



بررسی تأثیر اولئوروپین بر پروفایل سایتوکایینی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید

مطهره درگاهی^{۱*}، نیلوفر طاهری^{۱*}، زهرا یوسفی^۲، فاطمه توفان^۳، رضا جعفری^{۲*}

۱- دانشجوی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

۲- استادیار، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

۳- استادیار، گروه علوم بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۲۰، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۱۹

چکیده

مقدمه: با توجه به شیوع بیماری‌های التهابی و عوارض داروهای سنتتیک، یافتن روش‌های درمانی نوین به‌ویژه استفاده از طب سنتی و داروهای گیاهی می‌تواند راهکار مفیدی در مدیریت بیماری‌های التهابی باشد. استفاده از زیتون و فرآورده‌های آن (اولئوروپین) هم به‌عنوان آنتی‌اکسیدان و هم مهارکننده التهاب می‌تواند در کاهش روند التهابی مفید باشند. در مطالعه حاضر اثرات اولئوروپین بر پروفایل سایتوکایینی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: از ۴۰ بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید ۵ سی سی خون تهیه شد. سلول‌های تک هسته‌ای به کمک فایکول جدا شدند و در حضور یا عدم حضور اولئوروپین و فیتوهماگلوآنینین کشت داده شدند پس از ۷۲ ساعت غلظت فاکتور نکروزدهنده تومور-آلفا (TNF- α) و اینترلوکین-۴ (IL-4) در سوپرناتانت سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده با روش ایمنونواسی سنجیده شد. نتایج به کمک آزمون آماری *t-test* و ANOVA تجزیه و تحلیل گردید.

نتایج: داده‌ها کاهش معنی‌دار TNF- α را در PBMCs تیمار شده با اولئوروپین در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده نشان داد ($P < 0/0001$) نتایج کاهش معنی‌داری را در غلظت ۱۰۰ میکروگرم اولئوروپین نسبت به دیگر غلظت‌ها نشان داد. سطح IL-4 در سوپرناتانت سلول‌های تیمار شده با اولئوروپین به‌طور معنی‌دار و وابسته به دوز افزایش یافت ($P < 0/0001$).

نتیجه‌گیری: اولئوروپین با افزایش تولید فاکتور ضدالتهابی IL-4 و کاهش سطح TNF- α می‌تواند در کاهش التهاب بیماری‌های التهابی به‌ویژه آرتریت روماتوئید مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: آرتریت روماتوئید، IL-4، اولئوروپین، TNF- α .

*نویسنده اول مشترک

*نویسنده مسئول: شاهرود-میدان هفت تیر-دانشکده پیراپزشکی-دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، تلفن: ۰۲۳-۳۲۳۹۵۰۵۴، شماره: ۰۲۳-۳۲۳۹۵۰۵۴، Email: Jafari.r@shmu.ac.ir

ارجاع: درگاهی مطهره، طاهری نیلوفر، یوسفی زهرا، توفان فاطمه، جعفری رضا. بررسی تأثیر اولئوروپین بر پروفایل سایتوکایینی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۲؛ ۱۸(۲): ۵۳-۵۹.

مقدمه

بیماری آرتریت روماتوئید یک بیماری خود ایمن مزمن است که علت آن تاکنون شناخته نشده است و تقریباً ۱٪ جمعیت دنیا را مبتلا ساخته است (۱). در این بیماری رسوب کمپلکس‌های ایمنی در مفاصل و متعاقب آن فعال شدن سلول‌های ایمنی و تولید فاکتور التهابی منجر به آسیب و تخریب مفاصل در دراز مدت خواهد شد (۲). نقش سلول‌های التهابی نظیر مونوسیت‌ها، ماکروفاژها، لنفوسیت‌های T کمکی (Th1) و Th17 در ایمنوپاتوژنز این بیماری مشخص شده است (۳). این سلول‌ها با تولید سایتوکاین‌های التهابی مانند اینترلوکین-۶ (IL-6) و فاکتور نکروز دهنده تومور-آلفا (TNF-α) موجب تشدید پاسخ‌های التهابی می‌شوند (۴). دو زیر گروه اصلی از لنفوسیت‌های TCD4+ یعنی Th1 و Th2 در شرایط التهابی دارای نقش و عملکرد متفاوتی هستند (۵). به طوری که فعالیت لنفوسیت‌های Th1 و ترشح سایتوکاین‌های التهابی آن از جمله IFN-γ موجب تقویت و تشدید شرایط التهابی می‌گردد و روند بیماری‌های خودایمنی که شرط اصلی آنها التهاب است را تسریع می‌کند. از سوی دیگر لنفوسیت‌های Th2 با فعالیت ضدالتهابی خود و ترشح سایتوکاین‌هایی مثل IL-4 و IL-10 با کاهش التهاب سرعت پیشرفت بیماری‌های خود ایمنی را کاهش می‌دهد (۶ و ۷) IL-4 که از سایتوکاین‌های اصلی تولید شده توسط لنفوسیت‌های Th2 می‌باشد با سرکوب پاسخ‌های ایمنی القاء شده توسط لنفوسیت‌های Th1 و تبدیل ماکروفاژهای التهابی M1 به فنوتیپ ضدالتهابی M2 پاسخ‌های التهابی را کاهش می‌دهد (۸).

