

The Effect of Intracolonic *Matricaria recutita* L. Aqueous Extract on Acetic Acid–induced Ulcerative Colitis in Adult Male Rats

Saeideh Ahmadi Nejad¹, Mehdi Abbasnejad¹, Amin Derakhshanfar², Saeid Esmaili Mehani¹, Hakimeh Kohpeyma¹

¹ Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

² Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

ABSTRACT

Background:

Ulcerative colitis (UC) is a chronic inflammation of the colon that results from an abnormal response by the body's immune system. Our previous study has shown that oral *Matricaria recutita* L. aqueous extract because of its anti-inflammatory compounds decreased a number of UC inflammatory indices. In the present study, we evaluate the effect of rectal aqueous extract on a model of acute experimental colitis and compare it with prednisolone.

Materials and Methods:

Experiments were performed on six groups (n=7) of male Wistar rats (230-280 g). Of these, three groups were rectally administered different doses of extract (20, 30 and 60 mg/kg), the fourth group received oral prednisolone, the fifth group received vehicle and the last group was considered as the control group. To induce colitis, the rats fasted for 36 hours after which they received ether as an anesthesia. At the last stage, 2 ml of 4% acetic acid was instilled via the anus. After 24 hours, macroscopic study confirmed the colitis induction.

Results:

The doses of 30 and 60 mg/kg of extract significantly reduced the colon weight/length ratio. The same effect was observed with prednisolone (1.14 mg/kg). Extract at all doses (20, 30 and 60 mg/kg) significantly reduced the ulcer index compared to the sham group. Extract (60 mg/kg) effectively decreased the severity and extent of inflammation compared to the prednisolone group.

Conclusion:

Intracolonic injection of *Matricaria recutita* L. aqueous extract was effective in treatment against acetic acid-induced colitis in rats.

Keywords: Ulcerative colitis; *Matricaria recutita* L.; Prednisolone; Acetic acid; Rat

please cite this paper as:

Ahmadi Nejad S, Abbasnejad M, Derakhshanfar A, Esmaili Mehani S, Kohpeyma H. The Effect of Intracolonic *Matricaria recutita* L. Aqueous Extract on Acetic Acid–induced Ulcerative Colitis in Adult Male Rats. *Govaresh* 2014;19:32-9.

Corresponding author:

Mehdi Abbasnejad, MD

Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid

Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Telefax: +98 341 3222032

E-mail: mabbas@mail.uk.ac.ir

Received: 22 Dec. 2013

Edited: 07 Mar. 2014

Accepted: 08 Mar. 2014

اثر تزریق رکتومی عصاره آبی بابونه (*Matricaria recutita L.*) بر کولیت زخمی ناشی از اسیداستیک در موش های صحرایی نر بالغ

سعیده احمدی نژاد^۱، مهدی عباس نژاد^۱، امین درخشانفر^۲، سعید اسماعیلی ماهانی^۱، حکیمه کوهپیمان^۱

^۱ گروه زیست شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
^۲ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

چکیده

زمینه و هدف:

کولیت اولسروز (Ulcerative colitis) از بیماری های التهابی روده بزرگ است که نتیجه پاسخ غیرطبیعی سیستم ایمنی بدن می باشد. ما در مطالعه قبلی نشان دادیم عصاره خوراکی بابونه به علت وجود ترکیبات ضدالتهابی باعث بهبود علائم کولیت می شود. در این مطالعه اثر تزریق داخل رکتومی عصاره آبی بابونه در مدل حیوانی القای کولیت و مقایسه آن با داروی پردنیزولون مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی:

۶ گروه ۷ تایی از موش های صحرایی نر نژاد Wistar در محدوده وزنی ۲۸۰-۳۳۰ گرم مورد آزمایش قرار گرفتند. ۳ گروه دوزهای مختلف عصاره آبی بابونه (۶۰ و ۳۰ و ۲۰ mg/kg) را به صورت تزریق رکتومی عصاره دریافت داشتند، گروه ۴ داروی پردنیزولون را به صورت خوراکی دریافت کردند، گروه ۵ گروه زخمی (شم) و آخرین گروه کنترل بودند. برای القای کولیت موش های صحرایی به مدت ۳۶ ساعت گرسنگی داده شدند، و سپس تحت یک بی هوشی با اتر قرار گرفتند، در آخرین مرحله میزان ۲ میلی لیتر اسیداستیک ۴٪ از راه رکتوم داخل روده (کولون) حیوان تزریق گردید. ۲۴ ساعت بعد، مشاهدات ماکروسکوپی علائم کولیت را نشان داد.

یافته ها:

دوز ۳۰ و ۶۰ عصاره نسبت میزان وزن به طول کولون را کاهش دادند و پردنیزولون هم اثرات مشابهی داشت. تمام دوزهای ۳۰ و ۲۰ و ۶۰ اندکس اولسر را در مقایسه با گروه شم کاهش دادند، به علاوه دوز ۶۰ شدت التهاب را در مقایسه با پردنیزولون کاهش داد.

نتیجه گیری:

با توجه به نتایج می توان گفت تزریق رکتومی عصاره آبی بابونه در درمان کولیت القاء شده توسط اسید استیک موثر می باشد.

کلید واژه: کولیت اولسروز، بابونه (*Matricaria recutita L.*)، پردنیزولون، اسیداستیک، موش صحرایی

گوارش / دوره ۱۹، شماره ۱ / بهار ۱۳۹۳ / ۳۲-۳۹

زمینه و هدف:

کولیت زخمی (CD) و بیماری کرون (UC) به عنوان بیماری های التهابی روده (IBD) شناخته می شوند. کولیت زخمی می تواند در هر دو جنس زن و مرد و در هر سنی اتفاق بیفتد اما بیشتر در سن ۱۵ تا ۳۰ سالگی دیده می شود. (۱) میزان شیوع دو بیماری UC و CD در کشورهای صنعتی، در بالاترین میزان و به میزان ۲۰-۱۰ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر

نویسنده مسئول: مهدی عباس نژاد

کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
تلفن و نامبر: ۰۳۴۱-۳۲۲۲۰۳۲

پست الکترونیک: dmabbas@mail.uk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۱

