

تاثیر آبروگست (STW5) در حفاظت از آسیب بافت ریه در مدل تجربی التهابی CLP در رت

ابوالفضل دادخواه^{۱*}، فائزه فاطمی^۲، جواد اشرفی هلان^۳

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۲۰

تاریخ تصویب: ۹۳/۳/۵

چکیده

در این تحقیق اثرات محافظتی یک داروی گیاهی با نام آبروگست (STW5) در دزهای مختلف بر روی آسیب هیستوپاتولوژی بافت ریه در مدل تجربی التهابی CLP در رت مورد بررسی قرار می‌گیرد. بدین منظور حیوانات به ۶ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل (SOP)، گروه CLP، گروه های STW 5 + CLP (2.5, 5 & 10 mg/kg) و گروه CLP + ایندومتاسین (کنترل مثبت). ایندومتاسین و STW5 به صورت i.p بلافاصله پس از القاء سپسیس به حیوانات تزریق گردیده و ۲۴ ساعت پس از القاء سپسیس بافت ریه آنها مورد بررسی های هیستوپاتولوژیکی قرار گرفت. بررسی‌های کیفی و کمی هیستو

^۱ استادیار، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران؛ Dadkhah_bio@yahoo.com

^۲ استادیار، پژوهشکده چرخه سوخت، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران

^۳ دانشیار، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز، گروه پاتوبیولوژی، تبریز

پاتولوژی نشان دادند که تعداد نوتروفیل های نفوذ یافته و حاشیه نشین شده و همچنین شاخص هیستولوژیکی شدت آسیب بافتی در گروه CLP به طور معنی داری افزایش نشان دادند. در مقایسه با داروی ایندومتاسین تیمار رت ها با داروی گیاهی آبیروگست هیچگونه تغییری در بهبود شاخص های کمی و کیفی بافتی ایجاد نکرد. نتایج این مطالعه بیان می کنند که تیمار رت های سپتیک بلافاصله بعد از انجام CLP به صورت *i.p* تاثیری بر روی بهبود پارامترهای کمی و کیفی هیستوپاتولوژیک آسیب بافتی در ریه نداشته است.

واژه های کلیدی: STW 5، التهاب حاد، CLP، بررسی های هیستوپاتولوژیک، ریه

مقدمه

سپس، یکی از مشکلات شایع در آسیب های تروماتیک بوده که معمولاً نیمی از بیماران ترومایی به آن مبتلا می شوند. این بیماری با واسطه سیتوکین های تولید شده از ماکروفاژها، بروز و پیشرفت می کند و در نهایت منجر به از کار افتادن و مرگ ارگان های بدن به خصوص ریه می گردد. سپسیس و بیماری های ناشی از آن، یکی از عوامل مرگ و میر در بخش های مراقبتهای ویژه^۱، جراحی و پزشکی می باشد. براساس گزارش مراکز کنترل و پیشگیری از بیماری ها، شیوع سپسیس رو به افزایش بوده و سومین علل مرگ و میر حاصل از بیماری های عفونی می باشد (Tran et al., 1990).

علاوه بر آن، بروز زودهنگام و حاد سپسیس، عوارض طولانی مدتی از جمله توقف سیستم ایمنی و مشکلات تنفسی را ایجاد کرده که در نهایت منجر به مرگ بیماران می گردد (Benjamim et al., 2004). به همین دلیل جلوگیری از سپسیس و عوارض ناشی از آن از اهمیت زیادی برخوردار است. برخلاف تحقیقات گوناگون و صرف هزینه های کلان، هنوز راه حل های مناسبی برای کاهش عوارض ناشی از سپسیس و نیز کاهش ناتوانی و مرگ و میر حاصل از تروما در این بیماران به دست نیامده است (Esmon., 2004). تنوع بیماری ها و ارگانیسم هایی که منجر به سپسیس می شوند و همچنین دیگر متغیرها در بیماران مبتلا به سپسیس، مشکلات بسیاری را بر سر راه

¹ Intensive Care Unit

درمان این بیماران و همچنین تحقیق در این زمینه ایجاد کرده است. به علاوه سپسیس یک بیماری منفرد نمی‌باشد بلکه فرآیندهای پیچیده و مختلفی در ایجاد آن نقش دارند (Marshall et al., 2003). با توجه به این متغیرها، مطالعات مختلف بر روی مدل‌های حیوانی که دارای شرایط کلینیکی این بیماری هستند، مفید می‌باشد. مدل CLP^۱ از سال ۱۹۷۸ تاکنون به طور روتین در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی مورد استفاده قرار گرفته و در آن جنبه‌های مختلف سپسیس و شوک حاصل از آن بررسی می‌شود. در این مدل، با عمل جراحی سد نرمال لوله گوارش تخریب شده و با نشت میکروارگانیسم‌های روده‌ای به داخل خون، سپسیس ایجاد می‌شود. (Hubbard et al., 2005).

مراحل بروز بیماری سپسیس به ۸ مرحله تقسیم شده است: ۱) افزایش میزان باکتری در خون^۲ ۲) سندرم پاسخ التهابی سیستمیک (SIRS)^۳ ۳) سپسیس^۴ ۴) سپسیس شدید^۵ ۵) شوک سپتیکی و ۶) سندرم اختلال چند گانه در عملکرد ارگان‌ها (MODS)^۶ ۷) سندرم پاسخ‌های ضد التهابی جبرانی (CARS)^۷ و ۸) سندرم پاسخ‌های مختلط آنتاگونیستی در سپسیس رخ می‌دهد (Victor et al., 2004).

(MARS)^۶ MODS، در ۳۰٪ بیماران سپتیکی، بیماران ترومایی، بیماران مبتلا به پانکراتیت حاد و دیگر بیماری‌ها از جمله سوختگی و التهاب عروقی سیستمیک دیده می‌شود (Bone et al., 1997). مرحله آخر MODS، اختلالات ایمنولوژیکی^۷ نامیده می‌شود که یک پاسخ غیرتعادلی و نامناسب سیستم ایمنی است که در نهایت با ایجاد آسیب‌های اکسیداتیو و غیر اکسیداتیو بافتی منجر به از کار افتادن بافت‌ها از جمله ریه می‌شود. این پاسخ در نتیجه التهاب شدید و دائمی رخ داده و در مبتلایان SIRS و MODS منجر به مرگ می‌گردد. یکی از علل از کار افتادن اندام‌ها در بیماران مبتلا به سپسیس بهم خوردن تعادل سطوح پارامترهای دخیل در آسیب اکسیداتیو در بافت‌های بدن است (Basu et al., 2000).