سابقه درمان با گیاهان دارویی به قدمت زندگی انسان‌هاست و امروزه استفاده از درمان‌های گیاهی با شناخت دقیق‌تر اجزا و ترکیبات شیمیایی گیاهان، بیش از پیش گسترش یافته است (۹). تحقیقات گسترده در زمینه تأثیر عصاره‌های گیاهی بر عملکرد سیستم ایمنی، سلول‌های سرطانی یا شرایط التهابی نشان داده است که ترکیبات فلاونوئیدی گیاهان دارای اثر ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌ویروسی و ضدسرطانی می‌باشند (۱۰). برگ درخت زیتون یکی از گیاهان دارویی با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. در گذشته از زیتون برای درمان بیماری‌های مختلف از جمله کاهش تب استفاده می‌شده است (۱۱). علاوه بر این، برگ درخت زیتون اثرات مفیدی در کاهش کلسترول و بیماری‌های قلبی دارد (۱۲) برگ درخت زیتون غنی‌ترین منبع ترکیبات فنولی با خاصیت آنتی‌اکسیدان می‌باشد. اولئوروپین (Oleuropein) فراوان‌ترین ترکیب فنولی موجود در زیتون است (۱۳ و ۱۴). همچنین اولئوکانتال ترکیب فنولی دیگر موجود در روغن زیتون با خواص ضدالتهابی مشابه ایبوپروفن است که ناشی از سرکوب مسیر ساخت پروستاگلندین‌ها است (۱۵). در مطالعات نشان داده شده است که فلاونوئیدها با مهار فعالیت آنزیم‌های مختلف مثل پروتئین کیناز c، فسفولیپاز A2 و فسفودی استراز باعث

کاهش علائم التهاب می‌شود (۱۰). مهار این آنزیم‌ها مانع فعالیت سایتوکاین‌ها و پروستاگلاندین‌ها و هیستامین می‌شود و اثر ضد التهابی دارد (۱۶). همچنین مطالعات نشان داده‌اند که روغن زیتون باعث کاهش فاکتورهای التهابی مانند IL-6، TNF-α و پروتئین واکنشگر C (CRP) می‌شود (۱۷).

نتایج مطالعه دومینیکو گراناتوو همکاران نشان داد که امولسیون حاوی روغن زیتون در مقایسه با امولسیون حاوی روغن دانه سویا می‌تواند عملکرد سلول‌های سیستم ایمنی را به صورت انتخابی کنترل کرده و با تقویت اثر حفاظتی سیستم ایمنی التهاب را مهار کند (۱۸). روزینولی و همکاران دریافتند که فنول‌های موجود در روغن زیتون میزان بیان COX2، PGE2 و پروستا گلندین E2 و رادیکال ازاد اکسیژن به مقدار قابل توجهی کاهش می‌دهد (۱۹). در مدل حیوانی میوکاردیت و در حضور اولئو روپین ارتشاح سلول‌های CD8+، TCD4+ و ماکروفاژها در ناحیه میوکارد و اندوکارد بافت قلبی به طور چشمگیری کاهش پیدا می‌کند. علاوه بر این، سطح سرمی فاکتورهای التهابی از جمله TNF-α، IL-1β و IL-6 و پیشرفت بیماری خودایمن میوکارد قلبی به واسطه مداخله در مسیر NF-κB کاهش می‌یابد (۲۰). در مدل تجربی کولیت مزمن نشان داده شده است که مصرف اولئوروپین میزان سایتوکاین‌های التهابی از جمله IL-1β و IL-6 در بافت رودی کاهش می‌دهد در حالی که میزان سایتوکاین IL-10 افزایش می‌یابد (۲۱).

