مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هجدهم، شماره ۱، دی ۱۳۹۴، صفحه ۵۱-۴۴

اثر حفاظتی عصاره هیدروالکلی علف چای(گل راعی) بر فیبروز ریوی ناشی از بلئومایسین در موش صحرایی

الهام ابراهیمی ناغانی (MSc)[۱]، ایرج جوادی (PhD)*[۱]، محمدرضا رشیدی نوش آبادی (PhD)[۲]، مهدی گودرزی (PhD)[۲]، غلامرضا هوشمند (PhD)[۲]

۱-گروه سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرضا
۲-گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

دریافت: ۹۴/۳/۲۳، اصلاح:۹۴/۵/۷، پذیرش:۹۴/۷/۶

خلاصه

سابقه و هدف: فیبروز ریه یک بیماری مزمن ریوی بینابینی است که به علت صدمه به پارانشیم ریه به وسیله فاکتورهای ایجاد کننده التهاب و فیبروز به وجود می‌آید. علف چای حاوی فلاونوئیدهای متنوعی است که به منظور عنوان آنتی اکسیدان مطرح می‌شوند. این مطالعه به منظور بررسی اثر عصاره هیدروالکلی علف چای روی فیبروز ریوی القاء شده توسط بلئومایسین در موش صحرایی انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی بر روی ۳۰ سر موش صحرایی نژاد ویستار در محدوده وزنی ۱۸۰- ۱۵۰ گرم انجام گرفت. حیوانات به صورت تصادفی به ۵ گروه ۶ تایی تقسیم‌بندی شدند. گروه ۱و۲ به ترتیب تک دوز نرمال سالین به صورت درون صفاقی و بلئومایسین (۷/۵ واحد بر کیلوگرم) به صورت داخل تراشه‌ای دریافت نمودند. گروه ۵-۳ دوزهای مختلف عصاره علف چای (۵۰،۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی روزانه یک هفته قبل و دو هفته بعد از تجویز بلئومایسین دریافت نمودند. حیوانات پس از ۲۱ روز کشته و خون و ریه‌های آنها برای اندازه‌گیری مالون دی آلدئید پلاسمایی و هیدروکسی پرولین ریه و آزمایش هیستوپاتولوژی جمع‌آوری شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که میزان اندکس ریه، هیدروکسی پرولین و مالون‌دی‌آلدئید در گروه نرمال سالین به ترتیب ۰/۳۲±۷/۰۹ میلی‌گرم ریه بر گرم وزن بدن، ۰/۲۳±۱/۸۰ میلی‌گرم بر گرم بافت ریه و ۰/۲۷±۱/۳۲ میکرومول بر لیتر پلاسما بود در حالی که در گروه دریافت کننده بلئومایسین به ترتیب ۰/۹۰±۹/۷۵ میلی‌گرم ریه بر گرم وزن بدن، ۰/۷±۵/۴۳ میلی‌گرم بر گرم بافت ریه و ۰/۴۲±۳/۰۴ میکرومول بر لیتر پلاسما بود. تیمار با عصاره به خصوص در گروه دریافت کننده ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره بطور معناداری این فاکتورها را نسبت به گروه بلئومایسین کاهش داد($p<0/05$).

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی علف چای احتمالا اثر حفاظتی بر فیبروز القا شده توسط بلئومایسین دارد.

واژه‌های کلیدی: فیبروز ریوی، عصاره علف چای ، بلئومایسین، موش صحرایی.

مقدمه

فیبروز ریه یک بیماری مزمن ریوی بینابینی است که به علت صدمه به پارانشیم ریه به وسیله فاکتورهای ایجاد کننده التهاب و فیبروز به وجود می‌آید. این بیماری همراه با میزان بالای مرگ و میر بوده و نسبت به درمانهای پزشکی مقاوم می‌باشد. بطوریکه بقاء متوسط این بیماری ۳-۲ سال می‌باشد(۱). علل ایجاد فیبروز ریوی و پاتوژنز بیماری به طور واضح مشخص نشده است ولی عوامل مختلفی مانند گونه‌های اکسیژن فعال، فاکتورهای رشد، سلولهای التهابی مانند لنفوسیتها و نوتروفیلها، سایتوکین‌ها وکموکاین‌ها نقش مهم و عمده ای به طور مستقیم و یا غیر مستقیم در روند فیبروتیک ایفا می‌کنند (۳و۲). از عوامل شناخته شده در بروز این بیماری می‌توان به عفونتهای ویروسی ناشی از بعضی هرپس ویروسها و باکتری‌ها، آسیب حاصل از برخی ترکیبات معدنی مثل آزبست و سیلیکا و در نهایت عوارض جانبی پاره‌ای از داروهای شیمیایی مثل بلئومایسین و متوتروکسات اشاره کرد(۴). بلئومایسین یک آنتی بیوتیک ضد میکروبی قوی است که در درمان کارسینوم سلولهای فلسی شکل سر و گردن، کارسینوم بیضه‌ها، سارکوم بعضی نسوج صاف و بیماری هوجکین مؤثر بوده است(۵). این دارو از طریق واکنشهای وسیع ایمونولوژیک باعث صدمه به سلولهای آلوئولی، افزایش تجمع سلولهای التهابی و افزایش بافت کلاژن در ناحیه کیسه‌های هوایی و تحریک تکثیر فیبروبلاستها در ناحیه بینابینی کیسه‌های هوایی و در نهایت ایجاد فیبروز می‌شود. همچنین گفته شده که بلئومایسین باعث تغییر متابولیسم ایکوزانوئیدها شده و احتمال دارد این تغییرات بخصوص روی پروستاگلاندین‌ها و ترومبوکسان، نقش مهمی در ایجاد فیبروز داشته باشند(۶). تولید پروتئین TGF-B که یک فاکتور رشد تومور است و در فرآیند تکثیر فیبروبلاستها و ایجاد فیبروز ریوی نقش کلیدی دارد، توسط بلئومایسین افزایش می‌یابد (۷). با وجود مطالعات بسیار، علل ایجاد فیبروز ریوی و پاتوژنز بیماری، هنوز به طور دقیق مشخص نیست تاکنون تحقیقات زیادی در مهار این نوع فیبروز ریوی انجام شده است و ترکیبات زیادی نیز جهت پیشگیری