تاریخ اصلاح نهایی: ۹۲/۱۲/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۷

می باشد در اروپا و آمریکای شمالی تعداد ۳/۶ میلیون بیمار IBD تخمین زده می شود. با پیشرفت جوامع به سوی صنعتی شدن و تغییرات سبک زندگی، تغذیه و شرایط محیطی این میزان در حال افزایش می باشد. (۲) کولیت زخمی بخش زیادی از روده بزرگ را تحت تاثیر قرار میدهد و لایه داخلی موکوس کولون و رکتوم را متاثر می نماید. کولیت زخمی با نفوذ نوتروفیل ها و لنفوسیت ها به موکوس کولون و نکرور در سلول های اپی تلیال مشخص می شود. از عوارض این بیماری اسهال، از دست دادن خون، کاهش پیشرونده حرکات پرستالتیک و در موارد شدیدتر مگا کولون سمی و ایجاد سوراخ در جدار روده می باشد. (۱) گیاه بابونه با نام علمی *Matricaria chamomilla* از تیره Compositae می باشد. گیاهی است یک ساله، بسیار معطر و به ارتفاع ۲۰ تا ۸۰ سانتی متر که به طور خودرو در مزارع، کنار جاده ها و اماکن بایر و سایه دار می روید. در عصاره بابونه ترکیبات و فلاونوئیدهایی وجود دارد که خواص ضدالتهابی آن ها در بیماری های

رو می توان بخشی از اثرات فیزیولوژیکی و ضد دردی عصاره بابونه را به ماده فلاونوئیدی به نام آپی-ژنین نسبت داد که به عنوان یک ماده شبه دیازپینی ممکن است تمایلی برای چسبیدن به گیرنده های بنزودیاپینی داشته باشد و درد را تعدیل کند (۱۳ و ۱۴). علاوه بر آپی ژنین در بابونه ترکیبات مختلف فلاونوئیدی دیگری وجود دارد که به آن خاصیت ضدالتهابی می بخشند. از جمله لوتولین، آلفا بیزابول و روتین می باشند. فلاونوئیدها می توانند بیان خیلی از واسطه گرهای التهابی را کاهش دهند و در نتیجه التهاب را از بین ببرند. همانطور که می دانیم همه این ترکیبات در التهاب از جمله التهاب مربوط به دستگاه گوارش نقش دارند. آپی ژنین موجود در بابونه تولید واسطه گرهای پیش التهابی مثل TNF α ، COX2، PGE2، iNOS و NO را از طریق مهار مسیر فاکتور هسته ای NF-KappaB می کند (۱۵ و ۱۶). آپی ژنین یک مهار کننده MAPK می باشد که با مهار آن خیلی از پروسه های التهاب را از بین می برد (۱۷). از دیگر ترکیبات مهم دیگر در عصاره بابونه، لوتولین می باشد که اثرات ضدالتهابی آن در بیماری های مختلف مشاهده شده است. لوتولین در التهاب سلول های اپی تلیالی کولون بیان NO و تولید IL-6 و TNF α را مهار می کند و این کار را با مهار کینازهای تنظیم کننده خارج سلولی (ERK) و مسیرهای P38MAPK در ماکروفاژها و بلوکه کردن فعالیت NF-KappaB که برای بیان ژن های التهابی ضروری است انجام می دهد. هم چنین لوتولین تولید IL-8 القاء شده توسط TNF α در سلول های اپی تلیالی کولون را از طریق فسفوریلاسیون، P38MAPK، ERK1، ERK2 سرکوب می کند. در التهابات ششی لوتولین فعالیت NF-KappaB و تخریب IKKB را با مهار MAPK سرکوب می کند (۱۸). در تحقیق قبلی ما نشان دادیم که عصاره آبی بابونه به صورت خوراکی باعث بهبود علائم کولیت می شود. عصاره آبی بابونه با دوزهای (۳۰ و ۲۰ mg/kg) موجب کاهش نسبت وزن به طول کولون و همچنین کاهش آنکس اولسر در مقایسه با گروه شاهد شد. بالاترین دوز به کار رفته عصاره (۳۰ mg/kg) توانست شدت و میزان التهاب را کاهش دهد و علاوه بر آن مطالعات هیستوپاتولوژی از مقطع کولون نشان داد که اثر درمانی عصاره در دوزهای (۳۰ و ۲۰ mg/kg) همراه با افزایش دوز کاملتر می شود (۱۹)، از آنجا که در کلینیک برای درمان کولیت زخمی از بعضی داروها به صورت رکتومی جهت درمان استفاده می شوند، که این روش می تواند مزیت هایی داشته باشند هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر تزریق رکتومی عصاره بر علائم کولیت بوده است.

روش بررسی:

حیوانات: در این مطالعه تعداد ۴۲ سر از موش های صحرایی نر بالغ (Rat) با نژاد Wistar در محدوده وزنی ۲۸۰-۲۳۰ گرم از مرکز تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه شهید باهنر کرمان تهیه و به طور تصادفی در ۶ گروه ۷ تایی تقسیم و مورد آزمایش قرار گرفتند. حیوانات تحت شرایط یکسان و مناسب نوری، ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و در دمای ۲۳±۱ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی

مختلف به اثبات رسیده است. مهم ترین ترکیبات این گیاه شامل سزکویی ترین های آلفا بیزابولول^۱، کامازولن^۲، فارنزن^۳ و ماتریسین^۴ می باشد. هم چنین دارای ایزومرهای سیس و ترانس آن- این دی سیکلواتر^۵ می باشند. (۳ و ۴) علاوه بر این دارای ترکیبات تریسین، میرستین^۶، لوتولین^۷، پروآزولن^۸، هرنیارین، مشتقات کومارین^۹، فلاونوئیدها و کولین می باشد. فلاونوئیدهای آن به طور عمده از دسته فلاون و فلاونول ها و به صورت آزاد و یا گلیکوزیدی یافت می شوند و گلچه های این گیاه حاوی روتین^{۱۰}، آپی ژنین، آپی این^{۱۱} و هم چنین چند آگلیکون فلاونوئید متیله و کوئرستین آزاد^{۱۲} می باشد. (۵ و ۶) لوتولین یکی از اعضای خانواده فلاونوئیدها است، و درمان با لوتولین باعث کاهش بیان TLR، NF-KappaB و MAPK بعد از سکتته می شود که همراه با افزایش سطح ERK^{۱۳} باعث اعمال خاصیت ضدالتهابی لوتولین می شود. یکی دیگر از فلاونوئیدهای موجود در بابونه آپی ژنین می باشد که اثرات ضدالتهابی آن در بیماری های قلبی-عروقی مشاهده شده است. آپی ژنین با کاهش بیان iNOS باعث مهار NO می شود، هم چنین بیان COX2 را مهار می کند. P38MAPK در پاسخ های التهابی در سلول های مختلف نقش هایی را بر عهده دارد و از جمله آن ها می توان میکروگلیا را نام برد، آپی ژنین یک مهار کننده MAPK می باشد. (۷) آپی ژنین کاهش در سطح فعالیت TNF α ، NF-KappaB، IL-1 را باعث می شود و هم چنین پاسخ های التهابی ناشی از پرتو را کاهش می دهد. (۸) یکی از ترپن های موجود در بابونه کوئرستین می باشد که خواص ضدالتهابی آن در Sarcoidosis دیده شده است. (۹) کوئرستین با از بین بردن ROS نه تنها از استرس اکسیداتیو محافظت می کند، بلکه همزمان التهاب را کاهش می دهد. کوئرستین توانایی مهار تولید TNF α را از طریق تنظیم NF-KappaB دارا می باشد. (۱۰) روتین موجود در عصاره که اثر ضدالتهابی در کلیه داشته است. آلفا بیزابول ادم و سنتز لوکوترین ها را کاهش می دهد و یک عامل ضدالتهابی مفید است. (۵) راموس و همکاران در ارزیابی ترکیبات شیمیایی عصاره آبی بابونه، اثر آن را در تخفیف درد ناشی از آفت دهانی و سایر زخم های دردناک دهان مورد تاکید قرار دادند. آن ها گزارش کردند که پس از ۵ و ۱۵ دقیقه اثر ضد دردی عصاره آبی بابونه در ۸۲ درصد موارد عالی و در ۱۸ درصد موارد خوب بوده است. (۱۱) مطالعه ای که توسط بورنس و همکاران^{۱۴} بر روی ۸۰۵۸ نفر از مادران حامله در جریان زایمان به عمل آمد نشان داده شده است که مصرف اسانس بابونه درد ناشی از زایمان را به طور قابل ملاحظه ای کاهش می دهد. (۱۲) از این