بنابراین، در این مطالعه قصد داشتیم تأثیر اولئوروپین را بر سطح سایتوکاین‌های TNF-α و IL-6 در کشت سلول‌های تک هسته‌ای خود محیطی بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید را بررسی کنیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی، ۴۰ بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید که بیماری آنها بر اساس معیارهای انجمن روماتولوژی آمریکا (DAS28) تأیید گردیده انتخاب شدند. این مطالعه مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شاهرود قرار گرفته است (IR.SHMU.REC.1400.139). پس از اخذ رضایت آگاهانه از همه شرکت کنندگان در این مطالعه، ۵ سی سی خون محیطی تهیه شد نمونه‌های خون ابتدا سانتریفیوژ شدند و سرم نمونه‌ها جدا شد و تا زمان اندازه‌گیری CRP در یخچال ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از آنجایی که هدف از این مطالعه تأثیر اولئوروپین بر تولید سایتوکاین‌های التهابی و ضدالتهابی در کشت سلولی بود بیماران بدون محدودیت سنی و جنسی انتخاب شدند. بیماران که سابقه هپاتیت یا سایر بیماری‌های خود ایمنی دیگر را داشتند از مطالعه خارج شدند. همچنین بیماران که عفونت و عمل جراحی داشته‌اند از مطالعه کنار گذاشته شدند.

نمونه‌های بیماران با استفاده از بافر نمکی PBS به نسبت ۱:۱ رقیق شدند و با استفاده از فایکول ۷۶/۰ و سانتریفیوژ کردن به مدت ۲۰ دقیقه

ANOVA استفاده شد و چنانچه معیارهای پارامتریک وجود نداشت از تجزیه و تحلیل‌های ناپارامتریک مانند Mann Whitney و Kruskal Wallis استفاده گردید. همچنین جهت بررسی ارتباط فاکتورهای دموگرافیک و گروه‌های درمانی از آزمون Chi square استفاده شد. درصد خطای کمتر از ۰/۰۵ درصد به عنوان اختلاف معنادار در نظر گرفته شد. همچنین با استفاده از نرم‌افزار PRISM 7 نمودارها ترسیم و بخشی از نتایج به صورت میانگین خطای استاندارد (Mean \pm standard error of mean) گزارش شد.

نتایج

جدول ۱ اطلاعات شرکت‌کنندگان در مطالعه را نشان می‌دهد. از تعداد ۴۰ بیمار شرکت‌کننده در مطالعه ۲۵ نفر (۶۲/۵٪) زن و ۱۵ نفر (۳۷/۵٪) مرد بودند. میانگین سنی شرکت‌کنندگان ۱۰±۴۰ سال بود. شدت بیماری بر اساس معیارهای تعیین شده در انجمن روماتولوژی آمریکا موسوم به DAS28 توسط متخصص روماتولوژی انجام شد. طول مدت بیماری آرتريت روماتوئید در بیماران به طور متوسط ۲۳/۳±۶۵/۵ سال بود. غلظت سرمی CRP و فاکتور روماتوئید (RF) به ترتیب ۱۳/۵۱±۵/۵ ml/U و ۸۲/۹۵±۴/۸۲ mg بود.

جدول ۱- اطلاعات دموگرافیک و آزمایشگاهی بیماران

ویژگی	
جنس	
مرد	۱۵ نفر (۳۷/۵٪)
زن	۲۵ نفر (۶۲/۵٪)
سن	
	۱۰±۴۰
شدت بیماری (DAS28)	
فاز بهبودی	۴ نفر (۱۰٪)
خفیف	۱۸ نفر (۴۵٪)
متوسط	۱۴ نفر (۳۵٪)
شدید	۴ نفر (۱۰٪)
CRP	۸۲/۹۵±۴/۸۲
RF	۱۳/۵۱±۵/۵ ml/U

نتایج MTT نشان داد که اولئوروپین بر زنده ماندن سلول‌ها در هیچ یک از غلظت‌های مورد بررسی هیچ اثر قابل توجهی ندارد. شکل ۱ اثرات سمی مواد استفاده شده را نشان می‌دهد.

نتایج اختلاف معنی‌داری را در غلظت TNF- α در مایع رویی کشت سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران آرتريت روماتوئید تیمار شده با اولئوروپین در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده نشان داد ($P < 0/001$) (شکل ۲).

همانگونه که در شکل ۳ دیده می‌شود اولئوروپین میزان TNF- α را در PBMCs کشت داده شده به طور معنی‌داری کاهش داد ($P < 0/0001$). نتایج کاهش بیشتری را در سطح TNF- α در سلول‌های تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر اولئوروپین نشان داد.