▣ این مقاله حاصل پایان نامه الهام ابراهیمی ناغانی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته سم شناسی دانشکده داروسازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرضا می باشد.
* مسئول مقاله: دکتر ایرج جوادی
آدرس: شهرضا، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده داروسازی، گروه سم شناسی. تلفن: ۰۳۱-۵۳۵۱۲۳۰۴
E-mail:irjava@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

و درمان آن معرفی شده‌اند که هریک با مکانیسم و روش خاصی عمل می‌کنند(۸و۴). تاکنون هیچ درمان دارویی مؤثری برای فیبروز ریوی یافت نشده است(۱۱-۹). یکی از رویکردهای درمانی در این بیماری استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدان جهت حذف رادیکال‌های آزاد و پیشگیری از فرآیندهای التهابی است(۱۲). امروزه توجه زیادی به استفاده از داروهای گیاهی می‌شود. گیاه علف چای یا گل راعی با نام علمی *Hypricum perforatum* گیاهی است علفی و پایا به ارتفاع ۱۱۰-۱۰ سانتی متر بدون کرک با گلهایی به رنگ زرد درخشان جزء گیاهان دارویی که قسمتهای مورد استفاده آن سرشاخه های گلدار و نیز گلهای گیاه می‌باشد (۱۳). مطالعات فیتوشیمیایی نشان داده که گیاه راعی سرشار از فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها بوده و دارای فعالیت آنتی اکسیدانی می‌باشد(۱۴). مهمترین فلاونوئیدهای موجود در گیاه کوئرستین و لوتئولین می‌باشند. مقدار فلاونوئیدها در گلهای گیاه ۱۱/۷٪ و در برگ و ساقه ۷/۴٪ می‌باشد (۱۵). بیشترین کاربرد این گیاه تا به حال در درمان افسردگی و بیماریهای عصبی بوده است(۱۷و۱۶). مطالعات نشان داده که اثرات ضد التهابی و ضد درد، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، تغییر نفوذ پذیری مویرگها، ضد آریتمی، گشادکنندگی عروق کرونر، ضد اسپاسم، تغییر قدرت و سرعت انقباض قلب بیشتر بخاطر فلاونوئیدها و هایپرفورین موجود در گیاه است (۱۸). نظر به اینکه بیماری فیبروز ریوی در واقع یک بیماری التهابی پیشرونده است و با التهاب حاد در ریه آغاز شده و به مرور این التهاب روند مزمن به خود گرفته و منجر به فیبروزه شدن آلوئول های ریه می گردد و از طرفی اثر ضد التهابی عصاره تام (و همچنین فلاوونوئیدهای موجود در این عصاره از جمله کوئرستین) در مطالعات پیشین ثابت گردیده است(۸) و با توجه به عوارض جانبی فراوان و هزینه های بالای داروهای شیمیایی که برای درمان این بیماری تجویز می شود، لذا این مطالعه به منظور بررسی اثر محافظتی عصاره هیدروالکلی علف چای که گیاهی ارزان و در دسترس می باشد، در فیبروز ریوی ناشی از بلئومایسین انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره: گیاه علف چای از شرکت داروهای گیاهی گل دارو واقع در اصفهان تهیه شد. زمان برداشت گیاه خرداد ماه و گیاه با شماره هرباریوم ۱۱۴۲۷ در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان شناسایی شد. جهت تهیه عصاره از روش خیساندن استفاده شد(۲۰و۱۹). ابتدا سرشاخه های گیاه علف چای در سایه، سریع خشک شده، سپس به قطعات کوچک(۳-۲ سانتی متری) خرد و سپس به مدت ۷۲ ساعت در حلال اتانولی ۷۰٪ (۳۰ آب: ۷۰ اتانول) خیسانده شدند. پس از سه روز عصاره حاصل صاف شد، بر روی تفاله باقیمانده اتانول ۷۰٪ ریخته و به عصارهٔ اول اضافه شد. سپس عصاره بدست آمده از کاغذ صافی عبور داده شد و محلول صاف شده توسط دستگاه روتاری تغلیظ گردید و پس از قرار دادن در فور ۴۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد، عصاره خشک بدست آمد (۲۳-۲۱و۱۹).

مطالعه حیوانی: برای انجام این مطالعه تجربی، از ۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ و سالم از نژاد ویستار با محدوده وزنی ۱۸۰-۱۵۰ گرم استفاده گردید. حیوانات از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان خریداری شدند. حیوانات در قفس‌هایی از جنس پلی کربنات در دمای ۴±۲۴درجه سانتی گراد در سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند و توسط غذای فشرده مخصوص خریداری شده از شرکت خوراک دام و آب لوله‌کشی شهری تغذیه گردیدند. برای سازگاری بیشتر با محیط آزمایشگاه یک هفته پیش از شروع مطالعه حیوانات در شرایط مذکور قرار داده شدند. حیوانات در ۵ گروه ۶ تایی تقسیم شدند:

-گروه یک (نرمال سالین): دریافت محلول سرم فیزیولوژی به صورت داخل صفاقی برای مدت ۲۱ روز

-گروه دو (بلئومایسین): حامل دارو (نرمال سالین) را با حجم معادل برای مدت ۷ روز متوالی قبل و ۱۴ روز متوالی بعد از تجویز تک دوز بلئومایسین (IU/Kg ۷/۵) دریافت کردند.

