

## بررسی نقش محافظتی داروی گیاهی آیبروگست (STW5) در جلوگیری از آسیب هیستوپاتولوژیکی بافت کبد ناشی از التهاب حاد در موش صحرایی

ابوالفضل دادخواه<sup>۱\*</sup>، فائزه فاطمی<sup>۲</sup>، جواد اشرفی هلان<sup>۳</sup>، هادی علی گل زاده<sup>۴</sup>، مؤده فدایی منفرد<sup>۵</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** آیبروگست با نام تجاری STW5 یک داروی شناخته شده گیاهی است که ترکیبات ثابتی از عصاره هیدروآتانولی ۹ گیاه داروی مختلف را دارا می باشد. این مطالعه با هدف بررسی اثرات محافظتی این دارو در دوزهای مختلف بر روی آسیب هیستوپاتولوژیکی بافت کبد در رت های مبتلا به سپسیس در مدل تجربی CLP انجام شد.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، ۳۶ سر رت به ۶ گروه (۶ سر در هر گروه) تقسیم شدند: ۱- گروه کنترل (SOP)؛ ۲- گروه CLP؛ ۳- گروه های تیمار CLP+STW5 (دریافت کننده دوزهای ۲/۵، ۵ و ۱۰ mg/kg.b.w از داروی STW5)؛ ۴- گروه کنترل مثبت CLP + ایندومتاسین (دریافت کننده دوز ۱۰ mg/kg.b.w از داروی ایندومتاسین). داروی گیاهی STW5 و ایندومتاسین به صورت داخل صفاقی و بلافاصله پس از القای سپسیس به حیوانات تزریق شد. پس از ۲۴ ساعت، حیوانات کشته شدند و بافت کبد آنها از نظر تغییرات هیستوپاتولوژیکی مورد مطالعه کمی و کیفی قرار گرفت. تفاوت های بین داده ها با استفاده از تست واریانس و تعقیبی توکی تعیین شد و سطح معنی داری  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد.

**یافته ها:** یافته ها نشان داد تعداد نوتروفیل های نفوذ یافته و حاشیه نشین در بافت کبد، همچنین شاخص هیستولوژیکی شدت آسیب بافتی که در گروه CLP افزایش یافته بود، پس از تیمار با داروی گیاهی آیبروگست بهبود نیافته است.

**نتیجه گیری:** با توجه به نتایج این مطالعه، تزریق داخل صفاقی داروی گیاهی STW5 بلافاصله بعد از القای سپسیس، هیچ گونه تأثیری بر روی تعدیل پارامترهای هیستوپاتولوژیکی آسیب بافتی کبد در مدل CLP ندارد.

**کلید واژه ها:** آیبروگست؛ التهاب؛ مدل سی ال پی؛ شاخص آسیب بافتی؛ کبد.

<sup>۱</sup> استادیار بیوشیمی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.

<sup>۲</sup> استادیار بیوشیمی، پژوهشکده چرخه سوخت، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، تهران، ایران.

<sup>۳</sup> دانشیار پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

<sup>۴</sup> کارشناس علوم آزمایشگاهی، بیمارستان عزیزی جویبار، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

<sup>۵</sup> دانشجوی کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

\* نویسنده مسئول مکاتبات:

ابوالفضل دادخواه، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

dadkxah\_bio@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۱۷

تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۱۱

نمایند استناد زیر به صورت مقاله این به لطفاً

Dadkxah A, Fatemi F, Ashrafihelan J, Aligolzadeh H, Fadaie Monfared M.e  
Assessment of the Protective Role of Herbal Drug Iberogast (STW 5) in Prevention of Hepatic Histopathological Damage Caused by Acute Inflammation in Rats.  
Qom Univ Med Sci J 2013;7(4):1-11. [Full Text in Persian]

## مقدمه

سپسیس (Sepsis)، پاسخ سیستمیک به عفونت حاد است که شیوع آن رو به افزایش بوده و در حال حاضر سومین عامل مرگ ناشی از عفونت محسوب می‌شود، و تحقیقات وسیعی نیز در جنبه‌های مختلف آن صورت گرفته است (۱). با وجود پیشرفت‌های درمانی بسیار در بیماری سپسیس، هنوز این بیماری و عواقب ناشی از آن، مهم‌ترین عامل مرگ و میر در بیماران مراقبت‌های ویژه (ICU) محسوب می‌شود (۲،۳).

یکی از عوارض و مشکلات ناشی از سپسیس، به هم خوردن تعادل سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و سطح استرس اکسیداتیو در بدن می‌باشد (۴،۵). در شرایط فیزیولوژیک بین تشکیل گونه‌های اکسیدکننده و حذف آنها توسط ترکیبات آنتی‌اکسیدان، تعادل وجود دارد. استرس اکسیداتیو زمانی ایجاد می‌شود که این تعادل توسط تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS (Reactive Oxygen Species) و یا ضعف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در اثر تغییر فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز، ویتامین‌های E و C و کاهش گلوکوتایون مختل شود (۶). شواهد متقاعدکننده‌ای وجود دارد که ثابت می‌کند در بیماران سپسیسی به هم خوردن این تعادل، استرس اکسیداتیو ایجاد کرده و در اثر آن، بسیاری از بافت‌های بدن از جمله قلب و کلیه دچار آسیب اکسیداتیو شده، که در نهایت منجر به اختلال در عملکرد آنها و از کارافتادگی می‌شود (۴،۷،۸).

مدل (Cecal Ligation and Puncture) CLP، یک مدل تجربی برای ایجاد سپسیس بوده که از سال ۱۹۷۸ در تحقیقات مورد استفاده قرار گرفته است (۹). از این مدل برای بررسی جنبه‌های مختلف سپسیس از جمله وضعیت متابولیسم بدن، چگونگی درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها، عوامل میکروبی دخیل، پاسخ‌های قلبی - عروقی، عملکرد سیستم ایمنی، واسطه‌های ایمنی ترشح شده در التهاب و وضعیت سیستم آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌شود. مدل CLP تکرارپذیر بوده و قابلیت انجام آن در حیوانات مختلف از جمله خوک، سگ، موش و رت وجود دارد (۱۰). مطالعات مختلف نشان داده‌اند اکثر فاکتورهای استرس اکسیداتیو در این مدل افزایش یافته و عملکرد آنتی‌اکسیدان‌ها کاهش می‌یابد (۱۱).