با دور rpm ۲۸۰۰ جمعیت PBMCs جدا شدند. سپس سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با استفاده از PBS استریل سه بار شستشو داده شدند و در فلاسک و در حضور محیط کشت RPMI کشت داده شدند. با استفاده از خاصیت عدم چسبندگی لئوسیت‌ها و چسبندگی منوسیت‌ها به ته فلاسک، لئوسیت‌ها جدا شدند و برای ارزیابی‌های بیشتر مورد استفاده قرار گرفتند.

سنجش اثر سایتوتوکسیک اولئوروپین بر PBMCs بیماران آرتريت روماتوئید

با استفاده از آزمون MTT که شرح آن در مطالعات قبل آمده است (۲۲) اثرات سمی غلظت‌های مختلف اولئوروپین در حضور حلال آن DMSO و تحریک‌کننده سلول‌های تک هسته‌ای یعنی PHA بررسی شد.

بررسی اثرات اولئوروپین بر PBMCs بیماران آرتريت روماتوئید جمعیت سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده از خون افراد مورد مطالعه در پلیت‌های کشت ۲۴ خانه در حضور محیط کشت RPMI و افزودنی‌های لازم به همراه PHA کشت داده شدند. سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم از میلی‌لیتر اولئوروپین و یا بدون تیمار با اولئوروپین کشت داده شدند. پس از ۷۲ ساعت مایع رویی کشت (سوپرناتانت) برای تعیین غلظت سایتوکاین‌های TNF- α و IL-4 مورد استفاده قرار گرفت.

جهت سنجش میزان سایتوکاین‌های TNF- α و IL-4 در سوپرناتانت کشت سلولی از کیت الایزا شرکت Bioassay Technology Laboratory (E009Hu) ساخت کشور چین استفاده شد. به طور خلاصه میزان ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه سوپرناتانت به چاهک‌های پلیت مربوطه اضافه شد. پس از سه بار شستشو با بافر PBS میزان ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی کونژوگه شده با انزیم پراکسیداز به چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از شستشو به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط و در تاریکی انکوبه شدند. واکنش آنتی ژن-آنتی‌بادی به کمک ۱۰۰ میکرولیتر بافر Stop متوقف گردید. جذب چاهک‌ها در ۴۵۰ نانومتر با استفاده از الایزا ریدر قرائت شدند و غلظت TNF- α و IL-4 به کمک منحنی استاندارد تعیین شد. حساسیت کیت الایزا برای IL-4 به میزان ۲/۴۳ نانوگرم بر لیتر، CV < 8% و Intra assay: CV < 8% و Inter-Assay: CV < 10% بود. حساسیت کیت الایزا برای TNF- α ۱/۵۲ نانوگرم بر لیتر، CV < 5% و Intra assay: CV < 10% و Inter-Assay: CV < 10% بود.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS statistics 20 انجام گردید. برای مقایسه تفاوت بین سوپرناتانت سلول‌های تیمار شده با ماده مؤثره روغن زیتون و بدون ماده مؤثره و با توجه به تعداد نمونه‌های مورد مطالعه چنانچه معیارهای نرمالیتی و برابری واریانس برقرار باشد از تجزیه و تحلیل student t test و one way

(۱۳، ۲۶). تأثیر ضدالتهابی روغن زیتون با کاهش التهاب مزمن و از طریق اثر بر آراشیدونیک اسید و مسیر سیگنالینگ NF-kB می باشد (۲۷).
 ائوروپین به عنوان پلی فنول اصلی موجود در روغن زیتون از طریق مهار بیان و فعالیت فاکتورهای مختلف از جمله فاکتور رشد، هورمون ها و سایتوکاین پیش التهابی اثرات مختلفی را نشان می دهد (۲۸ و ۲۹).

در مطالعه ای سانتانگلو و همکاران اثرات درمانی روغن زیتون فوق بکر (EVOO) را در بیماری های التهابی که به واسطه سیستم ایمنی تشکیل می شوند مثل آرتریت روماتوئید، بیماری التهابی روده (IBD)، مالتیپل اسکلروزیس (MS)، لوپوس ... نشان داد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که EVOO و ترکیبات فنولی موجود در آن می تواند با هدف قراردادن مسیرهای مولکولی التهاب و علائم بیماری های التهابی را کاهش دهد (۳۰). همچنین در مطالعه دیگری ژانگ و همکاران نشان دادند که ائوروپین می تواند با مداخله در مسیر NF-kB، سبب کاهش سطوح سرمی فاکتورهای التهابی از جمله IL-1 β ، TNF- α ، IL-6 گردد (۲۰).
 مصرف ائوروپین در رت هایی با IBD افزایش سطح سایتوکاین ضدالتهابی IL-10 را علاوه بر کاهش میزان سایتوکاین های التهابی IL-6، IL-1 β نشان داد (۲۱). در راستای مطالعات انجام شده نتایج به دست آمده از این مطالعه نیز کاهش معنی دار سطح TNF- α و افزایش سایتوکاین ضدالتهابی IL-4 را در سوپرناتانت سلول های تک هسته ای خون محیطی تیمار شده با غلظت های مختلف ائوروپین نشان داد.