-گروه سه، چهار و پنج: به ترتیب دوزهای mg/kg ۲۰۰ و ۱۰۰و۵۰ عصاره گیاه علف چای را از طریق داخل صفاقی برای مدت ۷ روز متوالی قبل و ۱۴ روز متوالی پس از تجویز داخل تراشه‌ای تک دوز (IU/Kg ۷/۵) بلئومایسین بوسیله سرنگ انسولین دریافت نمودند (۲۵و۲۴و۲۱).

دوزهای بکار رفته در این مطالعه بر مبنای مطالعات پیشین که تاثیر پیشگیرانه و محافظتی عصاره این گیاه را بر التهاب و درد ناشی از فرمالین ثابت کرده‌اند (بیماری فیبروز ریوی یک بیماری التهابی پیشرونده است) و همچنین بر اساس مطالعاتی که اثر عصاره گیاهان مشابه را بر فیبروز ریوی ناشی از بلئومایسین مورد آزمایش قرار داده‌اند، تعیین شده است(۲۶) هیچ گونه عارضه جانبی مسمومیت‌زا و تهدید کننده ای با دوز های بکار گرفته شده از عصاره این گیاه در مطالعات انجام گرفته گزارش نشده است و بالعکس اثر محافظتی این گیاه بر مسمومیت های دارویی ناشی از داروهای توکسیک بر روی کبد و کلیه بررسی و ثابت شده است(۲۷). در پایان مطالعه، پس از اندازه‌گیری وزن حیوانات، حیوانات به وسیله تزریق کتامین بیهوش شدند. سپس قفسه سینه حیوان شکافته و ریه‌ها با دقت خارج گردید و وزن ریه موش‌ها اندازه‌گیری شد. پس از شستشوی ریه ها با نرمال سالین سرد، ریه چپ آن جهت مطالعات بافت شناسی جدا گردید و قسمتی از آن در محلول فرمالین ۱۰ ٪ قرار گرفت. جهت ارزیابی هیستوپاتولوژی از هر گروه شش لام تهیه شده(هر حیوان یک لام) و در هر لام پنج فیلد بررسی شد. مابقی قسمت‌های بافت ریه برای انجام آزمایشات بیوشیمیایی در ظرف مخصوص در فریزر در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

سنجش هیدروکسی پرولین: هموژنه ۱ درصد از بافت ریه راست در اسید هیدروکلریدریک ۶ نرمال تهیه گردید و اندازه گیری میزان هیدروکسی پرولین با روش رنگ‌سنجی توصیف شده توسط O'Brien و Edwards و استفاده از معرف ارلیش همراه با کلرامین T و استاندارد هیدروکسی پرولین انجام گرفت (۳۱-۲۸).

سنجش لیپید پراکسیداسیون(مالون دی آلدئید): جهت اندازه گیری لیپید پراکسیداسیون از روش Satoh با اندکی تغییرات استفاده شد(۳۲). بر این اساس به ۵۰۰ میکرولیتر از پلاسما ۱/۵ میلی لیتراسید تری کلرواستیک ۱۰ درصد اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ گردید. ۱/۵ میلی لیتر از مایع رویی برداشته شده و ۲ میلی لیتر تیو باربیتوریک اسید ۰/۶۷ درصد به آن اضافه گردید و بمدت ۳۰ دقیقه در بن ماری در حال جوش قرار داده شد، پس از سرد شدن به آن۲ میلی لیتر n– بوتانل اضافه گردید و سپس به خوبی مخلوط گشته شده و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ شد. محلول رویی (که صورتی رنگ است) جدا شده و در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه

Archive of SID
www.SID.ir

اسپکتروفوتومتر جذب آن قرائت گردید. جهت رسم منحنی استاندارد مالون آلدئید، غلظت های مختلفی از تترا اتوکسی پروپان برحسب نانومول ساخته شد.

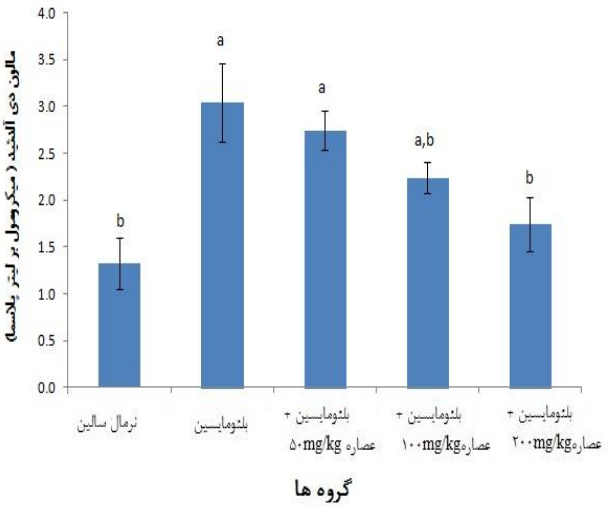
روش آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۶، آنالیز واریانس یک طرفه و تست تکمیلی توکی انجام گردید و $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

