مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
سال ۱۴۰۰، دوره ۲۳، صفحه ۳۰۳-۲۹۷

اثرات فراکسیون های عصاره تام گرده گل جمع آوری شده توسط زنبور عسل در مدل حیوانی التهاب

طاهره اعتراف اسکوئی (Pharm D, PhD)[1*]، فرهاد جوانمرد (Pharm D)[1]، علی مقدمی کیا (Pharm D)[1]، مسلم نجفی (Pharm D, PhD)[2]

۱-گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۲-مرکز تحقیقات آموزش علوم پزشکی، پژوهشکده مدیریت و ارتقاء سلامت و ایمنی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

دریافت: ۹۹/۱۰/۲۵، اصلاح: ۹۹/۱۲/۱۱، پذیرش: ۹۹/۱۲/۲۴

خلاصه

سابقه و هدف: داروهای مرسوم ضد التهاب با وجود اثرات مفید، عوارض جدی و جبران ناپذیری دارند. به دلیل خواص ضد التهابی قابل توجه عصاره تام گرده گل جمع آوری شده توسط زنبور عسل، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات فراکسیون های ۱۰۰٪ متانولی (MF) و دی کلرومتانی (DF) عصاره تام گرده گل، در مدل حیوانی Air pouch انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی بر روی ۴۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در ۷ گروه شش تایی انجام شد. ابتدا موهای ناحیه پشتی موش های صحرایی بیهوش تراشیده شد. سپس در روز اول و سوم به ترتیب ۲۰ و۱۰ میلی لیتر هوای استریل به صورت زیرجلدی تزریق شد. روز ششم با استفاده از کاراژنین التهاب القا گردید. گروه اول سالین نرمال؛ گروه های ۲، ۳ و ۴ فراکسیون MF با دوزهای ۱۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم و گروه های ۵، ۶ و ۷، فراکسیون DF با دوزهای ۱۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم را همزمان با کاراژنین، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از آن به‌صورت داخل pouch دریافت کردند. سه روز بعد از تجویز کاراژنین، پارامترهای التهابی اندازه گیری شدند.

یافته‌ها: فراکسیون های MF و DF، وزن بافت گرانولوما را به‌ترتیب ۳۰٪ و ۴۰٪ در مقایسه با گروه کنترل (۰/۵±۵/۳ گرم) کاهش دادند (p<۰/۰۰۱). پارامترهای التهابی حجم اگزودا و آنژیوژنز به ترتیب توسط DF (p<۰/۰۰۱) و MF (p<۰/۰۱) به طور معنی داری کاهش یافتند. همچنین دوز ۲۵۰۰ میکروگرم هر دو فراکسیون موجب افزایش تعداد لکوسیت ها شد.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج این مطالعه گرچه به دلیل مقادیر تام فلاونوئیدی متفاوت در دو فراکسیون عصاره اثرات متفاوتی مشاهده شد، اما اثر مهاری امیدوار کننده ای بر روی بافت گرانولوما و آنژیوژنز به دست آمد که می‌تواند به عنوان یک منبع طبیعی تهیه داروهای ضد آرتریت روماتوئید و سرطان مورد توجه قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: آپی‌تراپی، Air pouch، التهاب، مهارکننده های آنژیوژنز.