در مطالعه دیگری کامونی و همکاران اثرات روغن زیتون و آرگان را بر استرس اکسیداتیو و التهاب ایجاد شده توسط لیپولی ساکارید (LPS) باکتری های گرم منفی را بر کبد موش مورد بررسی قرار دادند. نتایج به دست آمده اثرات ضدالتهابی روغن آرگان و به میزان کمتری روغن زیتون را در برابر آسیب حاد کبدی نشان داد. این ترکیبات اثرات محافظتی خود را با تنظیم کاهشی ژن های کدکننده سایتوکاین های پیش التهابی نظیر TNF- α ، IL-6 و افزایش بیان ژن های کدکننده سایتوکاین های مهارکننده التهاب IL-4 و IL-10 نشان دادند. این در حالی است که نتایج مطالعه ما نیز کاهش معنی دار میزان TNF- α و افزایش چشمگیر غلظت IL-4 را در سوپرناتانت سلول های تک هسته ای بیماران دارای آرتریت روماتوئید در غلظت بهینه ائوروپین (۱۰۰ میکروگرم) نسبت به سلول های تیمار نشده نشان داد.

همچنین در مطالعه ای که به بررسی تأثیرات روغن زیتون های تونسسی بر آزاد سازی مدياتورها و سایتوکاین ها توسط سلول های بازوفیلی انجام گردید، پژوهشگران نشان دادند که روغن زیتون نوع Sayali تولید TNF- α و IL-4 را به صورت وابسته به دوز مهار می کند. همچنین غلظت های مختلف روغن زیتون نوع Zarrazi به شکل وابسته به دوز آزادسازی هیستامین و IL-4 مهار می کند (۳۳). تفاوت در اثرات ترکیبات فنولی روغن زیتون بر میزان IL-4 در مقایسه با نتایج به دست آمده از این مطالعه

تجزیه و تحلیل داده ها حاکی از افزایش معنی داری در غلظت IL-4 در سوپرناتانت PBMCs تیمار شده در مقایسه با سلول های تیمار نشده بود (شکل 4a, b, c).

نتایج افزایش سطح IL-4 را در غلظت های مختلف ائوروپین در مقایسه با گروه کنترل نشان داد (شکل ۵). اگرچه تمام غلظت های استفاده شده سطح IL-4 را نسبت به گروه کنترل افزایش دادند اما این افزایش در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر ائوروپین در مقایسه با سایر غلظت ها اختلاف معنی داری را نشان داد ($P < 0.001$).

بحث

مطالعه حاضر با هدف تعیین سطح سایتوکاین های TNF- α و IL-4 در سوپرناتانت سلول های تک هسته ای خون محیطی بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید که با غلظت های مختلف ائوروپین تیمار شدند انجام گردید. بر اساس داده های دموگرافیک به دست آمده از پرونده بیماران، میانگین سنی شرکت کنندگان مبتلا به بیماری آرتریت روماتوئید 40 ± 10 سال بود. همچنین تعداد بیماران زن در مقایسه با مردان بیشتر بود. این نتایج با شیوع بیشتر این بیماری در زنان در مقایسه با مردان قابل توجیه است. در مطالعات مختلف شیوع بیماری ۰/۴ تا ۱/۳٪ در جمعیت های مختلف بسته به سن و جنس تخمین زده شده است. زنان ۳-۴ برابر بیشتر از مردان به این بیماری اتوایمن مبتلا می شوند و پیک تشخیص آرتریت روماتوئید در دهه ششم زندگی است. نتایج سطح سرمی CRP در بیماران $8.95 \pm 4/82$ بود. با این حال به دلیل این که بیماران تحت درمان بودند، میزان CRP در مقایسه با بیمارانی که بیماری آنها به تازگی تشخیص داده شده کمتر بود. همچنین سنجش سطح TNF- α و IL-4 در سوپرناتانت سلول های تیمار شده با غلظت های مختلف ائوروپین کاهش معنی دار میزان TNF- α و افزایش تولید IL-4 را نشان داد.