1. α -Bisabolol
2. Chamazulene
3. Farnesene
4. Matricine
5. in-Di cyclo ether,5-En
6. Myricetin
7. Luteolin
8. Proazulene
9. Coumarin
10. Rutin
11. Apiin
12. Free Quercetin
13. Extracellular signal-regulated kinases
14. Burns et al.

حیوان از حفره شکم خارج گردید تا در مراحل بعدی برخی از شاخص های التهابی مورد مطالعه قرار گیرد. جهت مطالعات هیستوپاتولوژی، بخشی از کولون در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفته تا پس از فیکس شدن و تهیه قالب های پارافینی، برش هایی به قطر ۵ میکرون تهیه و به وسیله هماتوکسیلین و انوزین رنگ آمیزی گردند.

ارزیابی زخم: پس از کشته شدن و باز کردن شکم، کولون حیوان از شکم خارج و میزان ۷ سانتی متر از کولون از فاصله ۳ سانتی متری مقعد جدا گردید و به صورت طولی برش داده شد و سپس توسط نرمال سالین سرد شسته و وزن مرطوب آن محاسبه گردید. (۱۹ و ۲۰) پس از آن نسبت وزن به طول کولون (g/cm) محاسبه گردید. (۲۱) هم چنین مساحت زخم هادر کولون برای هر حیوان محاسبه شده و به عنوان اندکس زخم^۱ تلقی گردید. (۲) علاوه بر این برخی از شاخص های بیماری از جمله: تغییرات وزن بدن در طول دوره آزمایش، درصد ناحیه درگیر در التهاب، شاخص های میکروسکوپی (هیستوپاتولوژی) التهاب به روش ماکروسکوپی مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

دریک مقیاس بندی با بزرگنمایی $40\times$ و $100\times$ میکروسکوپ نوری از صفر تا سه و درصد ناحیه درگیر در مقیاسه صفر تا چهار (۰/۱۰۰-۰/۷۶=۴ و ۰/۷۵-۰/۵۱=۳، ۰/۲۶-۰/۲۵=۲، ۰/۱-۰/۰=۱) در مورد هر نمونه بافت شناسی درجه بندی گردیدند. (۲)

تجزیه و تحلیل آماری: داده ها به کمک آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و به منظور ردیابی محل اختلاف بین گروه ها از پس آزمون Tukey استفاده و داده ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در خصوص مقایسه گروه های کنترل و شاهد از T-Test استفاده گردید. $p < 0.05$ به عنوان معیار معنی دار بودن اختلاف بین گروه ها در نظر گرفته شد. همچنین داده ها به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین بیان شدند.

یافته ها:

مقایسه گروه کنترل و شاهد حاکی از وجود زخم های خونریزی دهنده، با وسعت زیاد و بعضاً نکروز فراوان بافتی در گروه شاهد را نشان می دهد، از طرفی دیگر در گروه کنترل، گروهی که اسید استیک دریافت نشده بود هیچ گونه زخم و التهابی وجود ندارد، از این رو داده های مربوط به فاکتورهای سطح، شدت، اندکس اولسر و هم چنین داده های مربوط به مشاهدات پاتولوژی شامل میزان و شدت التهاب و درصد ناحیه درگیر در این گروه صفر می باشد، بنابراین با توجه به نتایج این آزمون، داده ها و ستون های مربوط به این فاکتورها در این گروه از نمودارها حذف شده است.

تغییرات وزن موش های صحرایی: همان گونه که در نمودار ۱ مشاهده می شود میانگین تغییرات وزن بدن در گروه کنترل و گروه دریافت کننده پردنیزولون در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی داری ($p < 0.05$) را نشان می دهند. دوزهای ۲۰ و ۳۰ و ۶۰ عصاره در مقایسه با گروه sham باعث تغییرات معنی داری در وزن نشده است.

وزن مرطوب بافت جدا شده کولون: همان گونه که در نمودار ۲ مشاهده

در تمامی مراحل انجام آزمایش رعایت ومورد توجه قرار گرفت. تهیه عصاره: نحوه تهیه عصاره بابونه (*Matricaria recutita L*) در این آزمایش به صورت عصاره آبی (Aqueous extract) وازروش دم کردن که منطبق باروش سنتی استفاده از عصاره بابونه است، می باشد. ۵۰ گرم از گل بابونه پس از خرد شدن به ۷۵۰ میلی لیتر آب مقطر در حال جوش (دمای ۹۰ درجه ی سانتی گراد) افزوده و سپس برای مدت ۱ ساعت دریک ظرف بسته شیشه ای بر روی هیتر داغ نگه داشته می شود و گاهی هم مخلوط هم زده می شود. پس از طی این مدت مخلوط حاصل را از صافی عبور داده سپس اجازه داده می شود آب تیخیر شود. در نهایت عصاره که به صورت پودر در ظرف موجود می باشد از ته ظرف جدا می گردد. در زمان مصرف به دلیل خاصیت اثر بخشی بهتر عصاره های گیاهی عصاره آبی بابونه در دوز (۲۰ و ۳۰ و ۶۰ mg/kg) به صورت تازه ساخته و به صورت رکتومی از طریق لوله پلی اتیلن به حیوان تزریق می شود. (۲۰)