مقدمه

تقریباً ۲۰٪ سرطان ها با التهاب شروع شده یا تشدید پیدا می‌کنند. از طرف دیگر، بروز و پیشرفت سرطان ها ارتباط تنگاتنگی با رگ زایی یا آنژیوژنز دارد (۲و۱). رگ زایی علی رغم اهمیتی که در رشد و تولید مثل ایفا می‌کند (۳) اما به جهت تسهیل مهاجرت سلول های التهابی و اکسیژن رسانی و انتقال مواد مغذی، باعث تشدید التهاب و رشد و متاستاز تومور می‌شود. بنابراین، مهار رگ زایی استراتژی مهمی برای درمان بیماری های التهابی مزمن از جمله انواع سرطان به شمار می‌رود (۴). داروهای مرسوم با وجود اثرات ضد التهابی مناسب، عوارض جدی و جبران ناپذیری دارند. لذا امروزه تحقیق بر روی داروهای ضد التهاب جدید با منشأ طبیعی و با عوارض جانبی کمتر، مورد توجه قرار گرفته است (۵). محصولات زنبور عسل از جمله عسل، بره موم، ژل رویال، گرده گل و زهر زنبور عسل در طب سنتی مصارف زیادی دارند. این روش درمانی و پیشگیری از بیماری‌ها (آپی‌تراپی) از دیرباز در پزشکی مدرن هم مورد توجه بوده است (۶). گرده گل یک ماده مغذی و مفید است که از گونه های مختلف گیاهی توسط زنبور عسل تهیه شده و در طب سنتی به عنوان مکمل کاربرد دارد (۷). با توجه به اثرات ضد التهاب و ضد رگ زایی عصاره تام گرده گل (۸)، این مطالعه به منظور بررسی اثرات فراکسیون های ۱۰۰٪ متانولی (MF) و دی کلرومتانی (DF) عصاره تام گرده گل، در مدل حیوانی Air pouch انجام شد. این مدل، الگوی درون تنی بسیار مناسبی برای بررسی التهاب حاد و مزمن بوده و جهت مطالعه رگ زایی و بیماری های مزمن التهابی مانند سرطان و بیماری های التهابی مفاصل به ویژه آرتریت روماتوئید به کار می‌رود (۹).

▣ این مقاله حاصل پایان نامه های فرهاد جوانمرد و علی مقدمی کیا دانشجویان دکترای عمومی رشته داروسازی به شماره های ۱۲۵ و ۱۹۶ دانشگاه علوم پزشکی تبریز می باشد.

*مسئول مقاله: دکتر طاهره اعتراف اسکوئی
آدرس: تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده داروسازی، گروه فارماکولوژی و سم شناسی. تلفن: ۳۳۳۷۲۲۵۰-۰۴۱
E-mail: eteraf_t@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1400.23.1.41.0]
[DOI: 10.22088/jbums.23.1.297]

مواد و روش ها

مطالعه حاضر از نوع پژوهش های بنیادی و پایه بوده و پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز با کد IR.TBZMED.VCR.REC.1397.036 و IR.TBZMED.VCR.REC.1398.082 به صورت تجربی انجام شد. در این مطالعه از ۴۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (۲۵۰-۲۰۰ گرم) استفاده شد. شرایط نگهداری و مراقبت از حیوانات مطابق استانداردها و دستورالعمل‌های اخلاقی پژوهش بر روی حیوانات آزمایشگاهی ابلاغی از وزارت بهداشت بوده و مطالعه بعد از اخذ کد های اخلاق از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز آغاز شد.

عصاره‌گیری و فراکسیونه کردن عصاره تام: گرده زنبور عسل پودر شده (۳۵۰ گرم) با استفاده از روش maceration، توسط متانول استخراج شد. برای جلوگیری از تغییرات شیمیایی، فرآیند استخراج در مکانی تاریک انجام شد. بعد از ۱۲ ساعت، عصاره حاصله دو بار از طریق صافی واتمن، صاف شد تا مایع شفاف حاصل شود. استخراج با متانول سه بار دیگر تکرار شد و در پایان عصاره های جمع آوری شده، با استفاده از اواپراتور دوّار (Heidolph, Germany) در حداکثر دمای ۴۵°C خشک و تغلیظ شدند. عصاره نهایی در دمای ۲۰°C- تا زمان مصرف نگهداری شد. جهت فراکسیونه نمودن عصاره تام، از روش استخراج فاز جامد یا Extraction SPE (Phase Solid) استفاده شد. برای انجام این کار ابتدا ۱۰ گرم از عصاره متانولی در کارتریج Sep-Pak، C18 (Waters, Ireland) استخراج شد و شستشوی آن با گرادیانت غلظتی مخلوط آب و متانول (۱۰:۹۰، ۲۰:۸۰، ۴۰:۶۰، ۶۰:۴۰، ۸۰:۲۰ و ۱۰۰:۰) و در انتها با دی کلرومتان انجام شد. فراکسیون های به دست آمده به طور جداگانه با استفاده از اواپراتور دوّار در حداکثر دمای ۴۵°C خشک و تغلیظ شدند (۱۰).