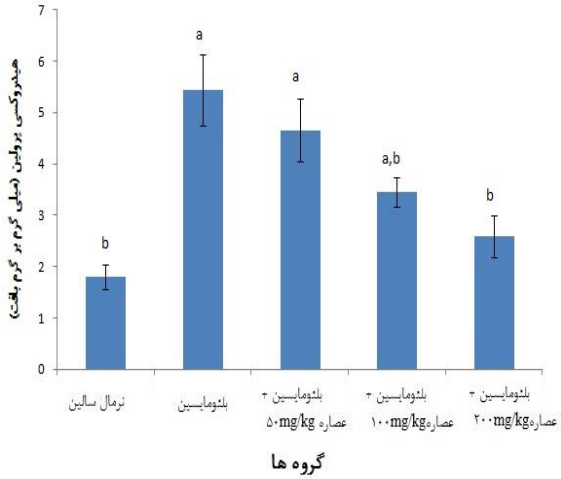
نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میزان هیدروکسی پرولین بافت ریه در گروه نرمال سالین و در گروه دریافت کننده بلئومایسین به ترتیب ۱/۸±۰/۲۳ و ۵/۴۳±۰/۷ میلی‌گرم بر بافت ریه بود. ($p<۰/۰۵$). میزان هیدروکسی پرولین بافت ریه در گروه‌های دریافت کننده ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره علف چای به ترتیب ۴/۶۶±۰/۶۱ میلی گرم ریه بر گرم وزن بدن، ۳/۴۵±۰/۲۹ میلی گرم ریه بر گرم وزن بدن و ۲/۵۹±۰/۴۰ میلی گرم ریه بر گرم وزن بدن بود (نمودار ۱).

میزان مالون‌دی‌آلدئید در گروه نرمال سالین و در گروه دریافت کننده بلئومایسین به ترتیب ۱/۳۲±۰/۲۷ و ۳/۰۴±۰/۴۲ میکرومول بر لیتر پلاسما بود. ($p<۰/۰۵$). میزان مالون‌دی‌آلدئید در گروه‌های دریافت کننده ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره علف چای به ترتیب ۲/۷۴±۰/۲۱، ۲/۲۴±۰/۱۶ و ۱/۷۴±۰/۲۹ بود (نمودار ۲).

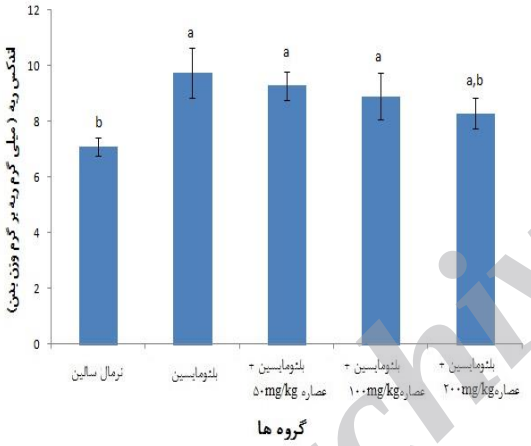
میزان اندکس ریه در گروه نرمال سالین و در گروه دریافت کننده بلئومایسین به ترتیب ۷/۰۹±۰/۳۲ و ۹/۷۵±۰/۹۰ میلی‌گرم ریه بر گرم وزن بدن بود ($p<۰/۰۵$). میزان اندکس ریه در گروه‌های دریافت کننده ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره علف چای به ترتیب ۹/۲۸±۰/۵۱ میکرومول بر لیتر پلاسما، ۸/۹۱±۰/۸۳ میکرومول بر لیتر پلاسما و ۸/۲۹±۰/۵۵ میکرومول بر لیتر پلاسما بود (نمودار ۳).



نمودار ۱. تاثیر عصاره هیدروالکلی علف چای بر میزان مالون‌دی‌آلدئید در گروه‌های مورد مطالعه. a اختلاف معنی دار با گروه نرمال سالین ($p<۰/۰۵$)، b اختلاف معنی دار با گروه بلئومایسین ($p<۰/۰۵$)



نمودار ۲. اثر عصاره علف چای بر میزان هیدروکسی پرولین ریوی در گروه‌های مورد مطالعه. a اختلاف معنی دار با گروه نرمال سالین ($p<۰/۰۵$)، b اختلاف معنی دار با گروه بلئومایسین($p<۰/۰۵$)

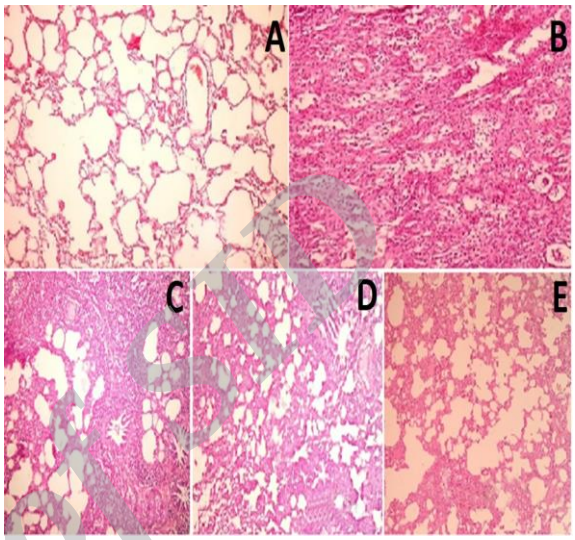


نمودار ۳. اثر عصاره علف چای بر اندکس ریه در گروههای مورد مطالعه. a اختلاف معنی دار با گروه نرمال سالین ($p<۰/۰۵$)، b اختلاف معنی دار با گروه بلئومایسین ($p<۰/۰۵$)