دوز و روش تجویز عصاره و دارو: ۳ گروه از موش های صحرایی مورد مطالعه، دوزهای مختلف عصاره (۲۰ و ۳۰ و ۶۰ mg/kg) به مدت ۶ روز پس از القاء زخم از راه تزریق رکتومی دریافت کرد. یک گروه از حیوانات به عنوان گروه شاهد یا Sham حلال (نرمال سالین) را به مدت ۶ روز پس از القاء زخم از راه تزریق رکتومی دریافت داشت. یک گروه به عنوان گروه کنترل (Control) که به صورت دست نخورده فقط رژیم معمولی را داشت و گروه آخر، گروه دریافت کننده داروی پردنیزولون که (۱/۱۴ mg/kg) دارو را به مدت ۶ روز پس از القاء زخم دریافت داشت. حجم محلول های تجویز شده به هر حیوان ۰/۵ میلی لیتر به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن حیوان بود. القاء کولیت توسط اسید استیک: در این روش القای کولیت، موش های صحرایی به مدت ۳۶ ساعت در حالت محرومیت از غذا با دسترسی آزاد به آب و در قفس های جداگانه و سیمی که کف آن ها از توری تشکیل شده بود نگهداری شدند تا ضمن امکان حداقل نزاع، از خوردن فضولات خودشان (Corpophagy) نیز جلوگیری شود. سپس، موش های صحرایی تحت یک بی هوشی خفیف با اثر میزان ۲ میلی لیتر اسید استیک ۴٪ توسط یک لوله پلاستیکی با قطر داخلی ۲/۵ mm و به طول ۸cm از راه رکتوم یا مقعد داخل روده (کولون) حیوان تزریق گردید. (۱۹) سپس موش های صحرایی در داخل همان قفس های سیمی به مدت ۲۴ ساعت نگه داری شدند. با گذشت این زمان، زخم ایجاد گردید، پس از طی این مدت (ایجاد زخم) و با گذشت ۶ روز از دوره درمان با عصاره آبی بابونه موش ها توسط اتر کشته شدند. هم چنین دوزهای مختلف عصاره آبی بابونه (۲۰ و ۳۰ و ۶۰ mg/kg) از راه رکتومی توسط لوله پلی اتیلن به مدت ۶ روز پیاپی بعد از القاء زخم، به گروه های ۷ تایی موش صحرایی تجویز گردید، و داروی پردنیزولون از راه گاوژ به مدت ۶ روز پیاپی بعد از القاء زخم، به گروه های ۷ تایی موش صحرایی تجویز گردید. وزن هر یک از موش ها از زمان شروع آزمایش تا پایان انجام آزمایش، در تمامی روزها و در ساعت مشخص از روز ثبت شد.

بعد از طی مدت درمان موش ها به روش اخلاقی کشته شده و کولون

بافت التیامی جوانه ای^۲ را موجب می شود. حضور فولیکول های لنفاوی و هیپرپلاستیکی از دیگر ویژگی های ضایعات روده ای می باشد (شکل B-1) در مقایسه با گروه شاهد، در گروه دریافت کننده دوز (۲۰ mg/kg) عصاره آبی بابونه به هیچ وجه اثری از ضایعات شدید آماسی گروه شاهد دیده نمی شود اما وجه غالب جراحات شامل ادم لایه زیرمخاط است با اتساع عروق لنفاوی و گسستگی این لایه مشخص می گردند. تنها جراحات بافت پوششی به صورت محدود و موضعی در نقاطی از روده به چشم می خورد و تشکیل بافت التیامی جوانه ای در لایه سرروز روده جلب نظر می کند (شکل C-1). گروه دریافت کننده دوز (۳۰ mg/kg) عصاره آبی بابونه در مقایسه با گروه شاهد، از نظر تغییرات بافتی وضعیت مساعدتری را نشان میدهد و ضمن حفظ سلامت بافت پوششی روده ساختارهای تشکیل دهنده دیواره به طرز قابل ملاحظه ای محفوظ مانده اند. ادم در لایه زیرمخاط به مراتب کمتر از گروه دوز (۲۰ mg/kg) برآورد می شود. تنها اندکی نفوذ سلول های آماسی از انواع پلاسم، لنفوسیت و ائوزینوفیل در لایه زیرمخاط دیده می شود. تشکیل بافت التیامی در لایه سرروز به چشم می خورد (شکل D-1). در گروه دریافت کننده دوز (۶۰ mg/kg) عصاره آبی بابونه در مقایسه با گروه شاهد، ندرتا نقاطی میتوان یافت که تغییرات نکروتیک و آماس را نشان می دهند. ادم لایه زیر مخاط در کمترین حد خود نسبت به همه گروه ها است (شکل E-1). گروه دریافت کننده داروی پردنیزولون در مقایسه با گروه شاهد، اثری از ضایعات گروه شاهد به چشم نمی خورد اما در نقاط محدودی از روده به صورت نکروز اندک بافت پوششی و هیپرپلازی فولیکول های لنفاوی و البته پرخونی ملایم به چشم می خورد (شکل F-1). می توان گفت در گروه دریافت کننده دوز (۲۰ mg/kg) عصاره آبی بابونه به صورت داخل رکتومی خیلی بهبودی مشاهده نشده است و نتایج میکروسکوپی در گروه های دریافت کننده دوز (۳۰ و ۶۰ mg/kg) نزدیک به هم هستند اما به دلیل اینکه علائم ماکروسکوپی (التهاب و خونریزی بافت کولون) در گروه دریافت کننده دوز (۳۰ mg/kg) بهبود چندانی نسبت به دوز (۶۰ mg/kg) نداشته است پس میتوان بهترین دوز را دوز (۶۰ mg/kg) پیشنهاد داد.

بحث:

مطالعات قبلی در خصوص عصاره آبی بابونه نشان داده که به صورت خوراکی توانایی بهبود التهاب و زخم روده بزرگ را دارد (۲)، از آنجا که بعضی از داروهای مرتبط با درمان کولیت زخمی به صورت داخل رکتومی بکار می روند و بعضا اثر مفیدتری نیز دارند بکاربردن عصاره مذکور به صورت داخل رکتومی در پژوهش حاضر نشان داد که اثر درمانی خوبی بر التهاب و زخم ناشی از تزریق اسیداستیک به داخل کولون دارد، همانطور که در مبحث نتایج دیدیم، اکثر پارامترهای التهابی از جمله شدت زخم، درصد ناحیه درگیر، اندکس اولسر توسط عصاره خصوصا در دوز (۶۰ mg/kg) آن کاهش یافته اند، و در این رابطه تاثیر دوز (۶۰ mg/kg) نزدیک به پردنیزولون می باشد که به عنوان یک داروی رایج برای درمان این بیماری

2. Granuleation tissue

می شود مقایسه میانگین وزن مرطوب کولون در گروه کنترل، گروه دریافت کننده عصاره آبی بابونه با دوز (۶۰ mg/kg) و گروه دریافت کننده پردنیزولون در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی داری ($p < 0/05$) را نشان می دهند. تغییر نسبت وزن به طول کولون: همان گونه که در نمودار ۳ مشاهده می شود نسبت وزن به طول بافت جدا شده کولون در گروه کنترل، گروه دریافت کننده عصاره آبی بابونه با دوز (۶۰ mg/kg) و گروه دریافت کننده پردنیزولون در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی داری ($p < 0/05$) را نشان می دهند.