این نتایج نشان می دهد که استفاده از رژیم های غذایی حاوی ترکیبات فنولی مانند ائوروپین، کورکومین (Curcumin) و رزوراترول (Resveratrol) می تواند با کاهش فاکتورهای پیش التهابی و افزایش بیان فاکتورهای مهارکننده التهاب اثرات مفیدی در پیشگیری و درمان بیماری های مختلف التهابی از جمله آرتریت روماتوئید داشته باشند. روغن زیتون به دلیل دارا بودن ترکیبات پلی فنولی می تواند سبب کاهش بیومارکرهای التهابی و اثرات محافظتی در بافت های مختلف از جمله قلب گردد (۲۳). مواد پلی فنولی موجود در روغن زیتون همچنین اثرات ضدالتهابی و محافظتی در مفاصل مدل های موشی مبتلا به آرتریت روماتوئید نشان دادند. در مطالعه ای دیگر، کشت سلول های فیبروبلاست در حضور روغن زیتون کاهش سایتوکاین التهابی IL-1 β را از طریق مهار مسیر NF-kB نشان داد (۲۴ و ۲۵). همچنین روغن زیتون با مهار سایتوکاین مهم پیش التهابی شامل IL-1 β ، TNF- α ، IL-6 در سلول های سینوویال اثرات مفیدی را در درمان آرتریت روماتوئید نشان داده است

13. Iacono A, Gómez R, Sperry J, Conde J, Bianco G, Meli R, et al. Effect of oleocanthal and its derivatives on inflammatory response induced by lipopolysaccharide in a murine chondrocyte cell line. *Arthritis & Rheumatism* 2010;62:1675-82. doi: 10.1002/art.27437
14. Lucas L, Russell A, Keast R. Molecular mechanisms of inflammation. Anti-inflammatory benefits of virgin olive oil and the phenolic compound oleocanthal. *Current Pharmaceutical Design* 2011;17:754-68. doi: 10.2174/138161211795428911
15. Beauchamp GK, Keast RS, Morel D, Lin J, Pika J, Han Q, et al. Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* 2005;437:45-6. doi: 10.1038/437045a
16. Haloui E, Marzouk B, Marzouk Z, Bouraoui A, Fenina N. Hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves: Potent anti-inflammatory and analgesic activities. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 2011;9:128-33.
17. Fernandes J, Fialho M, Santos R, Peixoto-Placido C, Madeira T, Sousa-Santos N, et al. Is olive oil good for you? A systematic review and meta-analysis on anti-inflammatory benefits from regular dietary intake. *Nutrition* 2020;69:110559. doi: 10.1016/j.nut.2019.110559
18. Granato D, Blum S, Rössle C, Le Boucher J, Malnoë A, Dutot G. Effects of parenteral lipid emulsions with different fatty acid composition on immune cell functions in vitro. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 2000;24:113-8. doi: 10.1177/0148607100024002113
19. Rosignoli P, Fuccelli R, Fabiani R, Servili M, Morozzi G. Effect of olive oil phenols on the production of inflammatory mediators in freshly isolated human monocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2013;24:1513-9. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.12.011
20. Zhang J-Y, Yang Z, Fang K, Shi Z-L, Ren D-H, Sun J. Oleuropein prevents the development of experimental autoimmune myocarditis in rats. *International Immunopharmacology* 2017;48:187-95. doi: 10.1016/j.intimp.2017.05.013
21. Giner E, Recio M-C, Rios J-L, Giner R-M. Oleuropein protects against dextran sodium sulfate-induced chronic colitis in mice. *Journal of Natural Products* 2013;76:1113-20. doi: 10.1021/np400175b
22. Tolosa L, Donato MT, Gómez-Lechón MJ. General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. *Protocols in vitro hepatocyte research*: Springer; 2015. p. 333-48. doi: 10.1007/978-1-4939-2074-7_26
23. Wongwarawipat T, Papageorgiou N, Bertias D, Siasos G, Tousoulis D. Olive oil-related anti-inflammatory effects on atherosclerosis: potential clinical implications. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)* 2018;18:51-62. doi: 10.2174/1871530317666171116103618
24. Rosillo MÁ, Alarcón-de-la-Lastra C, Castejón ML, Montoya T, Cejudo-Guillén M, Sánchez-Hidalgo M. Polyphenolic extract from extra virgin olive oil inhibits the inflammatory response in IL-1 β -activated synovial fibroblasts. *British Journal of Nutrition* 2019;121:55-62. doi: 10.1017/S0007114518002829
25. Rosillo MÁ, Alcaraz MJ, Sánchez-Hidalgo M, Fernández-Bolaños JG, Alarcón-de-la-Lastra C, Ferrándiz ML. Anti-inflammatory and joint protective effects of extra-virgin olive-oil polyphenol extract in experimental arthritis. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2014;25:1275-81. doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.07.006
26. Scotece M, Gómez R, Conde J, Lopez V, Gómez-Reino JJ, Lago F, et al. Further evidence for the anti-inflammatory activity of oleocanthal: Inhibition of MIP-1 α and IL-6 in J774 macrophages and in ATDC5 chondrocytes. *Life Sciences* 2012;91:1229-35. doi: 10.1016/j.lfs.2012.09.012
27. Cariello M, Contursi A, Gadaleta RM, Piccinin E, De Santis S, Pigionica M, et al. Extra-virgin olive oil from Apulian cultivars and intestinal inflammation. *Nutrients* 2020;12:1084. doi: 10.3390/nu12041084