مشاهدات میکروسکوپی بافت ریه در گروههای مختلف حیوانات بر اساس رنگ آمیزی هماتوکسیلین نشان داد که گروه دریافت کننده نرمال سالین بافت ریه دارای نمای طبیعی می‌باشد و آلوئولها و بافت بینابینی طبیعی است و تخریبی در آن مشاهده نمی‌شود، تجمع سلولهای التهابی و فیبرهای کلاژن و یا فیبروز مشاهده نشد (شکل۱A). در گروه دریافت کننده بلئومایسین، تجمع بافت همبند و فیبروبلاستها در فضای آلوئولی و ضخیم شدن دیواره آلوئولها، تخریب گسترده و شدید آلوئولها و ایجاد فضاهای وسیع، تجمع فیبروبلاستها و فیبرهای کلاژن در بعضی مناطق ریه دیده شد. رسوب پیگمان هموسیدرین که در تصویر قابل رؤیت است نشانه خونریزی قبلی است (شکل۱B). در گروه دریافت کننده بلئومایسین و عصاره علف چای با دوز ۵۰mg/kg، ضایعات التهابی و فیبروتیک در مقایسه با گروه بلئومایسین کاهش یافته است اما دیواره ضخیم آلوئول و سلولهای التهابی در

Archive of SID
www.SID.ir

بسیاری از نواحی بافت دیده شد(شکلC۱). درگروه دریافت کننده بلئومایسین و عصاره علف چای با دوز ۱۰۰mg/kg در مقایسه با گروه قبلی کاهش آسیب ریوی با مهار نفوذ سلول‌های التهابی و کاهش ضخامت دیواره بین آلوئولی مشاهده شد (شکلD۱). در گروه دریافت کننده بلئومایسین و عصاره علف چای با دوز ۲۰۰mg/kg اکثر نواحی بافت تقریباً ساختمان نرمال دارد و از آسیب بافت ریه به شدت کاسته شده است (شکلE۱).



شکل ۱. تصاویر مقطع بافتی از ریه موش های صحرایی در گروه‌های مختلف مورد آزمایش به ترتیب از A تا E. نوع رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین با بزرگنمایی ۴۰۰

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که بیشترین میانگین مالون‌دی‌آلدئید پلاسمایی، هیدروکسی پرولین بافت ریه و اندکس ریه در گروه دریافت کننده بلئومایسین و کمترین مقدار آنها در گروه نرمال سالین بود. افزایش سطح مالون‌دی‌آلدئید پلاسما در موش‌های گروه کنترل مثبت به علت شکل‌گیری و پیشرفت واکنش‌های التهابی در ریه است. در هنگام بروز بیماری‌های التهابی ریه، بخشی از اکسیدان‌های تولید شده در ریه از غشاهای سلولی عبور کرده و به جریان خون راه می‌یابند و در آنجا سبب اکسیداسیون چربی‌های غیراشباع می‌شوند. Nohrstedt و همکارش در مطالعه‌ای ترکیبات فنیل پروبان و گلیکوزیدهای فلاونول، بای فلاون‌ها، تانن، پروآنتی سیانیدین ها، گزانتون، فلاوونوئیدها و برخی دیگر از ترکیبات فعال را از گیاه علف چای گزارش کردند(۳۳). در مطالعه حاضر، ترکیبات موجود در عصاره علف چای به طور مؤثری مواد اکسید کننده موجود در خون موش‌های بیمار را کاهش داد و سطح مالون‌دی‌آلدئید پلاسمایی در گروه‌های محافظتی ۱و۲و۳ نسبت به گروه بلئومایسین به ترتیب ۹/۸ و ۲۶/۴ و ۴۲/۹٪ کاهش یافت. به نظر می‌رسد فلاونوئیدهای موجود در عصاره علف چای از قبیل کوئرستین، روتین و آنتوسیانوزید مسئول کاهش سطح مالون دی آلدئید در گروه‌های محافظتی هستند زیرا از بین ترکیبات و مواد موثره موجود در علف چای، فقط فلاوونوئیدها با مکانیسم‌های پیشنهادی پیشگیرنده و مهار کننده فیبروز ریوی ناشی از بلئومایسین می‌توانند مطابقت داشته باشند. فلاونوئیدها می‌توانند گونه‌های واکنشی اکسیژن را جمع‌آوری کرده، یون‌های آهن را شلات کرده و پراکسیداسیون لیپیدها را مهار کنند(۳۴). تحقیقات نشان می‌دهد که فلاونوئیدها با کاهش سیتوکینهای TNF-α، IL-1(۳۵) و همچنین اثر بر مسیر سنتز اسید آراشیدونیک و مهار تولید ایکوزانوئیدها (۳۶) می‌توانند باعث کاهش التهاب شوند. فلاونوئیدها به عنوان آنتی اکسیدان عمل کرده و همچنین با افزایش ظرفیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی گلوتاتیون، گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز، می‌توانند سلول را در برابر تخلیه گلوتاتیون احیا، محافظت کنند(۳۵) و با شلاته کردن آهن به عنوان یک فاکتور در توسعه رادیکال آزاد، می‌توانند اثرات مفید خود را اعمال کنند(۳۷). فلاونوئیدها همچنین با کاهش تعداد لوکوسیتهای غیر متحرک و مهار دگرانولوسیون نوتروفیل‌ها مانع تثبیت و چسبیدن لوکوسیتها به دیواره اندوتلیال و تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن، واسطه‌های التهابی و فعال سازی بیشتر کمپلمان می‌شوند. همچنین فلاونوئیدها با محدود کردن فعالیت NF-Kb باعث کاهش التهاب می‌شوند(۳۶و۳۵) عصاره گیاه علف چای محتوی ترکیبات فنلی زیادی از جمله فلاونوئیدها و اسیدهای فنلی می‌باشد که بیانگر خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره این گیاه می‌باشد(۳۸).