در شرایط نرمال بین تشکیل گونه‌های اکسیدکننده و حذف آنها توسط ترکیبات آنتی اکسیدان تعادل وجود دارد. استرس اکسیداتیو - همانند آنچه که در فرایند سپسیس رخ می‌دهد - زمانی ایجاد می‌شود که این تعادل توسط تولید زیاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS)^۸ و یا ضعف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مختل شود که این فرایند در سپسیس رخ می‌دهد (Victor et al., 2004).

¹ Cecal ligation and puncture

² Bacteremia

³ Systemic Inflammatory Response Syndrome

⁴ Multiple Organ Dysfunction Syndrome

⁵ Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome

⁶ Mixed Antagonist Response Syndrome

⁶ Mixed Antagonist Response Syndrome

⁷ Immunological dissonance

⁸ Reactive oxygen species

مؤثر تنها یک ترکیب شیمیایی نیست، بلکه دارای تعادل فیزیولوژیک است که بدن آن را بهتر تحمل می‌کند و اثرات جانبی نیز بر جای نمی‌گذارد. از قدیم استفاده از گیاهان دارویی در طب سنتی به دلیل دسترسی آسان و قیمت پایین، نقش مهمی را در بهداشت و سلامت جوامع به خصوص در کشورهای در حال پیشرفت از جمله کشورهای آسیایی داشته‌اند. قابل ذکر است که ترکیبات بیوشیمیایی سنتز شده توسط گیاهان از جمله آکالوئیدها، ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها، اسانس‌ها، تانین‌ها و ویتامین‌ها مسئول خواص فارماکولوژیکی گیاهان می‌باشد و پس از مصرف اثرات مختلفی را در بدن ایجاد می‌کنند (Koseki et al., 2002).

آیبروگست با نام تجاری STW5 یک فراورده گیاه دارویی می‌باشد که مخلوط ثابتی از عصاره هیدروآتانولی ۹ گیاه مختلف با نام‌های Bitter candytuft^۱، ریشه سنبل^۱، گل بابونه^۲، میوه زیره سیاه^۳، خار مریم^۴، برگ بلسان^۵، برگ نعناع^۶، گیاه مامیران^۷، ریشه شیرین بیان^۸ می‌باشد که هر کدام دارای ترکیبات خاص و فعال با خواص

با توجه به نقش مهم اختلال در پاسخ سیستم استرس اکسیداتیو/آنتی اکسیدانی در ایجاد آسیب بافتی به خصوص بافت ریه در سپسیس، استفاده از داروها یا ترکیبات طبیعی که با متعادل کردن این سیستم باعث کاهش آسیب بافتی گردند، در درمان سپسیس مفید به نظر می‌رسد. در مطالعات مختلف استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای NSAID برای درمان سپسیس پیشنهاد شده‌اند (Taketo et al., 1998; Ritter et al., 2004). ولی با توجه به عوارض ناشی از مصرف اینگونه داروهای ضدالتهابی (Nurmi et al., 2005)، امروزه استفاده از مواد طبیعی در درمان التهاب نقش مهمی پیدا کرده‌اند.

داروی گیاهی محتوی مواد مختلفی است که اکثر آنها روی بدن انسان تأثیر می‌گذارند. این ترکیبات شامل اسانس‌ها، رزین‌ها و آکالوئیدهای مختلف می‌باشند. معمولاً این مواد در حالت طبیعی به طور خالص یافت نمی‌شوند و به صورت ترکیب با عناصر دیگری هستند که به صورت مکمل اثرات آنها را تقویت می‌کنند. با این وجود حتی اگر گیاه دارویی فقط یک ماده فعال داشته باشد باز هم اثر آن روی بدن انسان مفیدتر از همان ماده در حالت به دست آمده از سنتز شیمیایی است. این خاصیت، ارجحیت گیاه درمانی یا استفاده از داروهای را که منشأ گیاهی دارند به اثبات می‌رساند. در اینجا ماده

¹ Angelica root

² Chamomile flower

³ Caraway fruit

⁴ Silybum marianum

⁵ Balm leaf

⁶ Peppermint leaf

⁷ Celandine herb

⁸ Liquorice root

ناشی از آن به خصوص التهاب حاد ریوی که منجر به آسیب شدی بافت ریه می‌گردد، حائز اهمیت خواهد بود. بنابراین در این تحقیق تاثیرات حفاظتی این داروی گیاهی بر آسیب‌های بافتی ناشی از سپسیس و التهاب حاد در بافت ریه مورد بررسی قرار خواهد گرفت که در این راستا اثرات آبیروگست بر روی پارامترهای کمی و کیفی هیستوپاتولوژی از جمله تعداد نوتروفیل‌های نفوذی و حاشیه نشین شده و نیز شاخص آسیب هیستوپاتولوژیک در بافت مذکور در رت‌های سپتیکی مطالعه خواهد شد.