امروزه، داروهای مختلفی از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها، داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی (NSAID) و غیره برای کاهش و یا درمان عوارض ناشی از سپسیس مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به نقش مهم و اصلی استرس اکسیداتیو در عوارض ناشی از سپسیس، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها و عوامل طبیعی نیز مورد توجه است، به طوری که از دیرباز استفاده از گیاهان دارویی (Herbal Drugs) در طب سنتی به دلیل دسترسی آسان و قیمت پایین، نقش مهمی را در این زمینه، به خصوص در کشورهای در حال پیشرفت از جمله کشورهای آسیایی داشته‌اند (۱۲). آبیروگست با نام تجاری STW5، یک فرآورده از گیاهان دارویی است که مخلوط ثابتی از عصاره هیدروآتانولی ۹ گیاه مختلف اعم از: ایریس (*Bitter candytuft*)، ریشه سنبل (*Angelica root*)، گل بابونه (*Chamomile flower*)، میوه زیره سیاه (*Caraway fruit*)، بوته خار شوک (*Milk thistle fruit*)، بلسان (*Balm leaf*)، برگ نعناع فلفلی (*Peppermint leaf*)، گیاه مامیران (*Celandine herb*)، ریشه شیرین بیان (*Liquorice root*) بوده که هر کدام دارای ترکیبات خاص و فعال با خواص فیتوشیمی از جمله فلاوونوئیدها و اسانس می‌باشند. کشت این گیاهان در شرایط خاص و کاملاً کنترل شده صورت می‌گیرد و سپس با روش‌های مطمئن و دقیق در شرایط استاندارد، عصاره‌گیری و با یکدیگر مخلوط می‌شوند (۱۳). مطالعات مختلفی درباره اثرات درمانی این داروی گیاهی انجام شده است. آبیروگست دارای اثرات درمانی بر روی حرکات دستگاه گوارش، مهار ترشح اسید معده و اثرات آنتی‌اکسیدانی است. همچنین این ترکیب گیاهی اثرات ضدالتهابی دارد. وجود ترکیبات فلاوونوئیدی، مونوترپن‌ها و فنل‌ها در ترکیبات آبیروگست؛ دلالت بر دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی این داروی گیاهی می‌باشد (۱۴).

آبیروگست حدود ۲۵ سال در حال تولید است و جنبه‌های مختلف درمانی آن نیز به خصوص در بهبود عملکرد دستگاه گوارش و اثرات ضدالتهابی در مطالعات مختلف *in vivo* و *in vitro* مورد بررسی قرار گرفته است، ولی متأسفانه درباره اثرات درمانی آن در سپسیس و التهاب حاد، هیچ گونه مطالعه‌ای انجام نشده است.

در گروه کنترل (SOP)، رت‌ها تحت جراحی لاپاراتومی قرار گرفته و اتانول ۳۰٪ به‌عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شد. در گروه CLP، حیوانات تحت جراحی CLP قرار گرفته و اتانول ۳۰٪ به‌عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شد. چهار گروه مختلف تیمار، داروی گیاهی STW5 را در مقادیر (۲/۵، ۵ و ۲/۵mg/kg.b.w) بلافاصله بعد از CLP به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند. گروه کنترل مثبت نیز ایندومتاسین (۱۰mg/kg.b.w) را بلافاصله بعد از CLP، به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند. سپس ۲۴ ساعت پس از تیمار، رت‌ها کشته شده و بافت کبد آنها به‌منظور اندازه‌گیری پارامترهای مورد نظر جدا شد.

۲۴ ساعت بعد از القای سپسیس، تمامی رت‌ها پس از بیهوشی با اتر کالبدگشایی شدند. سپس ضایعات ماکروسکوپیکی اندام‌ها ثبت و قسمتی از بافت کبد، حداقل به ضخامت ۰/۵cm برداشته شد و در محلول بافر فرمالین ۱۰٪ پایدار ماند. برای تهیه این محلول، ۴/۶۰g از  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  با ۱۶/۳۸g از  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  در ۱۰۰ml فرمالین خالص ۳۷/۷٪ (Merk) حل و حجم آن با آب مقطر به یک لیتر رسانده شد. بعد از ۴۸ ساعت، محلول فرمالین تعویض و نمونه‌ها تا زمان تهیه مقاطع میکروسکوپیکی در دمای اتاق نگهداری شدند.

پس از پایدار شدن بافت کبد و گذراندن مراحل آماده‌سازی بافتی و تهیه بلوک‌های پارافینی، برش‌هایی به ضخامت ۶-۵μ از آن تهیه و به روش هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند (۱۵). در ادامه، مقاطع بافتی با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی و تغییرات بافتی در نمونه‌های مختلف مقایسه گردید. برای محاسبه شاخص هیستولوژیکی شدت آسیب بافتی، از یک آنالیز کمی استفاده شد.

میانگین تعداد نوتروفیل‌های نفوذیافته (Infiltrated) و حاشیه‌نشین (Sequestered) در بافت کبد هر یک از رت‌ها، از طریق شمارش تعداد سلول‌های التهابی چند هسته‌ای (پلی‌مورفونوکلئار نوتروفیل) در ۱۰ فیلد (میدان) میکروسکوپیکی و محاسبه میانگین آنها، برآورد شد. شاخص شدت آسیب بافتی در هر یک از رت‌ها، براساس میانگین تعداد نوتروفیل‌های نفوذیافته و حاشیه‌نشین

امروزه، یافتن فرمولاسیون‌های جدید، به‌ویژه با منشأ گیاهی از جمله استراتژی‌های درمانی سپسیس است. بنابراین، با توجه به تولید استاندارد این داروی گیاهی در سطح جهانی و بررسی‌های علمی انجام‌شده در زمینه خواص مختلف درمانی آن، بررسی عملکرد این داروی گیاهی در درمان سپسیس و تعدیل عوارض ناشی از آن، حایز اهمیت است. مدل CLP به‌گونه‌ای است که می‌توان در آن خواص و مکانیسم محافظتی انواع داروها و دیگر مواد طبیعی را ارزیابی کرد. لذا در این تحقیق تأثیرات حفاظتی این داروی گیاهی بر آسیب‌های هیستوپاتولوژیکی بافتی ناشی از سپسیس و التهاب حاد در بافت کبد بررسی شد، که در این راستا اثرات آبیروگست بر میزان تعداد نوتروفیل‌های نفوذیافته، حاشیه‌نشین و نیز شاخص‌های کمی و کیفی آسیب هیستوپاتولوژیکی در بافت کبد در رت‌های مبتلا به سپسیس مورد بررسی قرار گرفت.