Verma و همکارانش نشان دادند که کوئرستین از طریق کاهش در میزان TNF آلفا، افزایش در میزان سلول‌های التهابی در مایع بالف، کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و همچنین کاهش مقادیر مالون دی آلدهید و هیدروکسی پرولین اثر محافظتی خود بر ریه را در مقابله با فیبروزه شدن از خود نشان می‌دهد(۸). مطالعه حاضر مشخص کرد که دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره علف چای با توجه به محتوای بالای آنتی اکسیدانیش (از جمله کوئرستین) از عهده مهار التهاب و درنهایت پیشگیری از فیبروز پیشرونده ناشی از بلئومایسین برآمد. Russo و همکاران در مطالعه مروری خود بر اثرات فارماکولوژیک گل راعی، اثر هیپرفرین (از خانواده فلوروگلوسینول‌ها) موجود در گل راعی را در مهار ملکولی NFK-B که نقش مهمی در روند التهاب زایی و آنژیوژنزیس التهابی دارد را معرفی کرد. این اثر از این ترکیب یکی از مکانیسم های رایج در مهار فیبروز ریوی ناشی از بلئومایسین توسط بسیاری از گیاهان دارویی مطالعه شده در سالهای اخیر می باشد(۳۹). از دیگر ترکیبات موجود در علف چای گزانتون‌ها می‌باشند. در مطالعه libroski و همکاران اثرات قوی ضد التهابی و ضد دردی ترکیبات گزانتون از طریق فعال سازی سایتوکین‌های ضد التهابی و مهار سایتوکین‌های التهاب زا از جمله TNF اثبات گردید(۴۰)، نظر به اینکه فیبروز ریوی و التهاب ارتباط مستقیمی با هم دارند و در روند پیشرونده فیبروز ریوی اثر سایتوکین‌های التهاب زا و ضد التهابی کاملا" مشهود است، لذا می‌توان یکی از مکانیسم‌های پیشگیرانه عصاره علف چای در روند فیبروز ریوی را به اثرات گزانتون‌های موجود در این گیاه. تحقیقی که روی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی این گیاه در کشور پرتغال صورت گرفت IC_{50} معادل ۲۱ میکروگرم در اکیوالانت بیوماس وزن خشک بر میلی‌لیتر به دست آمد. نتایج به دست آمده از این مطالعه بیانگر فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانی گیاه علف چای (گل راعی) می‌باشد (۴۱). فیبروز ریوی با تجمع سلول‌های التهابی در فضاهای آلوئولی، افزایش ضخامت دیواره آلوئولی و توسعه ضایعات فیبروتیک همراه است (۱۱و۱۰). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره هیدروالکلی علف چای ضخامت دیواره آلوئولی و پیشرفت فیبروز را در موش‌هایی که بلئومایسین دریافت کرده بودند، کاهش می‌دهد. فیبروز ریوی به دنبال نفوذ ماتریکس خارج سلولی، رسوب کلاژن و تکثیر سلول‌ها در بافت بینابینی حاصل می‌شود. درصد بالایی از این سلول‌ها

Archive of SID
www.SID.ir

شامل فیبروبلاست‌ها و میوفیبروبلاست‌ها می‌باشند که موجب افزایش ساخت کلاژن ریوی شده و در نتیجه منجر به ناتوانی و نقص ریوی می‌گردند (۴۲). در این مطالعه، مقدار کلاژن بافت ریه در گروههای محافظتی ۱و۲و۳ به ترتیب به میزان ۱۴/۳٪، ۳۶/۶٪ و ۵۲/۳٪ کمتر از گروه بلئومایسین بود و در بالاترین دوز سطح کلاژن نزدیک به گروه شاهد بوده و با هم اختلاف معنی‌دار نداشتند. با توجه به این یافته‌ها، به نظر می‌رسد که تجویز آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر این عصاره نمی‌تواند از فیبروز ریوی ناشی از بلئومایسین جلوگیری کند، اما می‌تواند تا حد زیادی از پیشرفت آن جلوگیری نماید و یا روند آن را به تعویق اندازد. در نتیجه عواملی به غیر از تشکیل رادیکال‌های آزاد و گونه های واکنشی اکسیژن نیز در شکل‌گیری واکنش‌های التهابی اولیه در این بیماری دخیل می‌باشند. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که عصاره هیدروالکلی علف چای احتمالاً می‌تواند مهارکننده رسوب کلاژن، پراکسیداسیون لیپیدها و در نتیجه کاهش سطح مالون‌دی‌آلدئید پلاسمایی و در نهایت مهارکننده فیبروز ریوی باشد و ممکن است با تحقیقات بیشتر اثرات مثبت آن در بیماری‌هایی که پروسه التهاب در شروع و پیشرفت آن دخالت دارند، از جمله فیبروز ریوی، مشخص‌تر شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرضا جهت حمایت مالی از این تحقیق تشکر و قدردانی می گردد.

Archive of SID
www.SID.ir

Protective Effects of Hydroalcoholic Extract of Hypericum Perforatum Against Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Rats

E. Ebrahimi Naghani (MSc)[1], I. Javadi (PhD)*[1], M. RashidiNooshabadi (PhD)[2], M. Goudarzi (PhD)[2], G.R. Houshmand (PhD)[2]

1.Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Islamic Azad University, Shahreza Branch, Shahreza, I.R.Iran
2.Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(1); Jan 2016; PP:44-51
Received: Jun 13th 2015, Revised: Jul 29th 2015, Accepted: Sep 28th 2015.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Pulmonary fibrosis is a chronic interstitial lung disease caused by parenchymal lung damage due to inflammatory factors and fibrosis. Hypericum perforatum contains various flavonoids with antioxidant properties. This study aimed to evaluate protective effects of hydroalcoholic extract of Hypericum against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats.