سطح زخم و التهاب ایجاد شده (مساحت زخم خفیف): همان گونه که در نمودار ۴ مشاهده می شود مساحت زخم خفیف در گروه کنترل، گروه دریافت کننده عصاره آبی بابونه با دوز (۶۰ mg/kg) و گروه دریافت کننده پردنیزولون در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی داری به ترتیب ($p < 0/01$) و ($p < 0/05$) را نشان می دهند.

مساحت زخم شدید: همان گونه که در نمودار ۵ مشاهده می شود مساحت زخم شدید در گروه کنترل، گروه دریافت کننده عصاره آبی بابونه با دوز (۶۰ mg/kg) و گروه دریافت کننده پردنیزولون در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی داری به ترتیب ($p < 0/01$)، ($p < 0/05$) و ($p < 0/01$) را نشان می دهند.

تغییرات اندکس اولسر: میانگین اندکس اولسر در گروه کنترل، گروه دریافت کننده عصاره آبی بابونه با دوز (۶۰ mg/kg) و گروه دریافت کننده پردنیزولون در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی داری ($p < 0/01$) را نشان می دهند (نمودار ۶).

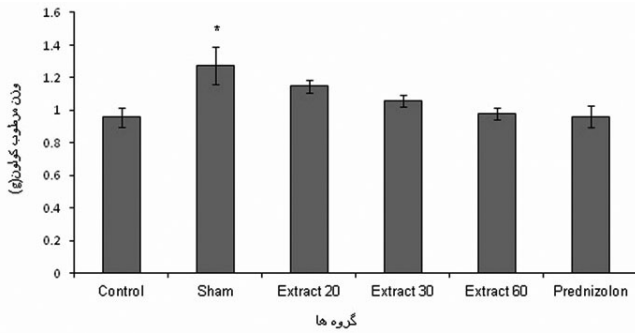
تغییرات درصد ناحیه درگیر: تغییر معنی داری در درصد ناحیه درگیر در گروه کنترل، دوز (۶۰ mg/kg) عصاره بابونه و گروه پردنیزولون (۱/۱۴ kg) در مقایسه با گروه شاهد به ترتیب ($p < 0/01$)، ($p < 0/05$) و ($p < 0/01$) دیده می شود (نمودار ۷).

همان گونه که در نمودار ۸ ملاحظه می گردد میزان ترکیب فعالیت آنزیم میلیوپراکسیداز در گروه کنترل و گروه دریافت کننده پردنیزولون در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی داری ($p < 0/01$) را نشان می دهند.

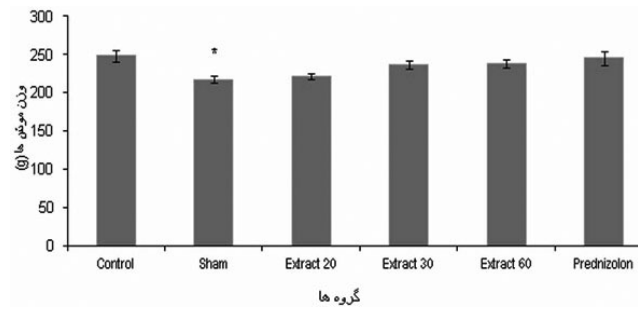
همان گونه که در نمودار ۹ مشاهده می شود میزان ترکیب مالون دی آلدئید بافت کولون در گروه کنترل، گروه دریافت کننده عصاره آبی بابونه با دوز (۶۰ mg/kg) و گروه دریافت کننده پردنیزولون در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی داری به ترتیب ($p < 0/01$) و ($p < 0/05$) را نشان می دهند.

نتایج هیستوپاتولوژی: در گروه کنترل بافت طبیعی روده شامل لایه های مخاط، زیرمخاط، عضلانی و سرروز دیده می شود در حالی که اثری از التهاب و نکروز وجود ندارد (شکل A-1). در گروه شاهد برخی از زخم های تقریبا آتشفشانی که به دلیل نکروز مخاط پدید آمده اند، جلب نظر می نمایند. سطح روده عریان^۱ به نظر می رسد. اثری از غدد لیبرکون وجود ندارد و ساختارهای جدار روده کولایس نموده اند. ارتشاح فیبرین و حضور گسترده نوتروفیل ها چهره التیامی روده را مشخص می نماید. این آماس توسط ادم همراه می گردد. گاه ادم و آماس و خونریزی در سرروز روده تشکیل

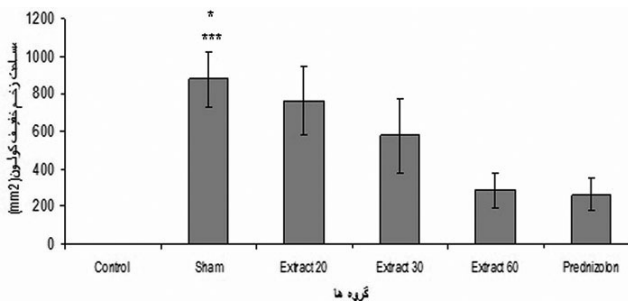
1. Denuded



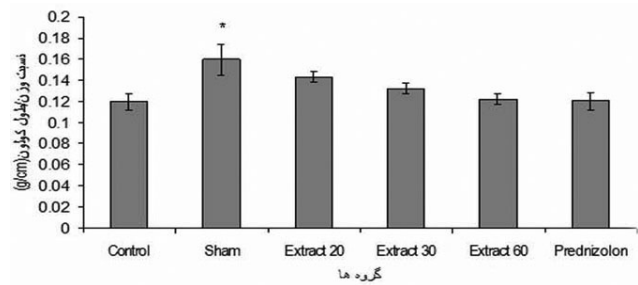
نمودار ۲: مقایسه وزن مرطوب کولون (g) در گروه های عصاره (۲۰ و ۳۰ و ۶۰ mg/kg) و گروه پردنیزولون (۱/۱۴ mg/kg)، گروه شاهد و کنترل. هر ستون نمایانگر میانگین \pm خطای استاندارد و (n=7) است. تفاوت معنی داری بین گروه کنترل و گروه پردنیزولون (۱/۱۴ mg/kg) در مقایسه با گروه شاهد وجود دارد ($p < 0.05$).