## روش بررسی

این مطالعه در زمستان سال ۱۳۹۰ در دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. در این تحقیق، از رت‌های نر بالغ و بیستار با وزن متوسط ۱۶۰g (n=۶) استفاده شد. رت‌ها از مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. غذای حیوانات نیز از کارخانجات فرآورده‌های غذایی تهران به‌صورت پلت با فرمول استاندارد تهیه گردید. حیوانات دسترسی آزاد به غذا و آب آشامیدنی از طریق بطری داشتند.

پس از بیهوش کردن رت‌ها با استفاده از مخلوط کتامین و زایلوزین، در دیواره شکمی آنها به اندازه ۲cm برش ایجاد شد. سپس سکوم خارج و با فشار انگشت، مدفوع درون سکوم به انتها انتقال داده شد. سکوم در زیر دریچه ایلئوسکال توسط نخ بخیه ۳-۰ بخیه زده شد و در سکوم (بدون آسیب به رگ‌های خونی)، ۲ سوراخ توسط سر سوزن G20 ایجاد گردید. بعد از این مرحله، با برگرداندن روده به داخل محفظه شکمی، پوست و صفاق بخیه زده شد (۱۰). حیوانات مورد مطالعه به شش گروه تقسیم شدند و داروی STW5 و ایندومتاسین بلافاصله بعد از القای سپسیس به‌صورت داخل صفاقی به رت‌ها تزریق شد.

همچنین در گروه CLP، کانون‌های پراکنده ایجاد شده از نفوذ سلول‌های التهابی تک‌هسته‌ای (مونونوکلئار)، نکروزهای لیتیک کانونی متعدد در هیپاتوسیت‌ها، تورم مجاری صفراوی (کلاتریت) خفیف با نفوذ نوتروفیل‌ها و سلول‌های تک‌هسته‌ای مشاهده شد. در این گروه کبد بسیار فعال بوده و هیپرپلازی و هیپرتروفی سلول‌های کوپفر کبدی کاملاً مشهود بود.

در رت‌های دچار سپسیس، اثری از احتباس صفرا و تغییر چربی (دژنراسن چربی) در هیپاتوسیت‌ها وجود نداشت، و مجاری کوچک صفراوی (Bile Canaliculi) و مجاری صفراوی (Bile Ducts) در تمام گروه‌ها نرمال بود. تیمار رت‌های دچار سپسیس با داروی ضدالتهابی ایندومتاسین، تا حد زیادی از شدت ضایعات کبدی کاسته و از بروز تغییرات بافتی شدید در آن جلوگیری کرد.

در این گروه؛ نفوذ و حاشیه‌نشینی نوتروفیل‌ها، پرخونی سیاهرگی، ادم بافت بینابینی و نکروز بافت کبد، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل شماره F-1)، و این در حالی بود که تیمار رت‌های دچار سپسیس با داروی آبیروگست در مقادیر (۲/۵، ۵ و ۱۰ mg/kg.b.w) قادر به کاهش آسیب بافت کبد نبود، به‌طوری‌که تغییرات پاتولوژیک از جمله نفوذ و حاشیه‌نشینی شدید نوتروفیل‌ها، پرخونی شدید، ادم بافت بینابینی و نکروز بافت کبد در این گروه‌ها مشهود بود (شکل شماره E-C -1)؛ بدین معنی که از شدت تغییرات پاتولوژیک حاصل از سپسیس در این گروه‌ها کاسته نشده بود.

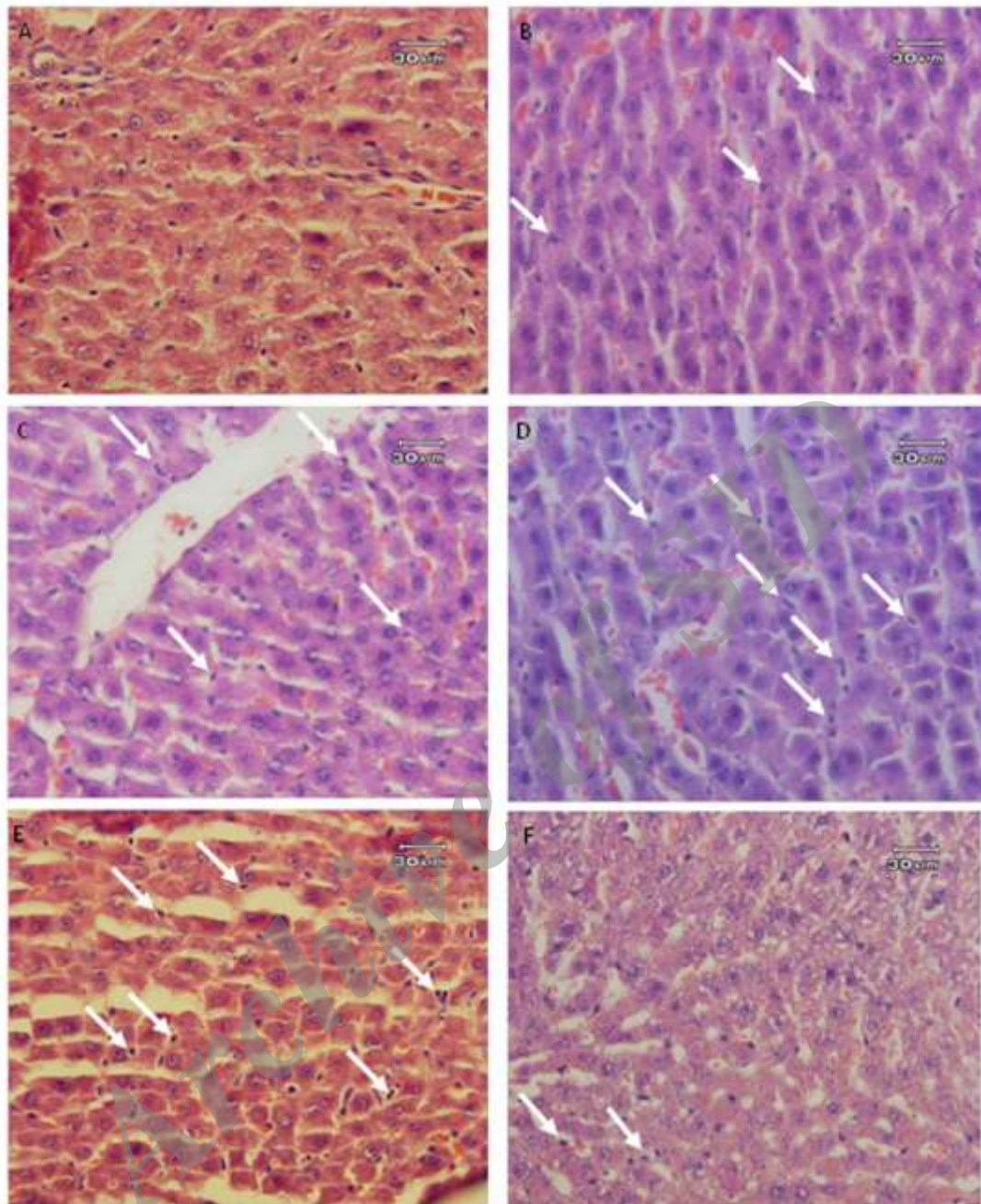
تصاویر مربوط به مقاطع بافت کبد تمام گروه‌ها که به روش H&E رنگ آمیزی شدند در شکل شماره ۱ آورده شده است.