مواد و روش‌ها

ایجاد سپسیس با استفاده از مدل CLP در این تحقیق، از رت‌های نر بالغ ویستار با وزن متوسط ۱۶۰ گرم استفاده گردید. رت‌ها از مراکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. غذای حیوانات از کارخانجات فرآورده‌های غذایی تهران تهیه شده که به صورت Pellet با فرمول استاندارد بود. حیوانات بالغ نیز دسترسی آزاد به غذا و آب آشامیدنی از طریق بطری داشتند. در این روش، پس از بیهوش کردن رت‌ها توسط مخلوط کتامین و گزیلوزین، در دیواره شکمی آنها به اندازه ۲ سانتی متر برش ایجاد گردید. سپس سکوم خارج شده و با فشار انگشت، مدفوع درون

فیتوشیمی از جمله ترکیبات فلاونوئیدی و اسانس می‌باشند (Kroll et al., 2006). مطالعات مختلفی درباره اثرات درمانی این داروی گیاهی صورت گرفته است. آبیروگست دارای اثرات درمانی بر روی حرکات دستگاه گوارش، مهار ترشح اسید معده و نیز اثرات آنتی‌اکسیدانی است. همچنین این ترکیب گیاهی دارای اثرات ضد التهابی نیز می‌باشد. وجود ترکیبات فلاونوئیدی، مونوترپن‌ها و فنل‌ها در ترکیبات آبیروگست دلالت بر دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی این داروی گیاهی دارند (Wegener et al., 2006). آبیروگست در حدود ۲۵ سال است که تولید می‌گردد و نیز جنبه‌های مختلف درمانی آن به خصوص در بهبود عملکرد دستگاه گوارش و نیز اثرات ضد التهابی STW5 در مطالعات مختلف *in vivo* و *in vitro* مورد بررسی قرار گرفته است، ولی متأسفانه درباره اثرات درمانی آن در سپسیس و التهاب حاد هیچگونه مطالعه‌ای صورت نگرفته است. امروزه یافتن فرمولاسیون‌های جدید بویژه با منشأ گیاهی از جمله استراتژی‌های درمانی سپسیس است. بنابراین با توجه به تولید استاندارد این داروی گیاهی در سطح جهانی و بررسی‌های علمی انجام شده در زمینه خواص مختلف درمانی آن، بررسی عملکرد این داروی گیاهی در درمان سپسیس و تعدیل عوارض

تیمار حیوانات و نمونه‌گیری

همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، حیوانات مورد مطالعه به ۶ گروه تقسیم شدند. عصاره اتانولی STW5 بلافاصله بعد از القاء سپسیس به صورت i.p به رت ها تزریق شد. سپس ۲۴ ساعت پس از تیمار، رت‌ها کشته شدند و بافت ریه آنها به منظور بررسی‌های هیستوپاتولوژی جدا گردید.

سکوم به انتها انتقال داده شد. در ادامه بخش سکوم تا زیر دریچه ایلئوسکال توسط نخ بخیه ۰-۳ بخیه زده شده و در سکوم (بدون آسیب به رگ های خونی) دو سوراخ توسط سر سوزن G20 ایجاد گردید. بعد از این مرحله، روده به داخل محفظه شکمی برگردانده شده و پوست و صفاق بخیه زده شد (Hubbard et al., 2005).

جدول ۱: گروه‌های تیمار شده

ایندومتاسین ۱۰ (mg/kg b.w)	عصاره اتانولی STW5 (mg/kg b.w)			اتانول ۳۰٪	گروه‌ها
	۱۰	۵	۲/۵		
-	-	-	-	+	لاپاراتومی (SOP)
-	-	-	-	+	CLP
-	-	-	+	-	CLP+STW52.5
-	-	+	-	-	CLP+ STW55
-	+	-	-	-	CLP+ STW510
+	-	-	-	-	CLP+Ind10

داروی گیاهی STW5 (۱۰، ۵، ۲/۵ mg/kg b.w) بلافاصله بعد از CLP به صورت i.p به آنها تزریق شد. در گروه کنترل مثبت، ایندومتاسین (۱۰ mg/kg b.w) بلافاصله بعد از CLP به صورت i.p به آنها تزریق شد.

در گروه کنترل (SOP) رت‌ها تحت جراحی لاپاراتومی قرار گرفته و اتانول ۳۰٪ به عنوان حلال عصاره به آنها تزریق گردید. در گروه CLP حیوانات تحت جراحی CLP قرار گرفته و اتانول ۳۰٪ به عنوان حلال عصاره به آنها تزریق گردید. در ۸ گروه مختلف تیمار،

بررسی هیستوپاتولوژیک بافت ریه

۲۴ ساعت بعد از القاء سپسیس، بیوپسی بافت ریه برای بررسی هیستوپاتولوژیک برداشته شد. بدین منظور بلافاصله بعد از جراحی قسمتی از بافت مذکور (حداکثر ۰/۵cm) در محلول بافر فرمالین ۱۰٪ پایدار گردید. بعد از ۴۸ ساعت، محلول فرمالین تعویض و نمونه‌ها تا زمان تهیه مقاطع میکروسکوپی در دمای اتاق نگهداری شدند.

- طرز تهیه محلول بافر فرمالین ۱۰ درصد: ۴/۶ گرم از NaH_2PO_4 با ۱۶/۳۸ گرم از Na_2HPO_4 در ۱۰۰ میلی لیتر فرمالین (MERK) حل گردیده و با آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسانده شد.

طرز تهیه لام از نمونه بافتی

پس از پایدار شدن بافتها در محلول پایدار کننده و گذراندن مراحل آماده سازی (پروسس) بافتی و تهیه بلوک های پارافینی، برش‌های نازکی به ضخامت ۵-۶ میکرون از بافت بلوک شده در پارافین تهیه و به روش هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ آمیزی گردید. سپس لام ها توسط جناب آقای دکتر اشرفی هلان - پاتولوژیست - به منظور مقایسه تغییرات بافتی در نمونه‌های مختلف توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفته و عکس برداری شدند. یک آنالیز