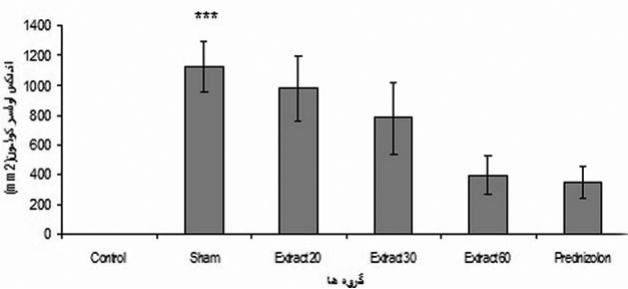
نمودار ۳: مقایسه وزن موش (g) در گروه های عصاره (۲۰ و ۳۰ و ۶۰ mg/kg) و گروه پردنیزولون (۱/۱۴ mg/kg)، گروه شاهد و کنترل. هر ستون نمایانگر میانگین \pm خطای استاندارد و (n=7) است. تفاوت معنی داری بین گروه کنترل و گروه پردنیزولون (۱/۱۴ mg/kg) در مقایسه با گروه شاهد وجود دارد ($p < 0.05$).



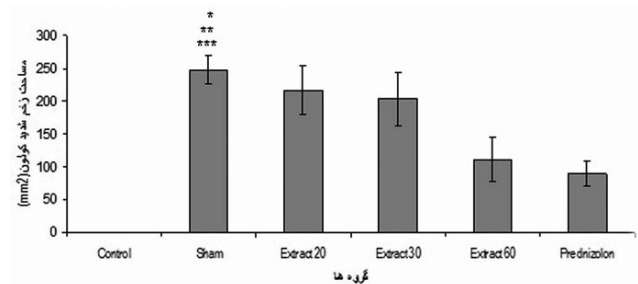
نمودار ۴: مساحت سطح زخم های خفیف کولون بر حسب سانتی متر در گروه های عصاره (۲۰ و ۳۰ و ۶۰ mg/kg) و گروه پردنیزولون (۱/۱۴ mg/kg)، گروه شاهد و کنترل. هر ستون نمایانگر میانگین \pm خطای استاندارد و (n=7) است. تفاوت معنی داری بین گروه کنترل و گروه پردنیزولون (۱/۱۴ mg/kg) در مقایسه با گروه شاهد وجود دارد. به ترتیب ($p < 0.001$) و ($p < 0.05$) * اختلاف معنی دار با گروه دوز (۶۰ mg/kg) و پردنیزولون ($p < 0.05$) ** اختلاف معنی دار با گروه کنترل ($p < 0.001$) ***



نمودار ۵: تغییرات نسبت وزن به طول (g/cm) بافت جدا شده کولون در گروه های عصاره (۲۰ و ۳۰ و ۶۰ mg/kg) و گروه پردنیزولون (۱/۱۴ mg/kg)، گروه شاهد و کنترل. هر ستون نمایانگر میانگین \pm خطای استاندارد و (n=7) است. تفاوت معنی داری بین گروه کنترل و گروه پردنیزولون (۱/۱۴ mg/kg) در مقایسه با گروه شاهد وجود دارد ($p < 0.05$).



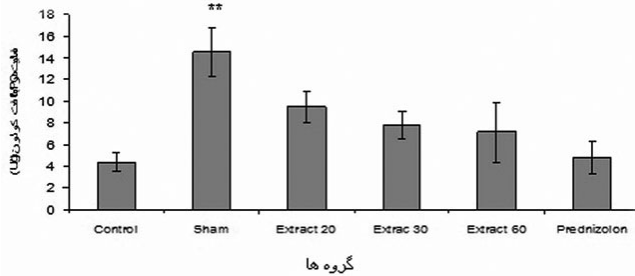
نمودار ۶: تغییرات اندکس اولسر در گروه های عصاره (۲۰ و ۳۰ و ۶۰ mg/kg) و گروه پردنیزولون (۱/۱۴ mg/kg)، گروه شاهد و کنترل. هر ستون نمایانگر میانگین \pm خطای استاندارد و (n=7) است. تفاوت معنی داری بین گروه کنترل و گروه پردنیزولون (۱/۱۴ mg/kg) در مقایسه با گروه شاهد وجود دارد. به ترتیب ($p < 0.001$)، ($p < 0.05$) و ($p < 0.01$) * اختلاف معنی دار با گروه دوز (۶۰ mg/kg) عصاره بابونه ($p < 0.05$) ** اختلاف معنی دار با گروه پردنیزولون ($p < 0.01$) *** اختلاف معنی دار با گروه کنترل ($p < 0.001$)



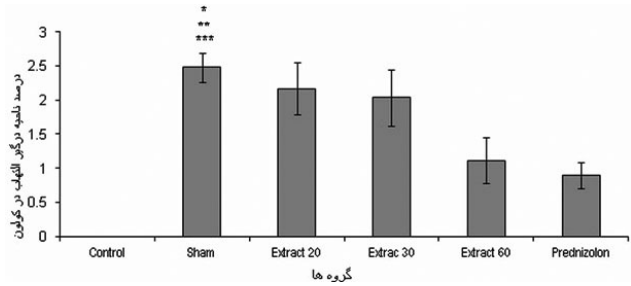
نمودار ۷: مساحت سطح زخم های شدید کولون بر حسب سانتی متر در گروه های عصاره (۲۰ و ۳۰ و ۶۰ mg/kg) و گروه پردنیزولون (۱/۱۴ mg/kg)، گروه شاهد و کنترل. هر ستون نمایانگر میانگین \pm خطای استاندارد و (n=7) است. تفاوت معنی داری بین گروه کنترل و گروه پردنیزولون (۱/۱۴ mg/kg) در مقایسه با گروه شاهد وجود دارد. به ترتیب ($p < 0.001$)، ($p < 0.05$) و ($p < 0.01$) * اختلاف معنی دار با گروه دوز (۶۰ mg/kg) عصاره بابونه ($p < 0.05$) ** اختلاف معنی دار با گروه پردنیزولون ($p < 0.01$) *** اختلاف معنی دار با گروه کنترل ($p < 0.001$)

اسید استیک، LTB₄، یکسری اسیدهای چرب منوهیدروکسی در مسیر لیبواکسیژناز و همچنین مقادیر کمتری از محصولات مسیر سیکلو اکسیژناز شامل EGP2 تولید می گردد. (۲۳) آپی ژنین موجود در بابونه تولید 1. leukotriene B4

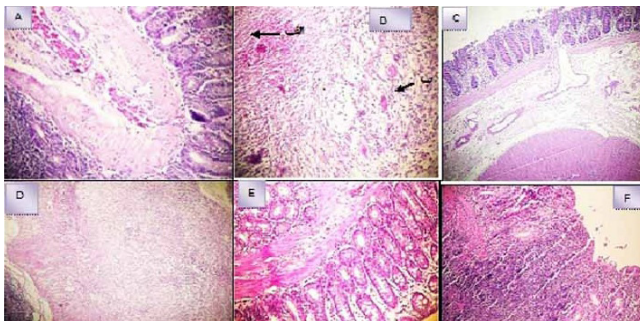
محسوب می گردد. (۲۲) مکانیسمی که به نظر می رسد اسیداستیک پروسه التهاب را شروع می کند شامل ورود فرم پروتونه اسید به اپی تلیوم می باشد که در آن جا تجزیه و پروتون حاصل با اسیدی کردن محیط داخل سلول آسیب اپی تلیالی را سبب می گردد. (۲۳) با تحریک یا تخریب مخاط توسط



نمودار ۸: میزان تغییر در جذب فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز در گروه های عصاره (mg/kg) ۳۰۶۰ و ۲۰، گروه پردنیزولون (۱/۱۴ mg/kg)، گروه شاهد و کنترل. هر ستون نمایانگر میانگین \pm خطای استاندارد (n=7) است. در این خصوص تفاوت معنی داری بین گروه کنترل و گروه پردنیزولون (۱/۱۴ mg/kg) در مقایسه با گروه شاهد در سطح ($p < 0.01$) وجود دارد.