METHODS: This empirical study was conducted on 30 Wistar rats weighing 150-180 grams. Animals were randomly divided into five groups of six. Group one received a single dose of normal saline intraperitoneally, and group two was administered with bleomycin (7.5 units per kg) intratracheally. Other groups received daily doses of Hypericum extract (50, 100 and 200 mg/kg) via intraperitoneal injection one week before and two weeks after bleomycin administration. After 21 days, animals were sacrificed, and blood and lungs were collected for histopathological examinations, and measurement of plasma malondialdehyde (MDA) and lung hydroxyproline (HP).

FINDINGS: In this study, lung index, HP and plasma MDA in normal saline group were respectively 7.09±0.32 mg per kilogram of body weight, 1.80±0.23 mg per gram of lung tissue, and 1.32±0.27 micromoles per liter of plasma. In rats administered with bleomycin, these values were 9.75±0.90, 5.43±0.7 and 3.04±0.42, respectively. Treatment with Hypericum extract, especially at dosage of 200 mg/kg, resulted in a significant reduction in the aforementioned parameters compared to bleomycin group ($p<0.05$).

CONCLUSION: According to the results of this study, hydroalcoholic extract of Hypericum perforatum could exert protective effects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis.

KEY WORDS: *Bleomycin, Hypericum extract, Pulmonary fibrosis, Rat.*

Please cite this article as follows:

Ebrahimi Naghani E, Javadi I, RashidiNooshabadi M, Goudarzi M, Houshmand GR. Protective Effects of Hydroalcoholic Extract of Hypericum Perforatum Against Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Rats. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(1):44-51.

***Corresponding Author: I. Javadi (PhD)**
Address: Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Islamic Azad University, Shahreza Branch, Shahreza, I.R.Iran
Tel: +98 31 53512304
E-mail: Irjava@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

References

1.Ghazi-khansari M, Mohammadi Karkani A. Pulmonary fibrosis and treatment of common medical. Razi. 2004;16(7):23-32.[In Persian]

2. King TE, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. Lancet. 2011;378(9807):1949-61.

3.Rafii R, Juarez MM, Albertson TE, Chan AL. A review of current and novel therapies for idiopathic pulmonary fibrosis. J Thorac Dis. 2013;5(1):48-73.

4.Bahrami-Karkevandi M, Moshtaghian SJ, Madani SH, Mahzoni P, Adibi S, Kazemi S. The effects of hydroalcoholic extract of Artemsia aucheri on bleomycin induced pulmonary fibrosis in rats. J Shahrekord Univ Med Sci. 2011;12(4):40-3. [In Persian]

5.Moeller A, Ask K, Warburton D, Gauldie J, Kolb M. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis?. Int J Biochem Cell Biol. 2008;40(3):362-82.

6.Safaian L, Jafarian-Dehkordi A, Afshar-Moghadam N, Sarahroudi S. The effect of silymarin on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Qom Univ Med Sci. 2009;3(2):1-6. [In Persian]

7.Martin GE, Ask K, Gilpin SE, Kolb M, Gauldie J. The transforming growth factor-beta (TGF-β) family and pulmonary fibrosis. Drug Discov Today: Dis Mechan. 2006;3(1):99-103.

8.Verma R, Kushwah L, Gohel D, Patel M, Marvania T, Balakrishnan S. Evaluating the ameliorative potential of quercetin against the bleomycin-induced pulmonary fibrosis in wistar rats. Pulmonary Med. 2013; (2013), Article ID 921724, 10 pages.

9.Tang L, Jiang T, Han X, Chen D. Effect of tranilast on bleomycin induced pulmonary fibrosis in a rat model. Afr J Pharm Pharmacol. 2011;5(10):1315-20.

10.Ertekin A, Değer Y, Mert H, Mert N, Yur F, Dede S, et al. Investigation of the effects of α-tocopherol on the levels of Fe, Cu, Zn, Mn, and carbonic anhydrase in rats with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Biol Trace Elem Res. 2007;116(3):289-300.

11.Kakugawa T, Mukae H, Hishikawa Y, Ishii H, Sakamoto N, Ishimatsu Y, et al. Localization of HSP47 mRNA in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Virchows Arch. 2010;456(3):309-15.

12.11.Bahrami-Karkevandi M, Moshtaghian SJ, Madani SH, Mahzoni P, Adibi S, Kazemi S. The effects of hydroalcoholic extract of Artemisia aucheri on bleomycin induced pulmonary fibrosis in rats. J Shahrekord Univ Med Sci. 2011;12(4):33-40.[In Persian]

13.12.Samsam-Shariat H, Moatar F. Natural herbs (Materia Medica). Esfahan: Mashal Pub; 1986.

14.Zou Y, Lu Y, Wei D. Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of Hypericum perforatum L. in vitro. J Agric Food Chem. 2004;52(16):5032-9.

15.Hammer KD, Hillwig ML, Solco AK, Dixon PM, Delate K, Murphy PA, et al. Inhibition of prostaglandin E(2) production by anti-inflammatory hypericum perforatum extracts and constituents in RAW264.7 Mouse Macrophage Cells. J Agric Food Chem. 2007;55(18):7323-31.

16.Nathan PJ. Hypericum perforatum (St John's Wort): a non-selective reuptake inhibitor? A review of the recent advances in its pharmacology. J Psychopharmacol. 2001;15(1):47-54.

17.Hirano K, Kato Y, Uchida S, Sugimoto Y, Yamada J, Umegaki K, et al. Effects of oral administration of extracts of Hypericum perforatum (St John's wort) on brain serotonin transporter, serotonin uptake and behaviour in mice. J Pharm Pharmacol. 2004;56(12):1589-95.

