد می شود [۴۲]. آریا اورال دارای خاصیت قابض کننده (Astringency) می باشد و موجب محافظت لایه های بیرونی مخاط لثه ها در مقابل میکروب ها و مواد شیمیایی محرک با رسوب پروتئین های سطحی می شود. همچنین ترشح غشاء مخاطی دهان را کاهش می دهد و از رشد باکتری های استافیلوکوکوس، استرپتوکوکوس، یرسینا پروتئوس (*Yersinia proteus*) و کاندیدا آلبیکنز جلوگیری می کند [۶۰].

## ۲-۴ ارزیابی سمیت سلولی

ارزیابی سمیت سلولی به منظور تعیین بیشترین دوز مجاز یک ترکیب صورت می گیرد. برای این ارزیابی مراحل مختلف کشت سلولی، تهیه رقت های مورد نیاز و سپس تعیین میزان سلول های زنده انجام می گیرد. روش های مختلفی برای این مراحل وجود دارد که هر کدام برتری و کاستی هائی دارد. تهیه رقت ها بر اساس اطلاعات گذشته پایه گذاری می شود و روش تعیین نتایج بر اساس امکانات و هدف انجام می گردد. خواندن نتایج به روش های مختلفی صورت می گیرد مثل روش MTT (Microwave Theory and Technique) و روش Neutral Red Uptake assay (NHK NRU assay). تفاوت این دو روش در رنگ آمیزی می باشد. در