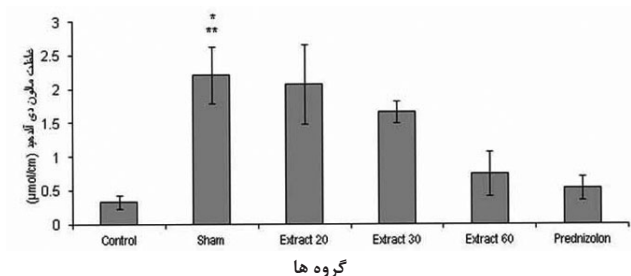


نمودار ۷: تغییرات درصد ناحیه درگیر در گروه های عصاره (mg/kg) ۳۰۶۰ و ۲۰، گروه پردنیزولون (۱/۱۴ mg/kg)، گروه شاهد و کنترل. هر ستون نمایانگر میانگین \pm خطای استاندارد (n=7) است. درصد ناحیه درگیر با استفاده از شماره های ۴-۰ درجه بندی گردید (۰=۰٪، ۱=۱-۲۵٪، ۲=۲۶-۵۰٪، ۳=۵۱-۷۵٪، ۴=۷۶-۱۰۰٪). تفاوت معنی داری بین گروه کنترل، دوز (۶۰ mg/kg) عصاره بابونه و گروه پردنیزولون (۱/۱۴ mg/kg) در مقایسه با گروه شاهد به ترتیب ($p < 0.001$)، ($p < 0.01$) و ($p < 0.05$) وجود دارد.



شکل ۱: نمای میکروسکوپی ساختار روده بزرگ (کولون) رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین و انوزین. گروه Control (A): به ساختمان طبیعی کولون شامل لایه های مخاطی، زیرمخاطی و عضلانی دقت شود، گروه Sham (B): کانون خونریزی (الف) و بافت جوانه ای التهابی (ب) را نشان می دهد، گروه دریافت کننده دوز (۲۰ mg/kg) عصاره بابونه (C): رنگ لنفوای متسع (الف)، گروه دریافت کننده دوز (۳۰ mg/kg) عصاره بابونه (D)، گروه دریافت کننده دوز (۶۰ mg/kg) عصاره بابونه (E)، گروه دریافت کننده پردنیزولون (۱/۱۴ mg/kg) (F)

* اختلاف معنی دار با گروه پردنیزولون ($p < 0.05$)
** اختلاف معنی دار با گروه دوز (۶۰ mg/kg) عصاره بابونه ($p < 0.01$)
*** اختلاف معنی دار با گروه کنترل ($p < 0.001$)



نمودار ۹: میزان غلظت ترکیب مالون دی آلدئید در گروه های عصاره (mg/kg) ۳۰۶۰ و ۲۰، گروه پردنیزولون (۱/۱۴ mg/kg)، گروه شاهد و کنترل. هر ستون نمایانگر میانگین \pm خطای استاندارد (n=7) است. در این خصوص تفاوت معنی داری بین گروه کنترل، دوز (۶۰ mg/kg) عصاره بابونه و گروه پردنیزولون (۱/۱۴ mg/kg) در مقایسه با گروه شاهد وجود دارد. به ترتیب ($p < 0.01$) و ($p < 0.05$)
* اختلاف معنی دار با گروه پردنیزولون و گروه دوز (۶۰ mg/kg) عصاره بابونه ($p < 0.05$)
** اختلاف معنی دار با گروه کنترل ($p < 0.01$)

(۱۸) از دیگر ترکیبات مهم در عصاره علاوه بر فلاونوئیدها می توان به سزکویی ترین های آلفابیزابولول، کامازولن، فارنزن، ماتریسین، کوئرستین و کومارین اشاره کرد. به نظر می رسد بخشی از اثر مهاری عصاره مربوط به وجود ترین ها در این گیاه باشد (۵)، از جمله کوئرستین در التهابات توانایی مهار تولید $TNF\alpha$ را از طریق تنظیم NF-KappaB دارا می باشد، و با از بین بردن ROS نه تنها از استرس اکسیداتیو محافظت می کند، بلکه همزمان التهاب را هم کاهش می دهد. آلفا بیزابولول در التهابات با کاهش سنتز لوکوترین ها عمل ضدالتهابی خود را انجام می دهد و یک عامل ضدالتهابی مفید است (۲۴). آلفا بیزابول به عنوان یک سزکویی ترین تک حلقه ای و غیراشباع یکی از ترکیبات اصلی بابونه می باشد که به علت سمیت کم آن و خاصیت ضدالتهابی اش در تهیه مواد آرایشی از جمله در شامپوها و صابون های آرایشی مورد استفاده قرار می گیرد (۲۵ و ۲۶). آلفا بیزابول اثرات ضدالتهابی خود را به واسطه تنظیم کاهشی واسطه گره های پیش التهابی مثل iNOS و COX2 از طریق مهار سیگنالینگ AP-1 و NF-KappaB انجام می دهد (۲۷). به طور خلاصه این مطالعه نشان داد

واسطه گره های پیش التهابی مثل TNF α ، COX2، EGP2، iNOS، NO را از طریق مهار مسیر فاکتور هسته ای NF-KappaB مهار می کند (۱۶ و ۱۵). آپی ژنین یک مهارکننده MAPK می باشد که با مهار آن خیلی از پروسه های التهاب را از بین می برد (۱۷). از دیگر ترکیبات مهم دیگر در عصاره بابونه، لوتولین می باشد که اثرات ضدالتهابی آن در بیماری های مختلف مشاهده شده است. لوتولین در التهاب سلول های اپی تلیالی کولون بیان NO و تولید IL-6 و TNF α را مهار می کند و این کار را با مهار کینازهای تنظیم کننده خارج سلولی (ERK) و مسیرهای P38MAPK در ماکروفاژها و بلوکه کردن فعالیت NF-KappaB که برای بیان ژن های التهابی ضروری است انجام می دهد. هم چنین لوتولین تولید IL-8 القاء شده توسط TNF α در سلول های اپی تلیالی کولون را سرکوب می کند و این کار را از طریق فسفوریلاسیون P38MAPK، ERK1، ERK2 انجام می دهد. در التهاب های ششی لوتولین فعالیت NF-KappaB و تخریب IKKB را با مهار MAPK سرکوب می کند.