کمی برای محاسبه شاخص هیستولوژیکی شدت آسیب بافتی مورد استفاده قرار گرفت. شاخص شدت آسیب بافتی و میانگین تعداد نوتروفیل‌های نفوذ^۱ یافته و حاشیه نشین^۲ شده، از طریق شمارش تعداد سلول های التهابی چند هسته ای (پلی مورفونوکلیار) (نوتروفیل) در ده فیلد (میدان) میکروسکوپی و محاسبه میانگین آنها برآورد گردید. شاخص هیستولوژیکی بافت ریه نیز بر اساس شدت آسیب بافتی از ۰ تا ۴ درجه بندی شد، بدین صورت که عدد (درجه) صفر نشانگر تعداد ۰ تا ۲۴ نوتروفیل، عدد (درجه) ۱ نشان دهنده تعداد ۲۵ تا ۴۹ نوتروفیل، عدد (درجه) ۲ نشانه تعداد ۵۰ تا ۷۴ نوتروفیل، عدد (درجه) ۳ نشان دهنده تعداد ۷۵ تا ۹۹ نوتروفیل و نهایتاً عدد (درجه) ۴ نشانگر >100 نوتروفیل نفوذ یافته یا حاشیه نشین شده در هر میدان میکروسکوپی می‌باشد. به منظور مطالعه سایر تغییرات هیستولوژیکی از جمله پرخونی سیاهرگی (احتقان)^۳، ادم بافت بینابینی ریه^۴، دژنراسانس گرانولار هیپاتوسیت ها^۵، نکروز، هیپرتروفی و هیپرپلازی سلول ها بویژه سلول های کوپفر، یک مقیاس درجه بندی نیمه کمی مورد استفاده قرار گرفت، به طوری که عدد (درجه)

¹ Infiltration

² Sequestration

³ Congestion

⁴ Interstitial edema

⁵ Granular degeneration

شدید دیده شد. ادم شدید بافت بینابینی باعث گسترش دیواره همبندی بین لوبولی^۱ گردید. همچنین ادم بینابینی و پیرامون عروقی^۲ و خونریزی های کانونی در این گروه دیده شد. دیواره آلوئول های ریوی ضخیم شده و به دلیل هایپرتروفی ماکروفاژهای درون عروقی و بینابینی ریوی^۳ و نیز بدلیل نفوذ و حاشیه نشینی نوتروفیل ها، بافت ریه هایپرسلولار به نظر رسید. در عروق خونی کوچک بویژه درون شریانچه ها، وریدچه ها و مویرگها ترومبوس های هیالین^۴ دیده شد. این ضایعات نشان دهنده مرحله ابتدایی پنومونی بینابینی حاد^۵ ناشی از سپسیس بود (شکل ۱-B).

تیمار رتهای دچار سپسیس با داروی ضد التهابی ایندومتاسین تا حد زیادی از شدت ضایعات ریوی کاسته و از بروز تغییرات بافتی شدید در آن جلوگیری کرد، بدین گونه که پرخونی، ادم بافت بینابینی و ادم پیرامون عروقی، خونریزی های کانونی و تشکیل ترمبوس های هیالین در بافت ریه این گروه ها به طور معنی داری کاهش یافت (شکل ۱-F). همان طور که در اشکال (شکل ۳-E-C) نشان داده شده است، عصاره هیدروآتانولی STW5 قادر به کاهش شدت ضایعات بافت ریوی

صفر برای توصیف حالت طبیعی (بودن تغییر بافتی)؛ +۱: برای تغییرات بافتی خفیف؛ +۲: برای تغییرات بافتی ملایم (متوسط) و +۳: برای تغییرات شدید مورد استفاده قرار گرفت.

آنالیز آماری

اختلافات و تفاوت های بین داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS و تست ANOVA تعیین گردید. با استفاده از این نرم افزار Pvalue و نیز SE داده ها، مشخص شده و در نمودار نشان داده شده است. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel بدست آمد.

نتایج

الف) بررسی کیفی شاخص های هیستوپاتولوژیک آسیب بافت ریه در رتهای مبتلا به سپسیس تیمار شده با آبیروگست

مطالعه هیستوپاتولوژیک بافت ریه نشان می دهد که در گروه کنترل (لاپاراتومی) پرخونی خفیف بافت ریه وجود داشت (شکل ۱-A) در این گروه آثاری از نفوذ و حاشیه نشینی نوتروفیل ها در بافت ریه مشاهده نشد. بیشترین آسیب بافت ریه در گروه رت های مبتلا به سپسیس (گروه CLP) مشاهده گردید. در این گروه، بافت ریه در بازرسی ظاهری (ماکروسکوپی) دچار پرخونی بود. در بررسی هیستوپاتولوژیک نیز پرخونی

¹ Interlobular septa

² Perivascular

³ Pulmonary intravascular and interstitial macrophages

⁴ Hyaline thrombi

⁵ Acute interstitial pneumonia

سه دوز هیچگونه تغییری در پارامترهای فوق ایجاد نکرد.

بحث و نتیجه‌گیری

STW5 یک فراورده گیاه دارویی حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جمله انواع فلاونوئیدها و اسانس حاصل از گیاهان می‌باشد (Kroll et al., 2006). با توجه به اینکه تعادل سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و سطح استرس اکسیداتیو نقش بسیار مهمی را در ایجاد آسیب بافتی ناشی از سپسیس به خصوص ریه دارا می‌باشد (Basu et al., 2000; 2006)، بررسی اثرات این گیاه دارو در جلوگیری از آسیب بافت ریه در سپسیس القاء شده توسط مدل CLP حائز اهمیت می‌باشد.

اخیرا در مطالعات قبلی نشان دادیم که اسانس حاصل از دانه های زیره سیاه با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریایی در (Fatemi et al., 2011a,b; in vitro Dadkhah et al., 2009) از آسیب بافت کبد و ریه ناشی از سپسیس از طریق تعدیل فاکتورهای دخیل در سیستم استرس اکسیداتیو/آنتی‌اکسیدانی جلوگیری می‌کند (Fatemi et al., 2010a,b; Dadkhah et al., 2011a,b). نتایج این مطالعه نشان داد که آسیب هیستوپاتولوژیک بافت ریه در رت‌های مبتلا به سپسیس تیمار شده با داروی گیاهی آیبروگست در سه دز متوالی،

نبود، به طوری که تغییرات هیستوپاتولوژیک از جمله پرخونی، ادم بافت بینابینی و ادم پیرامون عروق، خونریزی های کانونی و تشکیل ترومبوس های هیالن و نفوذ و حاشیه نشینی نوتروفیل ها در این گروه ها دیده شد.