از ۴-۰ درجه‌بندی شد، بدین صورت که عدد (درجه صفر) نشانگر تعداد ۰-۹ نوتروفیل، عدد (درجه ۱) نشان‌دهنده تعداد ۱۰-۱۹ نوتروفیل، عدد (درجه ۲) نشانه تعداد ۲۰-۲۹ نوتروفیل، عدد (درجه ۳) نشان‌دهنده تعداد ۳۰-۳۹ نوتروفیل و در نهایت عدد (درجه ۴) نشانگر ۴۰-۴۹ نوتروفیل نفوذیافته یا حاشیه‌نشین در هر میدان میکروسکوپی بود.

میانگین شاخص شدت آسیب بافتی در گروه‌ها براساس شاخص شدت آسیب بافتی در هر یک از رت‌ها تعیین شد (۱۶، ۱۷). به‌منظور مطالعه نوع و شدت تغییرات هیستولوژیکی از جمله پرخونی سیاهرگی احتقان (Congestion)، ادم بافت بینابینی کبد (Interstitial Edema)، دژنراسن گرانولار هیپاتوسیت‌ها (Granular Degeneration)، نکروز، هیپرتروفی و هیپرپلازی سلول‌ها، به‌ویژه سلول‌های کوپفر، از یک مقیاس درجه‌بندی نیمه کمی استفاده شد، به‌طوری‌که عدد (درجه صفر): برای توصیف حالت طبیعی (بودن تغییر بافتی)؛ +۱: برای تغییرات بافتی خفیف؛ +۲: برای تغییرات بافتی ملایم (متوسط) و +۳: برای تغییرات شدید در نظر گرفته شد (۱۷). تفاوت بین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و تست واریانس و تعقیبی توکی تعیین گردید. همچنین با استفاده از این نرم‌افزار سطح معنی‌داری و میانگین (SE) داده‌ها محاسبه شد. سطح معنی‌داری  $p < 0/05$  در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

در مطالعه هیستوپاتولوژیک بیوپسی‌های بافت کبد در گروه کنترل، لاپاراتومی (پرخونی خفیف بافت کبد و درجات خفیفی از دژنراسن گرانولار سلول‌های کبدی) مشاهده شد (شکل شماره A-1). در این گروه آثاری از نفوذ و حاشیه‌نشینی نوتروفیل‌ها دیده نشد. همچنین بیشترین تغییرات آسیب‌شناختی در گروه رت‌های مبتلا به سپسیس (گروه CLP) مشاهده گردید. در این گروه، بافت کبد در بررسی ظاهری (ماکروسکوپی)، دچار پرخونی سیاهرگی (احتقان) شدید شده بود که بررسی هیستوپاتولوژیک؛ پرخونی شدید، ادم شدید بافت بینابینی کبد، دژنراسن گرانولار هیپاتوسیت‌ها، نفوذ و حاشیه‌نشینی شدید نوتروفیل‌ها را در بافت کبد نشان داد (شکل شماره B-1).



شکل شماره ۱: تصاویر میکروسکوپی مربوط به بررسی‌های هیستولوژیک بافت کبد در گروه‌های مختلف و نمایی از بافت کبد در گروه کنترل را نشان می‌دهد. در این گروه، رت‌ها لاپاراتومی شده و فقط ۰/۵ml اتانول ۳۰٪ حلال دارو را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند (شکل A). در این گروه رت‌ها CLP شده و بلافاصله ۰/۵ml اتانول ۳۰٪، به صورت داخل صفاقی به آنها تزریق شد (شکل B). به رت‌های این گروه بلافاصله پس از CLP، (۲/۵، ۵ و ۱۰ mg/kg.b.w) از داروی گیاهی آبیروگست به صورت داخل صفاقی تزریق گردید (شکل‌های C-E). در این گروه به رت‌ها بلافاصله پس از CLP، ۱۰ mg/kg.b.w از داروی ایندومتاسین (گروه کنترل مثبت) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. فلش‌ها نشان‌دهنده لکوسیت‌های چند هسته‌ای (پلی مورفونوکلر) از نوع نوتروفیل نفوذ یافته و حاشیه‌نشین در بافت کبد می‌باشد. مقاطع بافت کبد به روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی و تصاویر با درشت‌نمایی ۴۰۰× گرفته شده‌اند.

هیستولوژیکی شدت آسیب بافت کبد در گروه CLP در مقایسه با گروه کنترل (لاپاراتومی)، به طور معنی دار ۴ برابر افزایش داشته است ( $p < 0.05$ ). تیمار رت‌های دچار سپسیس با داروی گیاهی آبیروگست در مقادیر (۲، ۵ و  $10/5 \text{ mg/kg.b.w}$ )، تغییری در شاخص هیستولوژیکی شدت آسیب بافت کبد، همچنین تعداد نوتروفیل‌های نفوذ یافته و حاشیه‌نشین ایجاد نکرده است.