رابطه ترکیباتی مثل آپی ژنین، لوتنولین و فلاونوئیدهای موجود در عصاره که قبلاً نقش ضدالتهابی آن‌ها به اثبات رسیده است، مداخله دارند اما جهت روشن شدن مکانیسم دقیق احتیاج به طراحی آزمایش‌های تکمیلی است.

تزریق داخل رکتومی عصاره بابونه منجر به بهبود معنی دار اکثر پارامترهای التهابی ماکروسکوپی و میکروسکوپی می‌گردد و بنابراین برای کسانی که ممکن است به عصاره خوراکی واکنش نشان دهند پس از تهیه عصاره به صورت مطمئن و بهداشتی به کار بردن رکتومی آن موثر خواهد بود. در این

REFERENCES

- Berardi RR, Inflammatory Bowel Disease. In: Herfindal ET, Gourley DR, editors. Therapeutics Drugs and Disease Management. Baltimore: *Williams and Wilkins* 1996. P. 483-502.
- Masoumi-ardakani Y, Abbasnejad M, Derakhshanfar A, Esmaeilpour bezenjani KH, Mostafavi A. Effect of *Matricaria recutita* L. aqueous extract on acetic acid-induced ulcerative colitis in adult male rats. *Physiology and Pharmacology* 2010;14: 268-280.
- Diane L, McKay B. A Review of the Bioactivity and Potential Health Benefits of Chamomile Tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother Res* 2006;20:519-30.
- Ganzera M, Schneider P, Stuppner H. Inhibitory effects of the essential oil of chamomile (*Matricaria recutita* L.) and its major constituents on human cytochrome 450 enzymes. *Life Sci* 2006;78: 856-61.
- Janmejai K, Srivastava A, Mitali P, Sanjay G. Chamomile, a novel and selective COX-2 inhibitor with anti-inflammatory activity. *Life Sci* 2009;85: 663-9.
- Kotov AG, Khvorost PP, Komissarenko NF. Coumarins of *Matricaria recutita*. *Chem Nat Compd* 1992; 27: 753.
- Bhat NR, Zhang P, Lee JC, Hogan EL. Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. *J Neurosci* 1998;18:1633-41.
- Kanokporm R, Montree T, Paiboon R, Louise H, Sanford R. Attenuation of oxidative damage and inflammatory responses by apigenin given to mice after irradiation. *Mutat Res* 2012;749:29-38.
- Montuschi P, Ciabattone G, Paredi P, Pantelidis P, Bois RM, Kharitonov SA, et al. 8-Isoprostane as a biomarker of oxidative stress in interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;58:1524-7.
- Nair MP, Mahajan S, Reynolds JL, Aalinkeel R, Nair H, Schwartz SA, et al. The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor α) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF-kappaB system. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13: 319-28.
- Ramos-e-Silva M, Ferreria AF, Bibas R, Carneiro S. Clinical evaluation of fluid extract of chamomilla recutita for oral aphthae. *Drugs Dermatol* 2006; 5: 612-7.
- Burns E, Blamey C, Ersser SJ, Liloyd AJ, Barnetson L. The use of aromatherapy in intrapartum midwifery practice an observational study. Oxford Brooks university U.K. *Complement Ther Nurs Midwifery* 2000; 6: 33-4.
- Molinero MT. Substance P nicotinic acetylcholine receptors and antioception intral. *Neuropharmacology* 1987; 26: 1715-20.
- Viola H, Wasowski C, Levi de stein M, Wolfman C, Silveira R, Dajas F, et al. Apigenin, a component of *matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta Med* 1995; 61: 213-6.
- Nicholas C, Batra S, Vargo MA, Gavrilin MA, Wewers M, et al. Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality in vivo and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF-kappaB through the suppression of p65 phosphorylation. *Immunol* 2007;179: 7121-7.
- Rezai-Zadeh K, Ehrhart J, Bai Y, Sanberg PR, Bickford P, Tan J, et al. Apigenin and luteolin modulate microglial activation via inhibition of STAT1-induced CD40 expression. *J Neuroinflammation* 2008;5: 41.
- Sang Keun H, Pyeongjae L, Jeong AP, Hye Rim O, Sang Yeon L, Ji-Ho P, et al. Apigenin inhibits the production of NO and PGE2 in microglia and inhibits neuronal cell death in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia mice model. *Neurochem Int* 2008;52:878-86.
- Kim SH, Shin KJ, Kim D, Kim YH, Han MS, Lee TG, et al. Luteolin inhibits the nuclear factor- κ B transcriptional activity in Rat-1 fibroblasts. *Biochem Pharmacol* 2003;66: 955-63.
- Mascolo N, Izzo A, Autore G, Maiello F, Dicarlo G, Capasso F. Acetic acid-induced colitis in normal and essential fatty acid deficient rats. *Pharmacol Exp Ther* 1995; 272: 469-75.
- Noa M, Mas R, Carbajal D, Valdes S. Effect of D-002 on acetic acid induced colitis in rats at single and repeated doses. *Pharmacol Res* 2000;41: 391-5.
- Paiva LA, Gurle LA, Desousa ET, Silveria RM, Siva RM, Santoz FA, et al. Protective effect of *copaifera langsdorffii* oleoresin against acetic acid-induced colitis in rats. *J Ethnopharmacol* 2004;93:51-6.
- Katzung BG. Basic and clinical pharmacology. 9nd ed. New York: McGraw Hill; 2004.
- Jagtap AG, Shirke SS, Phadke AS. Effect of polyherbal formulation on experimental models of inflammatory bowel disease. *J Ethnopharmacol* 2004;90:195-204.
- Wani A, Amlesh S, Sarwat S. Rutin attenuates cisplatin induced renal inflammation and apoptosis by reducing NFjB, TNF- α and caspase-3 expression in wistar rats. *Food Chem Toxicol* 2011;49:2013-21.
- Anderoil T, Carpenter CJ, Iascalzo J. Essential of Medicine. 16nd ed. Saunder; 2004. P. 363-71.
- Vila R, Santana A, Perez-Roses R, Valderrama A, Castelli M, Mendonca S, et al. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampaensis*, a new source of a-bisabolol. *Bioresour Technol* 2010;101:2510-4.
- Zahedi MJ, Darvish-moghadam S, Haiatbakhsh M, Dalirsani Z. Demographic and Clinical Features of Ulcerative Colitis Patients in Kerman City during 2005-2007. *kerman Univ Medical Sci* 2009;16:35-44.