(ب) نتایج کمی حاصل از محاسبه تعداد نوتروفیل های نفوذ یافته و حاشیه نشین شده و شاخص هیستولوژیکی شدت آسیب بافت ریه در رت های سپتیکی تیمار شده با آیبروگست

نتایج حاصل از آنالیز کمی آسیب بافت ریه از جمله میانگین تعداد لکوسیت های پلی مورفونوکلر (نوتروفیل) نفوذ یافته و حاشیه نشین شده و شاخص هیستولوژیکی شدت آسیب بافت ریه در تمام گروه ها در جدول ۲ به طور خلاصه شرح داده شده است. تعداد نوتروفیل های نفوذ یافته و حاشیه نشین شده و شاخص هیستولوژیکی شدت آسیب بافت ریه در گروه CLP در مقایسه با گروه کنترل (لاپاراتومی) به طور معنی داری (۳/۲ برابر) افزایش یافت ($P < 0.05$). تیمار رت‌های دچار سپسیس با داروی ایندومتاسین تعداد نوتروفیل های نفوذ یافته و حاشیه نشین شده و نیز شاخص هیستولوژیکی شدت آسیب بافت ریه را به طور معنی داری کاهش داد ($P < 0.05$). در صورتی که تیمار رت های سپتیکی با عصاره اتانولی آیبروگست در هر

متابولیسم می گردند (Yang et al., 2008; Lambert & Yang, 2003; Manach et al., 2004, 2005; Scalbert et al., 2002; Lu et al., 2003a,b). نوع مدل التهابی، زمان و همچنین روش تیمار به عنوان متغیر های عدم تاثیر گیاه داروی STW5 در حفاظت از آسیب بافت ریه در مدل CLP را نمی توان نادیده گرفت. برخی مطالعات قبلی ما نیز موید این نتایج است به گونه ای که نشان می دهد که تیمار رت ها به صورت i.p با عصاره هیدروالکی دانه های زیره سیاه قادر به جبران آسیب های بافتی ناشی از سپسیس در مدل CLP نبوده است (Dadkhah et al., 2011c; Fatemi et al., 2010b). به علاوه علی رغم اینکه فعالیت آنتی اکسیدانی پلی فنل ها و فلاونوئیدها به اثبات رسیده است، مطالعات متعددی نیز گزارش کرده اند که این ترکیبات دارای فعالیت پرواکسیدانی می باشند (Panemangalore et al., 2009; Murzakhmetova et al., 2008; Babich et al., 2008). نتایج تحقیقات Robaszkiewicz و همکارانش نشان می دهد که اثرات پرواکسیدانی فلاونوئیدها به صورت وابسته به دز است. این محققین گزارش کرده اند که تیمار رده سلولی سرطان ریه انسانی A549 با غلظت های پایین quercetin (۵ و ۱۰ میکرومولار) منجر به افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی SOD، کاتالاز، GST و کاهش تولید ROS در این سلول ها شده است، ولی

جبران نشده است. احتقان شدید و تعداد نوتروفیل های نفوذیافته و حاشیه نشین شده و همچنین شاخص هیستوپاتولوژیک شدت آسیب بافت ریه که پس از القاء سپسیس به شدت تغییر یافته بود، پس از تیمار حیوانات با عصاره آبیروگست نیز همچنان در سطح بالایی قرار داشت (شکل ۱ و جدول ۳). در توجیه عدم تاثیر گذاری آبیروگست در محافظت از آسیب هیستوپاتولوژیک بافت ریه در رتهای سپتیکی مدل CLP میتوان دلایلی چند ارائه داد که به شرح زیر می باشد: پایین بودن زیست دسترسی STW5 در سیستم *in vivo* می تواند یکی از دلایل عدم تاثیر این داروی گیاهی در حفاظت از آسیب بافت ریه در سپسیس باشد. اگرچه مطالعه ای نشان داده است که STW5 در سیستم *in vitro/ex vivo* دارای زیست دسترسی نسبتاً خوبی است (Kelber et al., 2006)، اما هیچگونه داده ای مبنی بر تایید زیست دسترسی بالای این داروی گیاهی در سیستم *in vivo* وجود ندارد. وجود فلاونوئیدها به عنوان ترکیبات اصلی عصاره اتانولی این داروی گیاهی (Kroll et al., 2006; Wegener et al., 2006) زیست دسترسی پایین آن را توجیه می کند. زیست دسترسی پلی فنل های رژیمی نه تنها به دلیل خواص فیزیوشیمیایی مولکول بلکه به دلیل بیوترانسفورماسیون آنها نیز می باشد که در سیستم متابولیکی به یکباره وارد فاز II

Fe^{2+} احیا کرده و خود به کوئینون تبدیل گردد. Fe^{2+} حاصل از فرایند فوق در واکنش شبه فنتونی شرکت می‌کند و منجر به تولید رادیکال های هیدروکسیل می‌گردد (Perron et al., 2009). همچنین پلی فنل ها با فعالیتی همانند آنزیم سوپر اکسید دسموتاز با آنیون های سوپر اکسید واکنش داده و H_2O_2 و رادیکال های سمی کوئینون ایجاد می‌کنند. H_2O_2 حاصل از فرایند فوق قادر است در واکنش فنتون شرکت کند و در حضور Fe^{2+} رادیکال های هیدروکسیل بیشتری تولید کند (Perron et al., 2009). به طور کلی با توجه به مطالب فوق می‌توان بیان کرد که پلی فنل ها و فلاوونوئید ها در حالت احیاء به عنوان آنتی اکسیدان عمل می‌کنند، در صورتی که این ترکیبات در حالت اکسید شده (مثل رادیکال فنوکسیل یا کوئینون) می‌توانند به عنوان یک عامل پرواکسیدان عمل نمایند (Galati et al., 2004). نتایج تحقیق حاضر نیز نشان می‌دهد که در شرایط سپسیس، میزان تولید ROS و فعالیت آنزیم MPO افزایش و سطح آنتی اکسیدان هایی نظیر گلوکاتینون کاهش پیدا می‌کند. بنابراین احتمالاً در این شرایط، پلی فنل ها و فلاوونوئیدهای موجود در عصاره هیدروآتانولی آبیروگست به حالت اکسید در آمده و به عنوان یک عامل پرواکسیدان عمل