نتایج حاصل از آنالیز کمی آسیب بافتی کبد از جمله میانگین تعداد لکوسیت‌های پلی‌مورفونوکلئار (نوتروفیل) نفوذ یافته و حاشیه‌نشین و شاخص هیستولوژیکی شدت آسیب بافت کبد در تمام گروه‌ها در جدول و نمودارهای شماره ۱ و ۲ به طور خلاصه ارائه شده است. همان‌طور که در قسمت نتایج هیستوپاتولوژیک بیان شد، تعداد نوتروفیل‌های نفوذ یافته و حاشیه‌نشین و شاخص

جدول: تأثیر داروی گیاهی آبیروگست بر روی تعداد نوتروفیل‌های نفوذ یافته و حاشیه‌نشین و شاخص هیستولوژیکی شدت آسیب بافتی در کبد رت‌های مبتلا به سپسیس

گروه‌ها	میانگین تعداد نوتروفیل‌های نفوذ یافته و حاشیه‌نشین	شاخص شدت آسیب بافتی	نوع تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد	شدت تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد
لاپاراتومی (SOP)	$1/26 \pm 0/3$	$0/41 \pm 0/1$	پرخونی و نکروز بسیار خفیف، نفوذ و حاشیه‌نشینی بسیار خفیف نوتروفیل‌ها در بعضی مناطق	+
CLP	$4/7 \pm 0/6^{\circ}$	$1/5 \pm 0/28^{\circ}$	پرخونی شدید، ادم بافت بینابینی، نفوذ و حاشیه‌نشینی شدید نوتروفیل‌ها	+++
CLP+STW5 <sub>2.5</sub>	$3/5 \pm 0/6$	$1/3 \pm 0/3$	تغییرات پاتولوژیک شدید از جمله پرخونی شدید، ادم بافت بینابینی، نفوذ و حاشیه‌نشینی شدید نوتروفیل‌ها و نکروزهای لیتیک کانونی	+++
CLP+ STW5 <sub>5</sub>	$5/2 \pm 0/7$	$2 \pm 0/57$	تغییرات پاتولوژیک شدید از جمله پرخونی شدید، ادم بافت بینابینی، نفوذ و حاشیه‌نشینی شدید نوتروفیل‌ها و نکروزهای لیتیک کانونی	+++
CLP+ STW5 <sub>10</sub>	$5/8 \pm 0/7$	$2/3 \pm 0/3$	تغییرات پاتولوژیک شدید از جمله پرخونی شدید، ادم بافت بینابینی، نفوذ و حاشیه‌نشینی شدید نوتروفیل‌ها و نکروزهای لیتیک کانونی	+++
CLP+Ind <sub>10</sub>	$2/6 \pm 0/5^{\circ\circ}$	$0/75 \pm 0/2^{\circ\circ}$	پرخونی، ادم بافت بینابینی و نکروز خفیف، نفوذ و حاشیه‌نشینی خفیف نوتروفیل‌ها	+

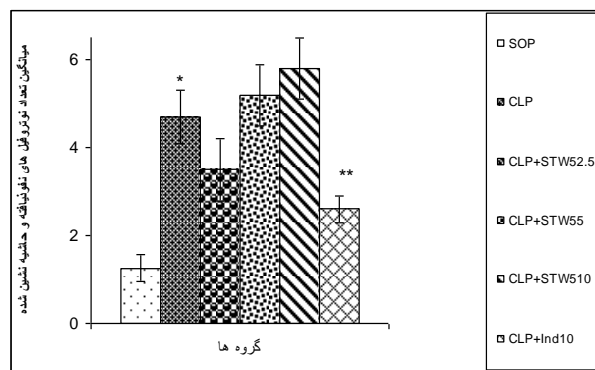
علامت\* نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه CLP بوده که با گروه کنترل معنی‌دار است ( $p < 0.05$ ). علامت\*\* نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه‌های مختلف تیمار بوده که با گروه CLP معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

( $2/5$ ،  $5$  و  $10 \text{ mg/kg.b.w}$ ) بلافاصله بعد از CLP به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. گروه کنترل مثبت نیز ایندومتاسین را به مقدار ( $10 \text{ mg/kg.b.w}$ ) بلافاصله بعد از CLP به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. همچنین مقادیر براساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شد.

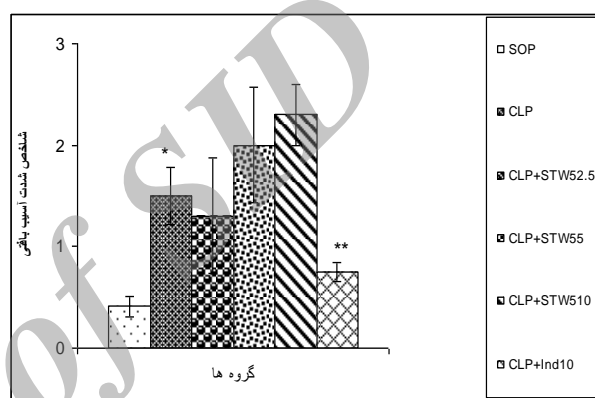
در گروه کنترل (SOP)، رت‌ها تحت جراحی لاپاراتومی قرار گرفته و اتانول ۳۰٪ به عنوان حلال دارو به آنها تزریق شد. در گروه CLP، حیوانات تحت جراحی CLP قرار گرفته و اتانول ۳۰٪ به عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شد. چهار گروه مختلف تیمار، داروی گیاهی STW5 را در مقادیر

نتایج مطالعه حاضر نشان داد آسیب هیستوپاتولوژیک بافت کبد در رت‌های مبتلا به سپسیس تیمار شده با داروی گیاهی آبیروگست در ۳ دوز متوالی جبران نشده است. همچنین احتقان شدید و تعداد نوتروفیل‌های نفوذ یافته و حاشیه‌نشین که پس از القای سپسیس به شدت افزایش یافته بود، پس از تیمار حیوانات با داروی گیاهی آبیروگست، همچنان در سطح بالایی قرار داشت (شکل شماره ۱ و جدول). مطالعات قبلی نیز مؤید این نتایج بوده است، به گونه‌ای که نشان می‌دهد تیمار رت‌ها به صورت i.p با عصاره هیدروالکلی دانه‌های زیره سیاه، قادر به جبران آسیب‌های بافتی ناشی از سپسیس نمی‌باشد (۲۴،۲۱).