انجام تست توتال فلاونوئید: محتوی تام فلاونوئیدی با استفاده از معرف کلرید آلومینیم (Scharalau، ایتالیا) اندازه گیری شد. از فلاونوئید روتین به عنوان استاندارد استفاده شد. به نیم میلی لیتر از هر فراکسیون، ۱/۵ میلی لیتر متانول، ۰/۱ میلی لیتر از محلول آلومینیوم کلراید ۱۰٪ در اتانول، ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط نیم ساعت بعد از نگهداری در دمای اتاق، با دستگاه اسپکتوفتومتر (UV Brucker Tensor 27، آمریکا) در طول موج ۵۱۰ نانومتر در مقابل نمونه شاهد قرائت شد (۱۱). فراکسیون های ۱۰۰٪ MF و DF برای بررسی التهاب انتخاب گردیدند.

گروه های مورد مطالعه: از محلول ۲٪ کاراژنین لامبدا (Sigma، آلمان) جهت القاء التهاب استفاده شد. موش هایی که التهاب در آنها ایجاد شده بود در هفت گروه شش‌تایی به ترتیب: ۱)کنترل نرمال سالین، ۲ و ۳ و ۴) فراکسیون MF با دوز ۱۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم، گروه های ۵ و ۶ و ۷) فراکسیون DF با دوز ۱۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم قرار گرفتند.

ایجاد مدل التهابی Air pouch: بر اساس پروتکل تعریف شده (۱۲)، ابتدا موهای ناحیه پشتی حیوانات که به طور سطحی بیهوش شده بودند تراشیده شد، سپس ۲۰ میلی لیتر هوای استریل به صورت زیر پوستی تزریق گردید. سه روز بعد ۱۰ میلی لیتر هوای استریل به همان ناحیه در حیوان بیهوش تزریق گردید. محلول ۲٪ کاراژنین لامبدا تهیه شده و جهت استریل کردن آن، سوسپانسیون حاصله به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه اتوکلاو شد. روز ششم، ۲ میلی لیتر از سوسپانسیون حاصله جهت القاء التهاب، به داخل کیسه پشتی ایجاد شده یا pouch در همه موش ها تزریق شد. درگروه کنترل، ۱ میلی لیتر نرمال سالین و در گروه های تست فراکسیون های MF و DF با دوزهای ۱۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم، همزمان با تزریق کاراژنین، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تزریق کاراژنین، به داخل pouch تزریق شدند.

بررسی پارامترهای التهابی: یک روز پس از تزریق فراکسیون های گرده گل، موش ها با دوز بالای ماده بیهوشی کشته شده، pouch با قیچی جراحی باز شد و اگزودای التهابی خارج گردیده و حجم آن اندازه‌گیری شد. تعداد لکوسیت های موجود در اگزودا، توسط میکروسکوپ نوری شمارش گردید. همچنین بافت گرانولومای تشکیل شده به دقت از بدن حیوان جدا و توزین شد (۱۳).

بررسی رگ زایی: به منظور بررسی رگ زایی، بافت گرانولوما با محلول بافر فسفات سالین pH=۷/۴ به آرامی شسته شده و بعد از خشک شدن با کاغذ صافی به قطعات ریز برش داده شد. محلول درابکین تهیه شده از کیت هموگلوبین (شرکت زیست شیمی، ایران)، به آن اضافه شده و به مدت ۴ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ و در بستر یخ (۴ °C) توسط دستگاه هموژنایزر (Heidolph، آلمان)، هموژنیزه گردید. سپس بافت هموژن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴°C و با دور RCF ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ (Eppendroph، آلمان) شد. مایع رویی توسط صافی میلی‌پور ۰/۲۲ میکرون صاف شده و مقدار هموگلوبین آن به عنوان شاخص رگ زایی، با استفاده از منحنی استاندارد کیت هموگلوبین و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر محاسبه گردید (۱۴).