ممکن است مربوط به نوع بیماری بررسی شده، روش اندازه‌گیری سنجش میزان سایتوکاین‌ها، مدت زمان تیمار سلول‌ها با اولئورویپین و دوز انتخابی باشد.

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از اولئورویپین موجود در روغن زیتون می‌تواند باعث کاهش سطح سایتوکاین التهابی TNF- α و افزایش IL-4 گردد. با توجه به نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، این امر ضروری است که مطالعات دیگری با حجم نمونه بیشتر و به‌صورت کارآزمایی بالینی جهت ارزیابی اثرات درمانی اولئورویپین در بیماران آرتریت روماتوئید مورد ارزیابی قرار داده شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل از پایان‌نامه دوره دکتری عمومی است و توسط دانشگاه علوم پزشکی شاهرود حمایت شده است (کد: ۱۰۶۰).

References

1. Makuch S, Więcek K, Woźniak M. The immunomodulatory and anti-inflammatory effect of curcumin on immune cell populations, cytokines, and in vivo models of rheumatoid arthritis. *Pharmaceuticals* 2021;14:309. doi: 10.3390/ph14040309
2. Liang H-Y, Yin H-X, Li S-F, Chen Y, Zhao Y-J, Hu W, et al. Calcium-Permeable Channels Cooperation for Rheumatoid Arthritis: Therapeutic Opportunities. *Biomolecules* 2022;12:1383. doi: 10.3390/biom12101383
3. Dupuis ML, Pagano MT, Pierdominici M, Ortona E. The role of vitamin D in autoimmune diseases: could sex make the difference? *Biology of Sex Differences* 2021;12:1-12. doi: 10.1186/s13293-021-00358-3
4. Lubberts E, van den Berg WB. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and collagen-induced arthritis. *Madame Curie Bioscience Database*. 2013.
5. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* 2015;74:5-17. doi: 10.1016/j.cyto.2014.09.011
6. Morimoto C, Romain PL, Fox DA, Anderson P, Dimaggio M, Levine H, et al. Abnormalities in CD4+ T-lymphocyte subsets in inflammatory rheumatic diseases. *The American Journal of Medicine* 1988;84:817-25. doi: 10.1016/0002-9343(88)90058-7
7. Covas M, Esquerda A, García-Rico A, Mahy N. Peripheral blood T-lymphocyte subsets in autoimmune thyroid disease. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology* 1992;2:131-5.
8. Hsu AT, Lupancu TJ, Lee M-C, Fleetwood AJ, Cook AD, Hamilton JA, et al. Epigenetic and transcriptional regulation of IL4-induced CCL17 production in human monocytes and murine macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 2018;293:11415-23. doi: 10.1074/jbc.RA118.002416
9. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 1999;12:564-82. doi: 10.1128/CMR.12.4.564
10. Middleton E. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Flavonoids in the Living System* 1998:175-82. doi: 10.1007/978-1-4615-5335-9_13
11. Bianchi G, Pozzi N. 3, 4-Dihydroxyphenylglycol, a major C6-C2 phenolic in *Olea europaea* fruits. *Phytochemistry* 1994;35:1335-7. doi: 10.1016/S0031-9422(00)94849-0
12. Olmez E, Vural K, Gok S, Ozturk Z, Kayalar H, Ayhan S, et al. Olive leaf extract improves the atherogenic lipid profile in rats fed a high cholesterol diet. *Phytotherapy Research* 2015;29:1652-7. doi: 10.1002/ptr.5445