همان‌طور که اشاره شد STW5 یک داروی گیاهی شناخته شده در درمان برخی از بیماری‌ها است (۱۴) (۲۶-۲۵). در این راستا، دلایل موجهی وجود دارد که می‌تواند عدم تأثیرگذاری این داروی گیاهی را در محافظت از آسیب هیستوپاتولوژیک بافت کبد رت‌های مبتلا به سپسیس (مدل CLP) توجیه کند. در مدل CLP، سپسیس از طریق هجوم میکروارگانیسم‌ها و باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی از لومن روده به جریان خون ایجاد می‌شود (۱۰). بنابراین، به نظر می‌رسد یک عصاره با فعالیت آنتی‌باکتریال که قادر به کاهش بار میکروبی در خون است می‌تواند از عوارض و آسیب‌های ناشی از سپسیس مانند اختلال در عملکرد ارگان‌ها بکاهد. مطالعات نشان داده‌اند بار میکروبی در سپسیس منجر به القای استرس اکسیداتیو شده که در نهایت منجر به آسیب اندام‌های مختلف بدن می‌شود. در مطالعات تجربی و کلینیکی مشخص شده است هرگونه رویدادی از جمله عفونت که باعث آسیب بافتی گردد، منجر به فعال‌سازی ماکروفاژها و مونوسیت‌ها نیز می‌شود. همچنین فعال‌سازی سلول‌های مذکور باعث ترشح سایتوکین‌ها و عوامل التهابی مختلف شده که همگی سبب تولید مقادیر زیادی از رادیکال‌های فعال اکسیژن ROS می‌شود و در نهایت، از طریق مکانیسم‌های مختلف از جمله پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و آسیب اکسیداتیو به ماکرومولکول‌هایی نظیر DNA و پروتئین منجر به آسیب سلول‌های بافتی می‌شوند (۶، ۱۰). متأسفانه تاکنون هیچ‌گونه مطالعه علمی مبنی بر تأیید اثرات ضدباکتریایی داروی گیاهی STW5 یافت نشده است.



نمودار شماره ۱: تأثیر داروی گیاهی آبیروگست بر روی تعداد نوتروفیل‌های نفوذ یافته و حاشیه‌نشین در کبد رت‌های مبتلا به سپسیس



نمودار شماره ۲: تأثیر داروی گیاهی آبیروگست بر روی شاخص هیستولوژیکی شدت آسیب بافتی در کبد رت‌های مبتلا به سپسیس

## بحث

مطالعات اخیر نشان داده است اسانس حاصل از دانه‌های زیره سیاه با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریایی در *in vitro* (۲۰-۱۸) از آسیب بافت کبد و ریه ناشی از سپسیس از طریق تعدیل فاکتورهای دخیل در سیستم استرس اکسیداتیو/آنتی‌اکسیدانی جلوگیری می‌کند (۱۷) (۲۳-۲۱). از آنجایی که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جمله انواع فلاوونوئیدها و اسانس حاصل از ۹ گیاه، ترکیبات موجود در داروی آبیروگست را تشکیل می‌دهند (۱۴-۱۳)، لذا در این مطالعه سعی گردید تا اثرات محافظتی این داروی گیاهی شناخته شده در آسیب بافت کبد در سپسیس القا شده توسط مدل تجربی التهابی CLP در رت از لحاظ کمی و کیفی، به ویژه از نظر تعداد نوتروفیل‌های نفوذ یافته و حاشیه‌نشین، همچنین شاخص هیستولوژیکی شدت آسیب بافتی مورد بررسی قرار گیرد.



بنابراین، می‌توان آن را یکی از دلایل عدم تأثیر این داروی گیاهی در حفاظت از آسیب بافت کبد در سپسیس دانست. همچنین نبایستی پایین بودن زیست دسترسی (Bioassay) STW5 در سیستم *in vivo* را نادیده گرفت. اگرچه در یک مطالعه نشان داده شده است STW5 در سیستم *in vitro/ex vivo* دارای زیست دسترسی نسبتاً خوبی است (۲۷)، اما هیچ‌گونه داده‌ای مبنی بر تأیید زیست دسترسی بالای این داروی گیاهی در سیستم *in vivo* وجود ندارد. وجود فلاونوئیدها به عنوان ترکیبات اصلی عصاره اتانولی این داروی گیاهی (۱۴-۱۳)، زیست دسترسی پایین آن را توجیه می‌کند. زیست دسترسی پلی‌فنل‌های رژیمی علاوه بر دلایل خواص فیزیوشیمیایی آنها، دلیل بیوترانسفورماسیون این ترکیبات نیز می‌باشد که در سیستم متابولیکی به یک‌باره وارد فاز II متابولیسم می‌شوند (۲۸-۳۴). از سوی دیگر، همان‌طور که در تحقیقات قبلی نیز آمده است نوع مدل التهابی، زمان، همچنین روش تیمار به‌عنوان متغیرهای عدم تأثیر داروی گیاهی STW5 در حفاظت از آسیب بافت کبد در مدل CLP را نمی‌توان نادیده گرفت (۲۴، ۲۱). علاوه بر اینکه فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها به اثبات رسیده است، مطالعات متعددی نیز گزارش کرده‌اند این ترکیبات دارای فعالیت پرواکسیدانی هستند (۳۵-۳۸). نتایج تحقیقات Robaszekiewicz و همکاران (سال ۲۰۰۷) نشان داد اثرات پرواکسیدانی فلاونوئیدها به‌صورت وابسته به دوز می‌باشد. همچنین این محققین گزارش کردند تیمار رده سلولی سرطان ریه انسانی A549 با غلظت‌های پایین Quercetin (۵ و  $10 \mu\text{M}$ ) منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، کاتالاز، GST و کاهش تولید ROS در این سلول‌ها می‌شود، درحالی‌که این ترکیب فلاونوئیدی در غلظت زیاد ( $100 \mu\text{M}$ ) به‌عنوان یک ترکیب پرواکسیدان عمل کرده و منجر به افزایش تولید ROS و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌گردد (۳۸). از طرفی، تیمار رده سلولی لوکمیای انسان HL-60 با یک ترکیب فلاونوئید به‌نام اپی‌ژنین باعث تولید ROS در این سلول‌ها می‌شود، و این در حالی است که تیمار هم‌زمان این سلول‌ها با مهارکننده‌های آنزیم MPO منجر به کاهش تولید ROS توسط اپی‌ژنین شده است. نتایج این تحقیق نشان داد اکسیداسیون اپی‌ژنین توسط آنزیم MPO و تبدیل شدن