آنالیز آماری: کلیه داده ها به صورت Mean±SEM گزارش شده است. داده ها پس از ورود در نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ با استفاده از آزمون one way ANOVA و تست تعقیبی LSD مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

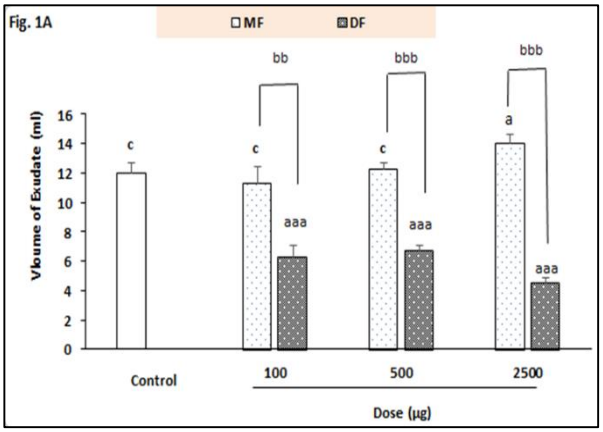
یافته‌ها

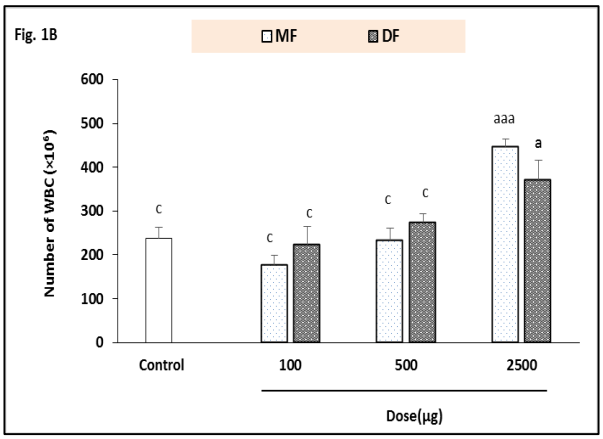
آنالیز فراکسیون های به دست آمده از عصاره گرده گل: مقدار MF و DF به دست آمده از ۱۰ گرم عصاره تام گرده گل به ترتیب ۹٪ (۹۰۰ میلی گرم) و ۸٪ (۸۰۰ میلی گرم) بود. جذب MF و DF به ترتیب ۱/۶۵ و ۰/۸۵ نانومتر بود که نشان دهنده وجود محتوای بالای فلاونوئید در MF نسبت به DM است. میزان فلاونوئید تام MF و DF به ترتیب معادل ۱۱۹/۳۵ و ۶۲/۱۲ میلی گرم معادل فلاونوئید روتین در یک گرم نمونه خشک بود که به ترتیب معادل ۱۱/۹۳ و ۶/۲۱ درصد فلاونوئید تام است.

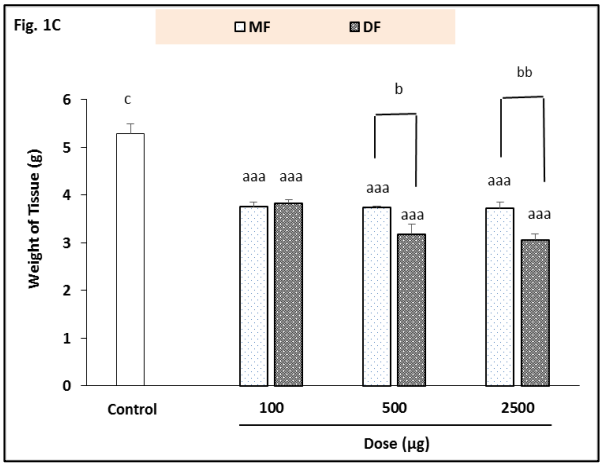
اثر فراکسیون های عصاره گرده گل بر پارامترهای التهابی: حجم اگزودا با دوزهای مختلف MF نه تنها در مقایسه با گروه کنترل (۰/۷۶±۱۲ میلی لیتر) تغییر نکرده است بلکه دوز ۲۵۰۰ میکروگرم باعث افزایش معنی داری نیز شده است (شکل A ۱) ($p<0/05$). بر خلاف MF، فراکسیونDF در دوزهای ۱۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم، میزان اگزودای التهابی را به ترتیب ۴۷/۵٪، ۴۴/۲٪ و ۶۲/۵٪ کاهش داد ($p<0/001$). تفاوت معنی داری بین فراکسیون های MF وDF از نظر مهار تولید اگزودا وجود داشت. فراکسیون های تزریق شده، نه تنها تأثیری در تجمع لکوسیت ها نداشتند بلکه با دوز ۲۵۰۰ میکروگرم، تعداد لکوسیت ها را به طور قابل توجهی افزایش دادند (شکل B ۱). در مقایسه با گروه کنترل (۰/۵±۵/۳ گرم)، وزن بافت گرانولوما به ترتیب حدود ۳۰٪ و ۴۰٪ با هر سه دوزMF و DF کاهش

[DOR: 20.1001.1.15614107.1400.23.1.41.0]
[DOI: 10.22088/jbums.23.1.297]

یافت (p<۰/۰۰۱) (شکل C ۱). علاوه بر این، دوزهای ۵۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم هر دو فراکسیون، در کاهش وزن بافت گرانولوما اختلاف قابل توجهی با همدیگر داشتند (به ترتیب p<۰/۰۵ و p<۰/۰۱).

