

## اثر پودر گیاه Shoseiryuto در جلوگیری از هیپوکسی ناشی از تزریق اسید اولئیک در خوکچه هندی

سعید گل بیدی<sup>\*۱</sup>، سید علیرضا عبادی<sup>۲</sup>، اعظم مصداقی نیا<sup>۱</sup>

### خلاصه

**سابقه و هدف:** نارسایی حاد تنفسی (ARDS) یک بیماری التهابی شدید و کشنده ریه است. تزریق وریدی اسید اولئیک به حیوانات آزمایشگاهی به عنوان مدل حیوانی این بیماری پذیرفته شده است. Shoseiryuto یک ترکیب گیاهی است که خواص متعدد ضد التهابی برای آن به اثبات رسیده و در طب سنتی چین نیز از آن در موارد متعددی مانند درمان آسم استفاده می‌گردد. هدف این مطالعه بررسی اثر احتمالی این گیاه در جلوگیری از پیدایش هیپوکسی ناشی از تزریق اسید اولئیک می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه از نوع تجربی بوده. مخلوط پودر این گیاه در آب به دو صورت حاد (داخل صفاقی) و مزمن (خوراکی) در چهار گروه هشت تایی (دو گروه مورد، دو گروه کنترل) خوکچه هندی نر به کار گرفته شد. سپس حیوانات با استفاده از پنتوباریتال بیهوش و پس از کاترترگذاری در شریان‌ها و ورید آگزیلاری، اسید اولئیک به صورت وریدی تزریق و اثر این گیاه در پیشگیری از هیپوکسی ناشی از تزریق اسید اولئیک بررسی شد. نتایج با استفاده از آزمون آماری t-student مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

**نتایج:** تزریق اسید اولئیک به گروه کنترل باعث افت شدید اکسیژن خون شریان در زمان‌های ۶ و ۱۰ دقیقه می‌گردد ( $p < 0/05$ ). به کارگیری حاد و مزمن مخلوط آبی پودر گیاه Shoseiryuto از این کاهش اکسیژن جلوگیری می‌نماید ( $p < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** پودر گیاه Shoseiryuto اثر بارزی در جلوگیری از هیپوکسی ناشی از تزریق اسید اولئیک نشان داد. با توجه به خواص ذکر شده برای این گیاه مکانیسم‌های احتمالی متعددی را می‌توان پیشنهاد نمود.

**واژگان کلیدی:** نارسایی حاد تنفسی، اولئیک اسید، هیپوکسی، گیاه درمانی، Shoseiryuto

۱- استادیار گروه فیزیولوژی - فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کاشان - مرکز تحقیقات تروما.

۲- استادیار گروه داخلی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کاشان.

\* نویسنده مسوول: سعید گل بیدی

آدرس: کاشان، کیلومتر ۵ بلوار قطب راوندی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان.

پست الکترونیک: golbidi\_s@kaums.ac.ir

تلفن: ۰۳۶۱ ۵۵۵۴۸۶۲

درنویس: ۰۳۶۱ ۵۵۵۶۱۱۲

تاریخ دریافت: ۸۵/۸/۱۷

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۵/۱۱/۳۰

### مقدمه

داخل وریدی اسید اولئیک به حیوان آزمایشگاهی ایجاد هیپوکسی و علائم بافت‌شناسی مشابه با ARDS می‌نماید به طوری که به عنوان مدل حیوانی این بیماری پذیرفته شده [۳]. تا کنون مطالعات متعددی در مورد نقش واسطه‌های شیمیایی در هیپوکسی ناشی از اسید اولئیک انجام شده. از جمله می‌توان به نقش هیستامین [۴]، فاکتور فعال‌کننده پلاکتی (PAF) [۵، ۶]، فسفولیپاز A<sub>2</sub> [۷]، الاستاز و سوپراکسیداز [۸، ۹] اشاره نمود. Shoseiryuto یک ترکیب گیاهی است که در طب سنتی چین از آن در موارد متعددی از جمله درمان آسم استفاده می‌گردد [۱۰، ۱۱]. مواد موثر آن شامل: Glycyrrhizae Radix, Zingiberis Siccatum،

نارسایی حاد تنفسی acute respiratory distress syndrome (ARDS) یک بیماری التهابی شدید و کشنده ریه است که به دنبال سپسیس، آمبولی چربی، تروماهای شدید و غیره اتفاق می‌افتد. علی‌رغم پیشرفت علوم پزشکی مرگ و میر این بیماری بیش از ۵۰٪ است. از لحاظ پاتولوژی تجمع نوتروفیل‌ها، افزایش نفوذپذیری در عروق کوچک ریه، ادم حبابچه‌ای، تشکیل غشای هیالین و تخریب بافت ریه مشاهده می‌گردد. همه این وقایع منجر به پیدایش هیپوکسی شدید می‌گردد که به نوبه خود با عوارض مغزی، کلیوی، کبدی و غیره همراه است [۱، ۲]. تزریق