این ترکیب فلاوونوئیدی در غلظت زیاد (۱۰۰ میکرومولار) به عنوان یک ترکیب پرواکسیدان عمل کرده و منجر به افزایش تولید ROS و کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی شده است (Robaszkiewicz et al., 2007). همچنین تیمار رده سلولی لوکمیای انسان HL-60 با یک ترکیب فلاوونوئید به نام اپی ژنین منجر به تولید ROS در این سلول ها شده است. این در حالی است که تیمار همزمان این سلول ها با مهار کننده های آنزیم MPO منجر به کاهش تولید ROS توسط اپی ژنین می‌شود. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که اکسیداسیون اپی ژنین توسط آنزیم MPO و تبدیل شدن آن به رادیکال فنوکسیل مسئول اثرات پرواکسیدانی اپی ژنین می‌باشد (Miyoshi et al., 2007). آنزیم MPO در حضور H_2O_2 با گرفتن یک الکترون از حلقه کاتکول B موجود در فلاوونوئید ها آنها را به رادیکال فنوکسیل تبدیل می‌کند که منجر به آسیب اکسیداتیو به ماکرومولکول های سلول می‌شود (Galati et al., 2004). همچنین مطالعات نشان می‌دهند که فعالیت پرواکسیدانی پلی فنل ها در اثر واکنش آنها با فلزاتی نظیر آهن و مس ایجاد می‌شود. پلی فنل ها به Fe^{3+} متصل می‌شوند و آنرا به Fe^{2+} احیاء می‌کنند. در این فرایند، خود پلی فنل ها به سمی کوئینون اکسید می‌شوند که در ادامه قادر است یک اتم Fe^{3+} دیگر را به

کرده‌اند، به طوری که قادر به جبران آسیب‌های ناشی از سپسیس نمی‌باشند.

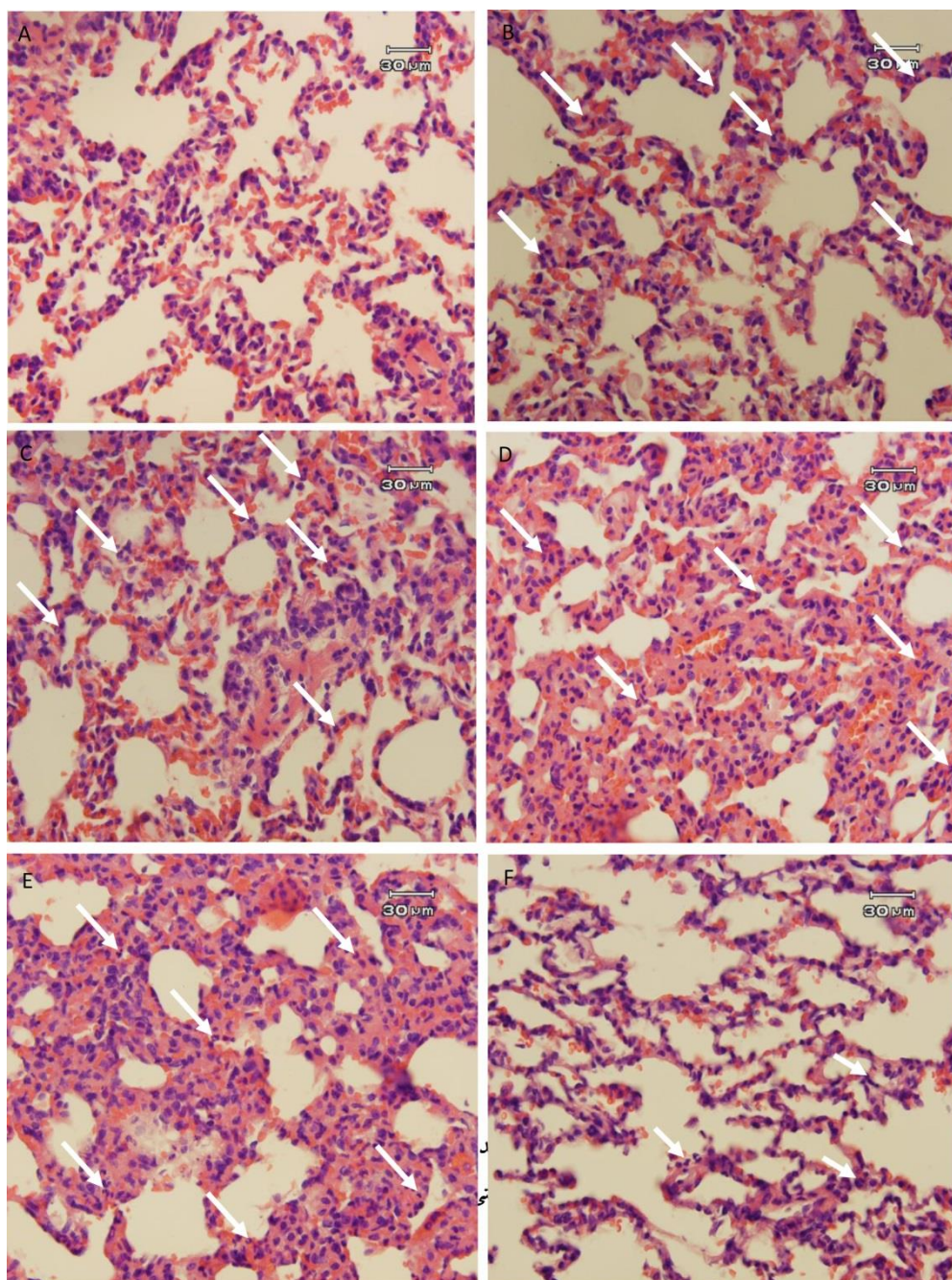
نتیجه‌گیری نهایی

به طور خلاصه نتایج این مطالعه نشان می‌دهند که تیمار رت‌های مبتلا به سپسیس در مدل تجربی التهابی CLP با داروی گیاهی آبیروگست به صورت i.p و بلافاصله بعد از القاء سپسیس، تاثیری در بهبود شاخص‌های کیفی و کمی هیستوپاتولوژیکی در بافت ریه نداشته است. با توجه به نقش درمانی شناخته شده STW5 در بسیاری از

بیماری‌ها، بررسی دقیقتر اثرات حفاظتی این داروی گیاهی در سپسیس ضروری به نظر می‌رسد که در این راستا بررسی مدل‌های دیگر القاء سپسیس و همچنین استفاده از راه‌های دیگر تیمار حیوانات نباید نادیده گرفته شود.