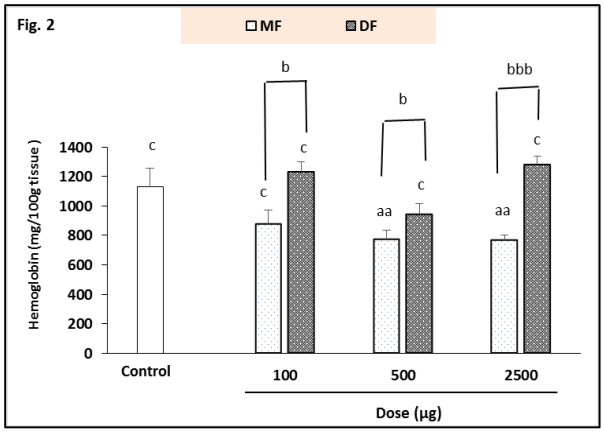






شکل ۱. اثر فراکسیون های ۱۰۰٪ متانولی (MF) و دی‌کلرومتانی (DF) عصاره تام گرده گل بر حجم اگزودا (A)، تجمع لکوسیتی (B) و وزن بافت گرانولوما (C). a نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین فراکسیون ها و گروه کنترل (aaa: p<۰/۰۰۱، a: p<۰/۰۵)، b نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه ها (bb: p<۰/۰۱، b: p<۰/۰۵) و c نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار بین گروه کنترل و گروه های درمان است.

اثر فراکسیون های عصاره گرده گل بر میزان رگ زایی: فراکسیون MF عصاره تام گرده گل، با دوز ۵۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم به ترتیب ۳۱/۵٪ و ۲۳/۵٪ رگ زایی را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد (p<۰/۰۱). اما فراکسیون DF نه تنها تأثیری در رگ زایی نداشت بلکه از این لحاظ تفاوت قابل توجهی هم با MF نشان داد (شکل ۲).



شکل ۲. اثر فراکسیون های ۱۰۰٪ متانولی (MF) و دی‌کلرومتانی (DF) عصاره تام گرده گل بر میزان رگ زایی.a نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین گروه های درمان و گروه کنترل (aa: p<۰/۰۱)، b نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه های درمان (bbb:p<۰/۰۰۱، b: p<۰/۰۵) و c نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار بین گروه کنترل و گروه های درمان است.

بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه برای اولین بار نشان داد که فراکسیون های MF و DF عصاره تام گرده گل، به طور مؤثری برخی از پارامترهای التهابی و رگ زایی را در مدل التهابی air pouch در موش صحرایی کاهش می دهد. این اثر، احتمالاً با خاصیت تعدیل سیستم ایمنی و ضد التهابی فلاونوئید های مختلف موجود در MF و DF ارتباط دارد. انواع مختلف فلاونوئیدها در عصاره گرده گل گزارش شده است که دو فلاونوئید مهم آن، کرستین و کامفرول است (۱۵). بر مبنای نتایج این مطالعه، فراکسیون DF حجم اگزودا را به طور قابل توجهی کاهش داد. بر اساس مطالعه Lopes و همکاران، کرستین با مهار فعالیت هیستیدین دکربوکسیلاز سطح هیستامین را که در نفوذپذیری عروق نقش دارد، کاهش داده و همچنین با مهار متابولیسم اسید آراشیدونیک سطح پروستاگلاندین های پیش التهابی را کم می‌کند (۱۶).