آن به رادیکال فنوکسیل، مسئول اثرات پرواکسیدانی اپی‌ژنین است (۳۹). آنزیم MPO در حضور  $\text{H}_2\text{O}_2$  با گرفتن یک الکترون از حلقه کاتکول B موجود در فلاونوئیدها، آنها را به رادیکال فنوکسیل تبدیل کرده که منجر به آسیب اکسیداتیو به ماکرومولکول‌های سلول می‌شود (۴۰). همچنین مطالعات نشان داده‌اند فعالیت پرواکسیدانی پلی‌فنل‌ها در اثر واکنش آنها با فلزاتی نظیر آهن و مس ایجاد می‌شود. پلی‌فنل‌ها با اتصال به  $\text{Fe}^{3+}$  آن را به  $\text{Fe}^{2+}$  احیا می‌کنند. در این فرآیند، پلی‌فنل‌ها خود به سمی کوئینون اکسید می‌شوند که در ادامه قادر است یک اتم  $\text{Fe}^{3+}$  دیگر را به  $\text{Fe}^{2+}$  احیا کرده و خود به کوئینون تبدیل شود. یون  $\text{Fe}^{2+}$  حاصل از فرآیند فوق، در واکنش شبه فتونی شرکت کرده و منجر به تولید رادیکال‌های هیدروکسیل می‌شود (۴۱). همچنین پلی‌فنل‌ها با فعالیتی همانند آنزیم سوپراکسید دسموتاز با آنیون‌های سوپراکسید واکنش داده و  $\text{H}_2\text{O}_2$  و رادیکال‌های سمی کوئینون ایجاد می‌کنند.  $\text{H}_2\text{O}_2$  حاصل از فرآیند فوق نیز قادر است در واکنش فتون شرکت کرده و در حضور  $\text{Fe}^{2+}$  رادیکال‌های هیدروکسیل بیشتری تولید کند (۴۱). به‌طور کلی، با توجه به مطالب فوق می‌توان بیان کرد پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها در حالت احیا به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند، در صورتی‌که این ترکیبات در حالت اکسید شده (مثل رادیکال فنوکسیل یا کوئینون) می‌توانند به‌عنوان یک عامل پرواکسیدان عمل نمایند (۴۰). نتایج تحقیق حاضر نشان داده است در شرایط سپسیس، میزان تولید ROS و فعالیت آنزیم افزایش و سطح آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر گلوکاتیون کاهش می‌یابد. بنابراین، احتمالاً در این شرایط، پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدهای موجود در عصاره هیدروالکلی STW5 به حالت اکسید درآمده و به‌عنوان یک عامل پرواکسیدان عمل کرده‌اند، به‌طوری‌که قادر به جبران آسیب‌های ناشی از سپسیس نمی‌باشند.

### نتیجه‌گیری

طبق نتایج این مطالعه، تزریق داخل صفاقی داروی گیاهی STW5 بلافاصله بعد از القای سپسیس، هیچ‌گونه تأثیری بر روی تعدیل پارامترهای هیستوپاتولوژیک آسیب بافتی در کبد ندارد. با توجه به نقش درمانی شناخته‌شده STW5 در بسیاری از بیماری‌ها،



## تشکر و قدردانی

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

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

## References:

1. Victor VM, Rocha M, De la Fuente M. Immune Cells: Free Radicals and Antioxidants in Sepsis. *Int Immunopharmacol* 2004;4(3):327-347.
2. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions of Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest* 1992;101(6):1644-1655.
3. Parker SJ, Watkins PE. Experimental Models of Gram-negative Sepsis. *Br J Surg* 2001;88(1):22-30.
4. Basu S, Eriksson M. Vitamin E in Relation to Lipid Peroxidation in Experimental Septic Shock. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000;62(3):195-9.
5. Basu S, Eriksson M. Lipid Peroxidation Induced by an Early Inflammatory Response in Endotoxaemia. *Acta Anaesthesiol Scand* 2000;44(1):17-23.
6. Gutteridge JM, Mitchell J. Redox Imbalance in the Critically Ill. *Br Med Bull* 1999;55(1):49-75.
7. Victor VM, De La Fuente M. Changes in the Superoxide Production and other Macrophage Functions Could be Related with the Mortality of Mice with Endotoxin-induced Oxidative Stress. *Physiol Res* 2003;52(1):101-10.
8. Zimmerman JJ. Defining the Role of Oxyradicals in the Pathogenesis of Sepsis. *Crit Care Med* 1995;23(4):616-7.
9. Chaudry IH, Hirasawa H, Baue AE. Effect of Adenosine Triphosphate-glucose Administration Following Sepsis. *J Surg Res* 1980;29(4):348-356.
10. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD. Cecal Ligation and Puncture. *Shock* 2005;24(Suppl 1):52-57.
11. Koksai GM, Sayilgan C, Aydin S, Oz H, Uzun H. Correlation of Plasma and Tissue Oxidative Stresses in Intra-abdominal Sepsis. *J Surg Res* 2004;122(2):180-183.
12. Alitonou GA, Avlessi F, Sohounhloué DK, Agnanié H, Bessière JM, Menut C. Investigations on the Essential Oil of *Cymbopogon Giganteus* from Benin for Its Potential Use as an Anti-inflammatory Agent. *Int J Aromather* 2006;16(1):37-41.
13. Kroll U, Cordes C. Pharmaceutical Prerequisites for a Multi-target Therapy. *Phytomedicine* 2006;13(Suppl 5):12-9.
14. Wegener T, Wagner H. The Active Components and the Pharmacological Multi-target Principle of STW 5 (Iberogast). *Phytomedicine* 2006;13(Suppl 5):20-35.
15. Luna LG. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: McGraw- Hill Book Company; 1968.
16. Liaw WJ, Chen TH, Lai ZZ, Chen SJ, Chen A, Tzao C, Wu JY, Wu CC. Effects of Membrane-Permeable Radical Scavenger, Tempol, on Intraperitoneal Sepsis-Induced Organ Injury in Rats. *Shock* 2005;23(1):88-96.
17. Fatemi F, Allameh A, Khalafi H, Ashrafihelan J. Hepatoprotective Effects of G-irradiated Caraway Essential Oils in Experimental Sepsis. *Appl Radiat Isot* 2010;68(2):280-285.