- تشکر و قدردانی

این مقاله با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم انجام شده است.



شکل ۱: تصاویر میکروسکوپی مربوط به بررسی های هیستولوژیک بافت ریه در گروه های مختلف. (A) نمایی از بافت ریه در گروه کنترل را نشان می دهد. در این گروه رت ها لاپاراتومی شده و فقط ۰/۵ میلی لیتر اتانول ۳۰٪ به صورت *i.p* دریافت کردند. (B) در این گروه رت ها CLP شده و بلافاصله ۰/۵ میلی لیتر اتانول ۳۰٪ به صورت *i.p* به آنها تزریق شد. (C-E) به رت های این گروه بلافاصله پس از CLP ۲/۵، ۵ و ۱۰ از عصاره آبیروگست به صورت *i.p* تزریق گردید. (F) در این گروه به رت ها بلافاصله پس از CLP ۱۰ mg/kg از داروی ایندومتاسین (گروه کنترل مثبت) به صورت *i.p* تزریق شد. فلش ها نشان دهنده لکوسیت های چند هسته ای (پلی مورفونوکلئار) از نوع نوتروفیل نفوذ یافته و حاشیه نشین شده در بافت ریه می باشد. مقاطع بافت ریه به روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی و تصاویر با درشتنمایی $\times 400$ گرفته شده اند.

جدول ۲: تاثیر عصاره اتانولی آبیروگست بر روی تعداد نوتروفیل های نفوذیافته و حاشیه نشین شده و شاخص هیستولوژیکی شدت آسیب بافتی در ریه های مبتلا به سپسیس

شدت آسیب ریه	تغییرات هیستوپاتولوژیک ریه	شاخص هیستولوژیکی شدت آسیب بافتی	تعداد نوتروفیل های نفوذیافته و حاشیه نشین شده	گروه ها
+	پرخونی و نکروز بسیار خفیف، نفوذ و حاشیه نشینی بسیار خفیف نوتروفیل ها در بعضی مناطق	0.61 ± 0.1	$2/2 \pm 0.7$	لاپاراتومی (SOP)
+++	تغییرات پاتولوژیک شدید: پرخونی شدید، ادم شدید بافت بینابینی، دور عروق خونی و مجاری هوایی، کانون های خونریزی، تشکیل ترومبوس های هیالن در عروق کوچک (شریانچه ها، وریدچه ها و مویرگها) و هیپرسلولاریتی دیواره آلوئول ها بدلیل هیپرتروفی و یا هیپرپلازی ماکروفاژهای داخل عروقی و بینابینی و نفوذ و تجمع شدید نوتروفیل ها	$1/5 \pm 0.5^*$	$11/8 \pm 2/6^*$	CLP
+++	تغییرات پاتولوژیک شدید: پرخونی شدید، ادم شدید بافت بینابینی، دور عروق خونی و مجاری هوایی، کانون های خونریزی، تشکیل ترومبوس های هیالن در عروق کوچک (شریانچه ها، وریدچه ها و مویرگها) و هیپرسلولاریتی دیواره آلوئول ها بدلیل هیپرتروفی و یا هیپرپلازی ماکروفاژهای داخل عروقی و بینابینی و نفوذ و تجمع شدید نوتروفیل ها	$1/3 \pm 0.3$	$8/8 \pm 1/6$	CLP+STW5 _{2.5}
+++	تغییرات پاتولوژیک شدید: پرخونی شدید، ادم شدید بافت بینابینی، دور عروق خونی و مجاری هوایی، کانون های خونریزی، تشکیل ترومبوس های هیالن در عروق کوچک (شریانچه ها، وریدچه ها و مویرگها) و هیپرسلولاریتی دیواره آلوئول ها بدلیل هیپرتروفی و یا هیپرپلازی ماکروفاژهای داخل عروقی و بینابینی و نفوذ و تجمع شدید نوتروفیل ها	2 ± 0.57	$13/1 \pm 1/8$	CLP+ STW5 ₅

شدت آسیب ریه	تغییرات هیستوپاتولوژیک ریه	شاخص هیستولوژیکی شدت آسیب بافتی	تعداد نوتروفیل های نفوذ یافته و حاشیه نشین شده	گروه‌ها
+++	تغییرات پاتولوژیک شدید: پرخونی شدید، ادم شدید بافت بینابینی، دور عروق خونی و مجاری هوایی، کانون های خونریزی، تشکیل ترومبوس های هیالین در عروق کوچک (شریانچه ها، وریدچه ها و مویرگها) و هیپرسلولاریتی دیواره آلوئول ها بدلیل هیپرتروفی و یا هیپرپلازی ماکروفاژهای داخل عروقی و بینابینی و نفوذ و تجمع شدید نوتروفیل‌ها	$2/3 \pm 0/3$	$14/6 \pm 1/7$	CLP+ STW5 ₁₀
+	تغییرات پاتولوژیک خفیف: پرخونی و ادم ملایم بافت بینابینی، از شدت کانون های خونریزی، تشکیل ترومبوس های هیالین در عروق کوچک و هیپرسلولاریتی دیواره آلوئول ها تا حد زیادی کاسته شد.	$0/75 \pm 0/2^{**}$	$6/5 \pm 1/4^{**}$	CLP+Ind ₁₀

در گروه کنترل (SOP) رتها تحت جراحی لاپاراتومی قرار گرفته و اتانول ۳۰٪ به عنوان حلال عصاره به آنها تزریق گردید. در گروه CLP حیوانات تحت جراحی CLP قرار گرفته و اتانول ۳۰٪ به عنوان حلال عصاره به آنها تزریق گردید. در ۸ گروه مختلف تیمار، گیاه داروی STW5 (۲/۵، ۵، ۱۰) بلافاصله بعد از CLP به صورت i.p به آنها تزریق شد. در گروه کنترل مثبت، ایندومتاسین (۱۰ mg/kg b.w) بلافاصله بعد از CLP به صورت i.p به آنها تزریق شد. مقادیر بر اساس میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده اند. علامت * نشان دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه CLP بوده که با گروه کنترل معنی دار است ($P < 0.05$). علامت ** نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه های مختلف تیمار بوده که با گروه CLP معنی دار هستند ($P < 0.05$).