(Japan Sigma, St Louis, ) سپس با استفاده از پروکابین (MO) جهت بی‌حسی موضعی ناحیه آگزیلاری برش و شریان و ورید آگزیلاری کاته‌تر گذاری گردید. کاتتر شریانی جهت خون‌گیری و کاتتر وریدی جهت تزریق اسید اولئیک (۱۵μl/kg) استفاده شدند. خون‌گیری در زمان‌های صفر (قبل از تزریق اسید اولئیک)، ۶، ۱۰، ۱۵، ۳۵، ۵۵ و ۷۵ دقیقه بعد از تزریق اسید اولئیک انجام و پارامترهای گازی (PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, PH) توسط دستگاه (IL 1304, Instrumentation Laboratories, ) در blood gas (Lexington, MA, U.S.A.) اندازه‌گیری شدند. در مورد مقادیر مرتبط (دوتایی) از Paired Student's t-test و در مورد مقادیر غیرمرتبط از Unpaired Student's t-test و یا Mann-Whitney U-test (بعد از انجام f-test برای امتحان یکسان بودن واریانس) استفاده گردید.

### نتایج

تزریق وریدی ۱۵μl/kg اسید اولئیک به گروه کنترل باعث افت شدید PaO<sub>2</sub> خون شریانی (حدود ۵۰٪) در زمان‌های ۶ و ۱۰ دقیقه گردید، سپس میزان اکسیژن خون شریانی به آرامی افزایش می‌یابد. در گروه آزمایش اول (به کارگیری حاد پودر داروی گیاهی) تفاوت معنی‌دار در میزان PaO<sub>2</sub> خون شریانی در زمان‌های صفر، ۶، ۱۰، ۱۵، ۳۵ و ۵۵ دقیقه مشاهده گردید، ولی این تفاوت برای PaCO<sub>2</sub> و PH معنی‌دار نبود (جدول شماره ۱). همچنین در گروه آزمایشی دوم (به کارگیری مزمن پودر گیاهی) PaO<sub>2</sub> خون شریانی تفاوت معنی‌داری را در زمان‌های ۶، ۱۰، ۱۵، ۳۵، ۵۵ و ۷۵ نشان داد؛ ولی این تفاوت برای PaCO<sub>2</sub> و PH معنی‌دار نبود (جدول شماره ۲).

Assasari, Cinnamomi Cortex, Schisandrae Fructus Radix, Ephedrae Herba و Pinelliae Tuber می‌باشد [۱۲]. مقالاتی در مورد اثر این گیاه در جلوگیری از آزاد شدن هیستامین از ماست سل‌ها [۱۰، ۱۱]، کاهش تولید PAF در نوتروفیل‌ها، جلوگیری از دگرانوله شدن انوزینوفیل‌ها [۱۱] و ممانعت از تولید پروستاگلاندین‌ها [۱۳] وجود دارد. با توجه به خواص ذکر شده بر آن شدیم تا اثر این گیاه را بر هیپوکسی ناشی از تزریق اسید اولئیک بررسی نماییم.

### مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در دانشگاه کوماموتو ژاپن طراحی و با تایید کمیته مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفته است. اسید اولئیک از کمپانی Biomedicals Ins. (Aurora, OH, USA). پودر گیاه Shoseiryuto از شرکت Tsumura و خوکیچه هندی نر از نژاد Hartley با وزن ۵۰۰ تا ۸۰۰ گرم از Ark Resource Co, Ltd, Kumamoto, Japan خریداری شدند. این آزمایش به دو مرحله استفاده حاد و مزمن از داروی گیاهی تقسیم گردید. در مرحله حاد ۳ گرم پودر گیاه در ۱۰ سی‌سی نرمال سالین حل و ۳ ساعت قبل از آزمایش به میزان ۱۰cc/kg داخل پریتون تزریق شد. در مرحله مزمن ۱۰cc/kg از محلول فوق دو بار در روز و به مدت ۲ هفته با استفاده از feeding tube در داخل معده حیوانات قرار داده شد و حیوانات دوازده ساعت بعد از آخرین دوز مورد آزمایش قرار گرفتند. در هر مرحله تعداد نمونه در گروه شاهد و مورد هشت عدد بوده (n=8) و در گروه کنترل از محلول نرمال سالین استفاده گردید. قبل از خون‌گیری حیوانات با استفاده از پنتوباریتال (۲۵mg/kg) بی‌هوش (Nembutal, Dainabott Co, Osaka, )

جدول ۱- پارامترهای گازه‌های خونی در گروه کنترل و گروهی که دارو به صورت داخل صفاقی سه ساعت قبل از تزریق اسید اولئیک به کار گرفته شده (3g/kg, n=8) مقادیر معرف میانگین و انحراف می باشد