فلاونوئید مهم دیگری که در گرده گل گزارش شده، کامفرول است که با مهار آنزیم هیالورونیداز دیواره عروق را تقویت کرده و نفوذ پذیری عروقی را کاهش می‌دهد. اسید هیالورونیک همچنین از بافت گرانولوما در برابر خطرات رادیکال های آزاد محافظت می‌کند (۱۷). مکانیسم دیگری که ممکن است در خواص ضد التهابی فراکسیون های عصاره گرده گل نقش داشته باشد، توانایی فلاونوئید ها در حذف رادیکال های آزاد است که غالباً منجر به تشدید التهاب می‌شوند (۱۸). در این مطالعه، وزن بافت گرانولوما به طور چشمگیری توسط هر دو فراکسیون عصاره تام گرده گل کاهش یافت. تشکیل بافت گرانولوما از ویژگی های مهم التهاب مزمن

[DOR: 20.1001.1.15614107.1400.23.1.41.0]
[DOI: 10.22088/jbums.23.1.297]

است (۱۹) که تحت تأثیر اکسید نیتریک آزاد شده توسط ماکروفاژها قرار دارد (۲۰). نتایج یک مطالعه نشان داد که عصاره اتانولی گرده گل زنبور عسل اثر مهاری قابل توجهی بر نیتریک اکسید سنتاز القائی (iNOS) دارد (۲۱) و شاید یکی از مکانیسم های کاهش وزن بافت گرانولوما توسط فراکسیون های عصاره تام گرده، مهار آنزیم iNOS باشد. بر اساس نتایج این مطالعه، میزان رگ زایی با تزریق داخل pouch فراکسیون MF کاهش یافت. غلظت فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) در مایع التهابی ارتباط مستقیمی با رگ زایی دارد. نتایج مطالعه Eteraf-Oskouei و همکاران نیز نشان داد که عصاره تام گرده گل زنبور عسل باعث کاهش غلظت VEGF و TNFα و در نتیجه کاهش رگ زایی شد (۸). احتمالاً ترکیبات مؤثر بر رگ زایی به ویژه موادی که غلظت VEGF را تحت تأثیر قرار می‌دهند بیشتر در فراکسیون MF عصاره تام وارد شده‌اند.

اگرچه طبق نتایج مطالعه قبلی ما، عصاره تام گرده گل زنبور عسل اثر ضد التهابی دارد (۸)، اما واکنش‌های آلرژیک از جمله آنافیلاکسی پس از مصرف گرده گل گزارش شده است (۲۲). با توجه به اینکه فراکسیون MF علی رغم کاهش وزن بافت گرانولوما، باعث افزایش تعداد لکوسیت ها و حجم اگزودا شد به نظر می رسد برخی از ترکیبات مانند فنل آمین هایی که موجب فراخوانی لکوسیت ها به محل می‌شوند در این فراکسیون حضور بیشتری دارند (۲۳). بر مبنای نتایج حاصله مؤثرترین فراکسیون عصاره تام گرده گل، در کاهش رگ زایی و حجم اگزودای التهابی به ترتیب MF و DF بودند. با این حال، هر دوی آنها تأثیر قابل توجهی در کاهش وزن بافت گرانولوما داشتند. ممکن است محتوای فلاونوئیدی متفاوت دو فراکسیون و همچنین خواص آنتی اکسیدانی آنها نقش اساسی در این اثرات داشته باشد. اگرچه گرده زنبور عسل خواص درمانی بالقوه ای دارد، اما برای تأیید استفاده آن در درمان بیماری ها، تحقیقات بیشتری لازم است. علاوه بر این، برای یافتن مکانیسم اثر دقیق فراکسیون های مورد استفاده در این مطالعه، باید ترکیبات منحصر به فرد این فراکسیون ها شناسایی شده و اثرات آنها با جزئیات بیشتری بررسی شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تبریز جهت حمایت مالی از تحقیق و از مرکز تحقیقات کاربردی داروئی دانشگاه علوم پزشکی تبریز به خاطر در اختیار گذاشتن تجهیزات آزمایشگاهی و همچنین از خانم دکتر فریبا حشمتی افشار برای کمک در آزمایشات فارماکوگنوزی و ارائه نظرات ارزشمندشان تقدیر و تشکر می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1400.23.1.41.0]
[DOI: 10.22088/jbums.23.1.297]

The Effects of Solvent Fractions of Bee Pollen Crude Extract in an Animal Model of Inflammation