References

- Babich, H., Gottesman, R.T., Liebling, E.J., and Schuck, A.G. (2008). *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 103: 66–74.
- Basu, S., and Eriksson, M. (2006). *European Journal of Pharmacology*. 534: 202–209.
- Basu, S., and Eriksson M. (2000). *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. 14: 17–23.
- Benjamin, C.F., Hogaboam, C.M., and Kunkel, S.L. (2004). *Journal of Leukocyte Biology*. 75: 408–412.
- Bone, R.C., Grodzin, C.J., and Balk, R.A. (1997). *Chest*. 112: 235-43.
- Dadkhah, A., and Fatemi, F. (2011a). *Pharmaceutical Boilogy*. 49: 679-686.
- Dadkhah, A., Fatemi, F., and Davoodian, N. (2011b). *Journal of Research in Medical Science*. 35: 7-13.
- Dadkhah, A., Fatemi, F., and Davoodian N. (2011c). *Qom University of Medical Science Journal*. 5: 5-13.
- Dadkhah, A., Khalafi, H., Rajae, R., Allameh, A., Rezaei, M.B., and Seyhoon, M. (2009). *Journal of Nuclear Science and Technology*. 49: 27-34.
- Esmon, C.T. (2004). *Critical Care Medicine*. 32: S219–S222.
- Fatemi, F., Allameh, A., Khalafi, H., Rajae, R., and Rezaei, M.B. (2011a). *Journal of the Food Biochemistry*. 35: 650-662.
- Fatemi, F., Khalafi, H., Rezaei, M.B., and Seyhoon, M. (2011b). *Journal of the Medicinal Plant*. In Press.
- Fatemi, F., Allameh, A., Khalafi, H., and Ashrafihelan, J. (2010a). *Applied Radiation and Isotopes*. 68: 280-285.
- Fatemi, F., Allameh, A., Khalafi, H., Rezaei, M.B., and Seyhoon, M. (2010b). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*. 25: 441-455.
- Galati, G., and O'brien, P.J. (2004). *Free Radical Biology & Medicine*. 37: 287 – 303.
- Hubbard, W.J., Choudhry, M., Schwacha, M.G., and Kerby, J.D. (2005). *Shock*. 24: 52–57.
- Kelber, O., Wittwer, A., Lapke, C., Kroll, U., Weiser, D., Okpanyi, S.N., and Heilmann, J. (2006). *Phytomedicine*. 5: 107-13.

- Kroll, U., and Cordes, C. (2006). *Phytomedicine*. 5: 12-9.
- Koseki, P.M., Villavicencio, A.L.C.H., Brito, M.S., Nahme, L.C., Katia, I.S., and Relaa, P.R. (2002). *Radiation Physics and Chemistry*. 63: 681-684.
- Lambert, J.D., and Yang, C.S. (2003). *Mutation Research*. 523-524: 201-208.
- Lu, H., Meng, X., and Yang, C.S., 2003a. Enzymology of methylation of tea catechins and inhibition of catechol-O-methyltransferase by (-)-epigallocatechin gallate. *Drug Metabolism and Disposition*, 31; 572-579.
- Lu, H., Meng, X., Li, C., Sang, S., Patten, Ch., Sheng, Sh., Hong, J., Bai, N., Winnik, B., Ho, C.T., and Yang, C.S. (2003b). *Drug Metabolism and Disposition*. 31: 452 -461.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., and Jimenez, L. (2004). *American Journal of Clinical Nutrition*. 79: 727-747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., and Remesy, C. (2005). *American Journal of Clinical Nutrition*. 81: 230S-242S.
- Marshall, J.C., Vincent, J.L., Fink, M.P., Cook, D.J., Rubinfeld, G., Foster, D., Fisher, C.J. Jr., Faist, E., and Reinhart, K. (2003). *Critical Care Medicine*. 31: 1560-1567.
- Miyoshi, N., Naniwa, K., Yamada, T., Osawa, T., and Nakamura, Y. (2007). *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 466: 274-282.
- Murzakhmetova, M., Moldakarimov, S., Tancheva, L., Abarova, S., and Serkedjieva, J. (2008). *Phytotherapy Research*. 22: 746-751.
- Nurmi, J.T., Puolakkainen, P.A., and Rautonen, N.E. (2005). *Nutrition and Cancer*. 51: 83-92.
- Panemangalore, M., and Bebe, F.N. (2009). *Journal of Environmental Science and Health B*. 44: 357-364.
- Perron, N.R., and Brumaghim, J.L. (2009). *Cell Biochemistry and Biophysics*. 53: 75-100.
- Ritter, C., Andrades, M.E., Reinke, A., Menna-Barreto, S., Moreira, J.C., and Dal Pizzol, F. (2004). *Critical Care Medicine*. 32: 342-349.
- Robaszkiewicz, A., Balcerczyk, A., and Bartosz, G. (2007). *Cell Biology International*. 31: 1245-1250.
- Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., Remesy, C. (2002). *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 56: 276-282.
- Taketo, M. (1998). *Journal of the National Cancer Institute*. 90: 1609-1620.

Tran, D.D., Groenveld, A.B., van der Meulen, J., Nauta, J.J., Strack van Schijndel, R.J., and Thijs, L.G. (1990). *Critical Care Medicine*. 18: 474-79.

Victor, V.M., Rocha, M., and De la Fuente, M. (2004). *International Immunopharmacology*. 4: 327-347.

Wegener, T., and Wagner, H. (2006). *Phytomedicine*. 5: 20-35.

Yang, C.S., Sang, S., Lambert, J.D., and Lee, M.J. (2008). *Molecular Nutrition and Food Research*. 52: S139-51.