18. Fatemi F, Allameh A, Khalafi H, Rajae R, Rezaei MB. Biochemical Properties of  $\gamma$ -irradiated Caraway Essential Oils. *J Food Biochem* 2011;35(2):650-662.
19. Fatemi F, Khalafi H, Rezaei MB, Seyhoon, M. Considering the Effect of Electron Beam Irradiation on the Biological Properties of Caraway Essential Oils. *J Med Plant*. Forthcoming 2013.
20. Dadkhah A, Khalafi H, Rajae R, Allameh A, Rezaei MB, Seyhoon, M. Study of the Effects of Gamma-irradiation on Microbial Load and Efficient Extracts of Caraway Seeds. *J Nuclear Sci Technol* 2009;49:27-34. [Full Text in Persian]
21. Fatemi F, Allameh A, Khalafi H, Rezaei MB, Seyhoon M. The Effect of Essential Oils and Hydroalcoholic Extract of Caraway Seed on Oxidative Stress Parameters in Rats Suffering from Acute Lung Inflammation before and after  $\gamma$ -Irradiation. *Iran J Med Aromatic Plants Res* 2010;25(4):441-455. [Full Text in Persian]
22. Dadkhah A, Fatemi F. Heart and Kidney Oxidative Stress Status in Septic Rats Treated with Caraway Extracts. *Pharm Biol* 2011;49(7):679-686.
23. Dadkhah A, Fatemi F, Davoodian N. Effect of Caraway Essential Oil on the Level of Oxidative Stress Factors in Heart and Kidney Tissues of Septic Rats. *J Res in Med Sci* 2011;35(1):7-13. [Full Text in Persian]
24. Dadkhah A, Fatemi F, Davoodian N. Considering the Protective Role of Caraway Hydroalcoholic Extract in Heart and Kidney Tissues Injury in CLP Rat Model. *Qom Univ Med Sci J* 2011;5(3):5-13. [Full Text in Persian]
25. Khayyal MT, Seif-El-Nasr M, El-Ghazaly MA, Okpanyi SN, Kelber O, Weiser D. Mechanisms Involved in the Gastro-protective Effect of STW 5 (Iberogasts) and Its Components Against Ulcers and Rebound Acidity. *Phytomedicine* 2006;13(Suppl 5):56-66.
26. Muller MH, Liu CY, Glatzle J, Weiser D, Kelber O, Enck P, Grundy D, Kreis ME. STW 5 (Iberogasts) Reduces Afferent Sensitivity in the Rat Small Intestine. *Phytomedicine* 2006;13(Suppl 5):100-6.
27. Kelber O, Wittwer A, Lapke C, Kroll U, Weiser D, Okpanyi SN, Heilmann J. Ex vivo/in vitro Absorption of STW 5 (Iberogasts) and Its Extract Components. *Phytomedicine* 2006;13(Suppl 5):107-13.
28. Yang CS, Sang S, Lambert JD, Lee MJ. Bioavailability Issues in Studying the Health Effects of Plant Polyphenolic Compounds. *Mol Nutr Food Res* 2008;52(Suppl 1):39-51.
29. Lambert JD, Yang CS. Cancer Chemopreventive Activity and Bioavailability of Tea and Tea Polyphenols. *Mutat Res* 2003;523-524:201-208.
30. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79(5):727-747.
31. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and Bioefficacy of Polyphenols in Humans. I. Review of 97 Bioavailability Studies. *Am J Clin Nutr* 2005;81(Suppl 1):230-242.
32. Scalbert A, Morand C, Manach C, Remesy C. Absorption and Metabolism of Polyphenols in the Gut and Impact on Health. *Biomed Pharmacother* 2002;56(6):276-282.
33. Lu H, Meng X, Yang CS. Enzymology of Methylation of Tea Catechins and Inhibition of Catechol-O-methyltransferase by (-)-epigallocatechin Gallate. *Drug Metab Dispos* 2003;31(5):572-579.
34. Lu H, Meng X, Li C, Sang S, Patten C, Sheng S, Hong J, Bai N, Winnik B, Ho CT, Yang CS. Glucuronides of Tea Catechins: Enzymology of Biosynthesis and Biological Activities. *Drug Metabol Dispos* 2003;31(4):452-461.
35. Panemangalore M, Bebe FN. Short- and Long-term Exposure to Low Levels of Pesticide and Flavonoid Mixtures Modify Endogenous Antioxidants in Tissues of Rats. *J Environ Sci Health B* 2009;44(4):357-364.

36. Murzakhmetova M, Moldakarimov S, Tancheva L, Abarova S, Serkedjieva J. Antioxidant and Prooxidant Properties of a Polyphenol-rich Extract from Geranium Sanguineum L. In Vitro and In Vivo. *Phytother Res* 2008;22(6):746-751.
37. Babich H, Gottesman RT, Liebling EJ, Schuck AG. Theaflavin-3-Gallate and Theaflavin-3-Gallate, Polyphenols in Black Tea with Prooxidant Properties. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;103(1):66-74.
38. Robaszkiewicz A, Balcerczyk A, Bartosz G. Antioxidative and Prooxidative Effects of Quercetin on A549 Cells. *Cell Biol Int* 2007;31(10):1245-1250.
39. Miyoshi N, Naniwa K, Yamada T, Osawa T, Nakamura Y. Dietary Flavonoid Apigenin Is A Potential Inducer of Intracellular Oxidative Stress: The Role in the Interruptive Apoptotic Signal. *Arch Biochem Biophys* 2007;466(2): 274-282.
40. Galati G, O'brien PJ. Potential Toxicity of Flavonoids and Other Dietary Phenolics: Significance For Their Chemopreventive and Anticancer Properties. *Free Radio Biol Med* 2004;37(3):287-303.
41. Perron NR, Brumaghim JL. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochem Biophys* 2009;53(2):75-100.

Archive of SID