18.Circus W, Wharf C. European medicines agency, Annual report: medicinal products (HMPC). 2009; United Kingdom: London E14 4HB.

19.Tacon LA, Freitas LA. Box-Behnken design to study the bergenin content and antioxidant activity of Endopleura uchi bark extracts obtained by dynamic maceration. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2013;23(1):65-71.

20.Javadi I, Rashidi Nooshabadi M, Goudarzi M, Roudbari R. Protective effects of celery (Apium graveloens) seed extract on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. J Babol Univ Med Sci. 2015;17(1):70-6.

Archive of SID

www.SID.ir

21.Zhu Y, Liu Y, Zhou W, Xiang R, Jiang L, Huang K, et al. A prostacyclin analogue, iloprost, protects from bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Respir Res. 2010;11(1):34.
22.Ferreres F, Grosso C, Gil-Izquierdo A, Valentão P, Andrade PB. Ellagic acid and derivatives from cochlospermum angolensis welw. extracts: HPLC–DAD–ESI/MSn profiling, quantification and in vitro anti-depressant, anti-cholinesterase and anti-oxidant activities. Phytochem Anal. 2013;24(6):534-40.
23.Bai Y, Li C, Zhao J, Zheng P, Li Y, Pan Y, et al. A high yield method of extracting alkaloid from aconitum coreanum by pulsed electric field. Chromatographia. 2013;76(11):635-42.
24.Hemmati AA, Arzi A, Karamapour Sistani N, Mikaili P. The hydroalcoholic extract of pomegranate seed has anti-inflammatory effects on formalin-induced inflammation of rat hind paw. Res J Biol Sci. 2010;5:561-4.
25.Hemmati AA, Jalali MT, Rashidi I, Kalantar Hormozi T. Impact of aqueous extract of black mulberry (morus nigra) on liver and kidney funcion of diabetic mice. Jundishapur J Nat Pharm Prod. 2010;5(1):18-25.
26. Mahmoudi MM, Javanmardi A, Morteza Semnani K, Saeedi M. Anti-inflammatory, analgesic activity, acute toxicity and hypericins content of iranian hypericum perforatum. J Babol Univ Med Sci. 2006;8(4):7-14.[In Persian]
27.Bayramoglu G, Bayramoglu A, Engur S, Senturk H, Ozturk N, Colak S. The hepatoprotective effects of Hypericum perforatum L. on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. Cytotechnology. 2014;66(3):443-8.
28.Demling RH. Oxandrolone, an anabolic steroid, enhances the healing of a cutaneous wound in the rat. Wound Repair Regen. 2000;8(2):97-102.
29.Wigglesworth J, Desai R, Aber V. Quantitative aspects of perinatal lung growth. Early Hum Dev. 1987;15(4):203-12.
30.Dunphy M, Bhide M, Smith D. Determination of hydroxyproline in tissue collagen hydrolysate by derivatization and isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography. J Chromatogr. 1987;420(2):394-7.
31.De Langhe E, Velde GV, Hostens J, Himmelreich U, Nemery B, Luyten FP, et al. Quantification of lung fibrosis and emphysema in mice using automated micro-computed tomography. PLoS One. 2012;7(8):e43123.
32.Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. Clin Chim Acta. 1978;90(1):37-43.
33.Nahrstedt A, Butterweck V. Biologically active and other chemical constituents of the herb of hypericum perforaturn L. Pharmacopsychiat. 1997;30(Supph 2):129-34.
34.Lee JH, Zhou HY, Cho SY, Kim YS, Lee YS, Jeong CS. Anti-inflammatory mechanisms of apigenin: inhibition of cyclooxygenase-2 expression, adhesion of monocytes to human umbilical vein endothelial cells, and expression of cellular adhesion molecules. Arch Pharm Res. 2007;30(10):1318-27.
35.Janicijevic J, Tosic S, Mitrovic T. Flavonoids in plants. 9th ed: Symposium on flora of southeastern serbia and neighbouring regions. Serbia:Niš; 2007.p.153-6.
36.Weng Z, Zhang B, Asadi S, Sismanopoulos N, Butcher A, Fu X, et al. Quercetin is more effective than cromolyn in blocking human mast cell cytokine release and inhibits contact dermatitis and photosensitivity in humans. PLoS One. 2012;7(3):e33805.
37.Sausville EA, Peisach J, Horwitz SB. Effect of chelating agents and metal ions on the degradation of DNA by bleomycin. Biochemistry. 1978;17(14):2740-6.
38.37.Jürgenliemk G, Nahrstedt A. Phenolic compounds from hypericum perforatum. Planta Med. 2002;68(1):88-91.
39.Russo E, Scicchitano F, Whalley BJ, Mazzitello C, Ciriaco M, Esposito S, et al. Hypericum perforatum: Pharmacokinetic, mechanism of action, tolerability, and clinical drug–drug interactions. Phytother Res. 2014; 28(5):643-55.
40.Librowski T, Czarnecki R, Czekaj T, Marona H. New xanthone derivatives as potent anti-inflammatory agents. Medicina (Kaunas). 2005;41(1):54-8.
41.Silva BA, Ferreres F, Malva JO, Dias AC. Phytochemical and antioxidant characterization of Hypericum perforatum alcoholic extracts. Food Chem. 2005;90(1-2):157-67.
42.Weber AJ, Soong G, Bryan R, Saba S, Prince A. Activation of NF-κB in airway epithelial cells is dependent on CFTR trafficking and Cl− channel function. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001;281(1):L71-8.

Archive of SID

www.SID.ir