28. Puel C, Quintin A, Agalias A, Mathey J, Obled C, Mazur A, et al. Olive oil and its main phenolic micronutrient (oleuropein) prevent inflammation-induced bone loss in the ovariectomised rat. *British Journal of Nutrition* 2004;92:119-27. doi: [10.1079/BJN20041181](https://doi.org/10.1079/BJN20041181)
29. D'Oronzo S, Coleman R, Brown J, Silvestris F. Metastatic bone disease: Pathogenesis and therapeutic options: Up-date on bone metastasis management. *Journal of Bone Oncology* 2019;15:100205. doi: [10.1016/j.jbo.2018.10.004](https://doi.org/10.1016/j.jbo.2018.10.004)
30. Santangelo C, Vari R, Sczzocchio B, De Sanctis P, Giovannini C, D'Archivio M, et al. Anti-inflammatory activity of extra virgin olive oil polyphenols: which role in the prevention and treatment of immune-mediated inflammatory diseases? *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)* 2018;18:36-50. doi: [10.2174/1871530317666171114114321](https://doi.org/10.2174/1871530317666171114114321)
31. Schuerwegh A, Dombrecht E, Stevens W, Van Offel J, Bridts C, De Clerck L. Influence of pro-inflammatory (IL-1 α , IL-6, TNF- α , IFN- γ) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function. *Osteoarthritis and Cartilage* 2003;11:681-7. doi: [10.1016/S1063-4584\(03\)00156-0](https://doi.org/10.1016/S1063-4584(03)00156-0)
32. Ouyang W, Ranganath SH, Weindel K, Bhattacharya D, Murphy TL, William CS, et al. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* 1998;9:745-55. doi: [10.1016/S1074-7613\(00\)80671-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80671-8)
33. Yamada P, Zarrouk M, Kawasaki K, Isoda H. Inhibitory effect of various Tunisian olive oils on chemical mediator release and cytokine production by basophilic cells. *Journal of Ethnopharmacology* 2008;116:279-87. doi: [10.1016/j.jep.2007.11.028](https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.11.028)



Investigation the Effects of Oleuropein on the Cytokines profile of Peripheral Blood Mononuclear Cells of Rheumatoid Arthritis Patients

Motahareh Dargahi (M.D.)^{1*}, Niloofar Taheri (M.D.)^{1*}, Zahra Yousefi (Ph.D.)², Fatemeh Toufan (I.M.)³,
Reza Jafari (Ph.D.)^{2*}

1- Student Research Committee, School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

2- School of Allied Medical Sciences, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

3- School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

Received: 11 December 2022, Accepted: 9 May 2023

Abstract:

Introduction: Nowadays, synthetic drugs used to treat inflammatory diseases are of the slightest interest due to their potential side effects and serious adverse effects. Therefore, finding new treatment approaches, especially herbal medicines, could help manage inflammation disorders. Olive and its products (oleuropein), as both antioxidants and inflammatory inhibitors, can effectively reduce the inflammatory process. This study aimed to investigate the effects of oleuropein on the cytokines profile of peripheral blood mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients.

Methods: A 5 ml blood sample was taken from 40 patients with RA. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from each sample using Ficoll. Then, it cultured in 24 well tissue culture plates with and without oleuropein and phytohemagglutinin (PHA). The concentration of TNF- α and IL-4 was evaluated in the supernatant of treated and non-treated cells using immunoassay after 72 hours. The results were analyzed using t-test and ANOVA.

Results: The results revealed a significant reduction of TNF- α in treated PBMCs with oleuropein compared to non-treated cells, especially in the 100 mg/ml of oleuropein ($P < 0.0001$). In addition, a significant increase in IL-4 in a dose-dependent manner was indicated ($P < 0.0001$).

Conclusion: Our findings demonstrated that oleuropein could effectively reduce the inflammation of inflammatory diseases, especially rheumatoid arthritis, by increasing the anti-inflammatory factor IL-4 production and decreasing the level of TNF- α .

Keywords: Rheumatoid arthritis, IL-4, Oleuropein, TNF- α .

Conflict of Interest: No

*First Co-author

*Corresponding author: R. Jafari, Email: jafari.r@shmu.ac.ir

Citation: Dargahi M, Taheri N, Yousefi Z, Toufan F, Jafari R. Investigation the effects of oleuropein on the cytokines profile of peripheral blood mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2023;18(2):53-59.