T. Eteraf-Oskouei (Pharm D, PhD)*[1], F. Javanmard (Pharm D)[1], A. Moghadami-kia (Pharm D)[1], M. Najafi (Pharm D, PhD)[2]

1.Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, I.R.Iran

2.Medical Education Research Center, Health Management and Safety Promotion Research Institute, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 23; 2021; PP: 297-303

Received: Jan 14th 2021, Revised: Mar 1st 2021, Accepted: Mar 14th 2021.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Conventional anti-inflammatory drugs, despite their beneficial effects, have serious and irreversible side effects. Due to the remarkable anti-inflammatory properties of bee pollen crude extract, the present study was conducted to investigate the effects of 100% methanol fraction (MF) and dichloromethane fraction (DF) in an air pouch model of inflammation.

METHODS: This experimental study was performed on 42 male Wistar rats in 7 groups of six. First, the hairs on the back of the rats were shaved. Subcutaneous injection of sterile air (20 and 10 mL) was performed on the dorsum of anaesthetized rats (day 1 and day 3, respectively). On day 6, inflammation was induced by intra-pouch injection of carrageenan. Group I: Normal saline; Group II, III, and IV: the rats treated with 100, 500 and 2500 µg MF; Group V, VI, and VII: the animals treated with 100, 500 and 2500 µg DF by intra-pouch injection simultaneously with carrageenan after 24 and 48 h. Three days after carrageenan administration, the inflammatory parameters and angiogenesis were measured.

FINDINGS: Compared to the control group (5.3±0.5 g), granulation tissue weight was significantly decreased ($p<0.001$) by approximately 30% and 40% by all three doses of MF and DF, respectively. Inflammatory parameters such as exudate volume and angiogenesis were significantly reduced by DF ($p<0.001$) and MF ($p<0.01$), respectively. In both fractions, a dose of 2500 µg increased the number of leukocytes.

CONCLUSION: Although different effects were observed in the two fractions of extract due to different amounts of flavonoids, a promising inhibitory effect on granulation tissue and angiogenesis was obtained, which could be considered as a natural source of anti-rheumatoid and anti-cancer agents.

KEY WORDS: *Apitherapy, Air Pouch, Inflammation, Angiogenesis Inhibitors.*

Please cite this article as follows:

Eteraf-Oskouei T, Javanmard F, Moghadami-kia A, Najafi M. The Effects of Solvent Fractions of Bee Pollen Crude Extract in an Animal Model of Inflammation. J Babol Univ Med Sci. 2021; 23: 297-303.

***Corresponding Author: T. Eteraf-Oskouei (Pharm D, PhD)**

Address: Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, I.R.Iran

Tel: +98 41 33372250

E-mail: eteraf_t@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1400.23.1.41.0]

[DOI: 10.22088/jbums.23.1.297]

References

1.Ono M. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. Cancer Sci. 2008;99(8):1501-6.

2.Aguilar-Cazares D, Chavez-Dominguez R, Carlos-Reyes A, Lopez-Camarillo C, Hernadez de la Cruz ON, Lopez-Gonzalez JS. Contribution of Angiogenesis to Inflammation and Cancer. Front Oncol. 2019;9:1399.

3.Bonnet CS, Walsh DA. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. Rheumatology (Oxford). 2005;44(1):7-16.

4.Ghadrdan E, Najafi M, Mikaily Mirak S, Eteraf-Oskouei T. Inhibitory effects of oxytocin on the inflammatory parameters and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the rat air pouch model of inflammation. Physiol Pharmacol. 2016;20(1):48-56.

5.Davies NM, Reynolds JK, Undeberg MR, Gates BJ, Ohgami Y, Vega-Villa KR. Minimizing risks of NSAIDs: cardiovascular, gastrointestinal and renal. Expert Rev Neurother. 2006;6(11):1643-55.

6.Trumbeckaite S, Dauksiene J, Bernatoniene J, Janulis V. Knowledge, Attitudes, and Usage of Apitherapy for Disease Prevention and Treatment among Undergraduate Pharmacy Students in Lithuania. Evid Based Complement Alternat Med. 2015;2015:172502.

7.Maruyama H, Sakamoto T, Araki Y, Hara H. Anti-inflammatory effect of bee pollen ethanol extract from Cistus sp. of Spanish on carrageenan-induced rat hind paw edema. BMC Complement Altern Med. 2010;10:30.

8.Eteraf-Oskouei T, Shafiee-Khamneh A, Heshmati-Afshar F, Delazar A. Anti-inflammatory and anti-angiogenesis effect of bee pollen methanolic extract using air pouch model of inflammation. Res Pharm Sci. 2020;15(1):66-75.

9.Franco-Molina MA, Santana-Krímskaya SE, Rodríguez-Padilla C. Air Pouch Model: An Alternative Method for Cancer Drug Discovery. In: Ali Mehanna R, editor. Cell Culture. IntechOpen; 2018.

10.Asnaashari S, Afshar FH, Ebrahimi A, Bamdad Moghadam S, Delazar A. Chemical composition and radical scavenging activity of essential oil and methanolic extract of Eremostachys azerbaijanica Rech.f. from Iran. Res Pharm Sci. 2016;11(2):113-9.

11.Afshar FH, Delazar A, Nazemiyeh H, Esnaashari S, Bamdad Moghadam S. Comparison of the total phenol, flavonoid contents and antioxidant activity of methanolic extracts of Artemisia spicigera and A. splendens growing in Iran. Pharm Sci. 2012;18(3):165-70.

12.Duarte DB, Vasko MR, Fehrenbacher JC. Models of Inflammation: Carrageenan Air Pouch. Curr Protoc Pharmacol. 2012;Chapter 5:Unit5.6.

13.Eteraf-Oskouei T, Akbarzadeh-Atashkhosrow A, Maghsudi M, Najafi M. Effects of salbutamol on the inflammatory parameters and angiogenesis in the rat air pouch model of inflammation. Res Pharm Sci. 2017;12(5):364-72.

14.Eteraf-Oskouei T, Mikaily Mirak S, Najafi M. Anti-Inflammatory and Anti-Angiogenesis Effects of Verapamil on Rat Air Pouch Inflammation Model. Adv Pharm Bull. 2017;7(4):585-91.

15.Jannesar M, Sharif Shoushtari M, Majd A, Pourpak Z. Bee Pollen Flavonoids as a Therapeutic Agent in Allergic and Immunological Disorders. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2017;16(3):171-82.

16.Lopes AJO, Vasconcelos CC, Pereira FAN, Silva RHM, Queiroz PFDS, Fernandes CV, et al. Anti-Inflammatory and Antinociceptive Activity of Pollen Extract Collected by Stingless Bee Melipona fasciculata. Int J Mol Sci. 2019;20(18):4512.

17.Trabucchi E, Pallotta S, Morini M, Corsi F, Franceschini R, Casiraghi A, et al. Low molecular weight hyaluronic acid prevents oxygen free radical damage to granulation tissue during wound healing. Int J Tissue React. 2002;24(2):65-71.

18.Najafi M, Gharakhani A, Ghavimi H, Eteraf Oskouei T. Protective Role of Pharmacologic Postconditioning with Natural Honey on Myocardial Infarction Size. J Babol Univ Med Sci. 2011;13(2):12-8. [In Persian]

19.Sato K, Komatsu N, Higashi N, Imai Y, Irimura T. Granulation tissue formation by nonspecific inflammatory agent occurs independently of macrophage galactose-type C-type lectin-1. Clin Immunol. 2005;115(1):47-50.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1400.23.1.41.0]
[DOI: 10.22088/jbums.23.1.297]

20.Iuvone T, Carnuccio R, Di Rosa M. Modulation of granuloma formation by endogenous nitric oxide. Eur J Pharmacol. 1994;265(1-2):89-92.
21.Maruyama H, Sakamoto T, Araki Y, Hara H. Anti-inflammatory effect of bee pollen ethanol extract from Cistus sp. of Spanish on carrageenan-induced rat hind paw edema. BMC Complement Altern Med. 2010;10:30.
22.Denisow B, Denisow-Pietrzyk M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. J Sci Food Agric. 2016;96(13):4303-9.
23.Zarobkiewicz MK, Woźniakowski MM, Sławiński MA, Wawryk-Gawda E, Jodłowska-Jędrych B. Bee pollen in allergy and immunology. Short review. Herba Pol. 2017;63(1):88-94.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1400.23.1.41.0]
[DOI: 10.22088/jbums.23.1.297]