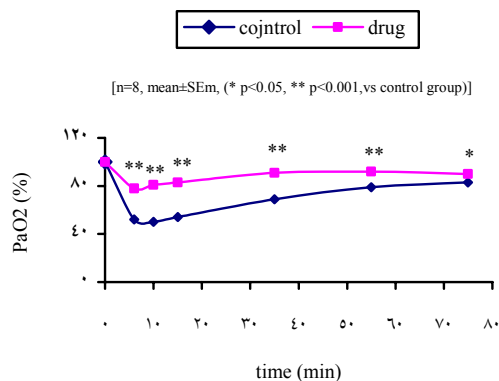
	Time (min)						
	0	6	10	15	35	55	75
Control							
PaO <sub>2</sub>	86.5±1.7	45.0±3.2 *	43.5±2.9 *	46.8±3.4*	59.8±4.5 *	68.7±4.1*	74.8±3.6†
PaCO <sub>2</sub>	39.8±0.9	40.8±0.9	40.0±1.3	40.5±1.7	41.7±1.6	39.7±1.3	39.3±1.2
PH	7.40±0.01	7.39±0.01	7.39±0.01	7.40±0.01	7.40±0.01	7.41±0.02	7.42±0.01
Drug							
PaO <sub>2</sub>	101.2±3.5‡	79.2±4.0 †, #	82.5±5.6 †, #	83.8±5.3†, #	92.8±6.3 #	88.5±5.0 ‡	91.7±6.0
PaCO <sub>2</sub>	39.6±1.1	39.3±1.2	39.1±1.0	38.9±1.6	38.9±1.4	39.6±1.5	38.9±1.5
PH	7.40±0.01	7.39±0.02	7.40±0.01	7.39±0.02	7.38±0.02	7.38±0.02	7.40±0.02

در مقایسه با زمان صفر \* p<0.001 † p<0.05  
در مقایسه با گروه کنترل در آن زمان ‡ p<0.001, # p<0.05

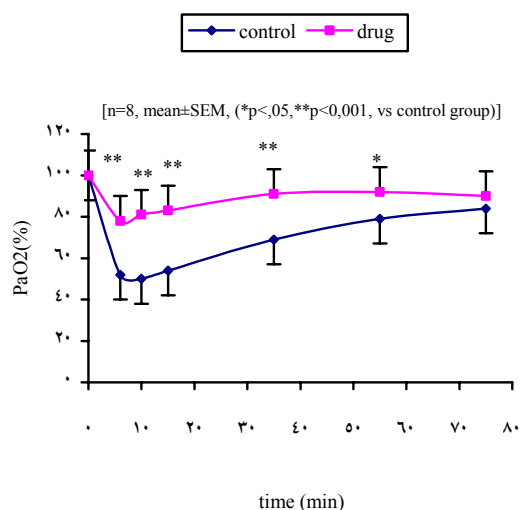
جدول ۲- پارامترهای گازهای خونی در گروه کنترل و گروهی که دارو به صورت خوراکی دو بار در روز به مدت دو هفته به کار گرفته شده (3g/kg, n=8) مقادیر معرف میانگین و انحراف می باشد

	Time (min)						
	0	6	10	15	35	55	75
<b>Control</b>							
PaO <sub>2</sub>	91,2±3,2	47,5±0,7 *	44,7±2,7*	48,8±2,1*	60,0±4,3 *	71,7±2,9*	80,5±2,0 †
PaCO <sub>2</sub>	38,9±1,0	40,0±1,1	39,8±1,1	40,4±1,4	41,2±1,9	40,2±1,4	40,3±±,1
PH	7,41±0,02	7,40±0,02	7,38±0,01	7,38±0,01	7,40±0,02	7,41±0,02	7,42±0,01
<b>Drug</b>							
PaO <sub>2</sub>	91,8±3,8	88,2±4,2 #	85,3±3,8 #	84,3±4,0 #	88,8±4,6#	90,5±,9 #	90,2±2,7‡
PaCO <sub>2</sub>	41,1±1,1	40,8±0,9	41,3±1,0	40,8±0,4	40,9±1,0	40,9±1,2	40,3±0,5
PH	7,40±0,01	7,39±0,01	7,39±0,01	7,39±0,01	7,40±0,01	7,41±0,01	7,40±0,01

\* p<0.001, † p<0.05, در مقایسه با زمان صفر  
#p<0.001, ‡ p<0.05, در مقایسه با گروه کنترل در آن زمان



به منظور تسهیل مقایسه، میزان اکسیژن خون شریانی در زمان صفر ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد و میزان افت اکسیژن در هر زمان بر حسب درصد مطابق فرمول درصد اکسیژن خون شریانی در هر زمان = (PaO<sub>2</sub> خون شریانی در آن زمان × صد) تقسیم بر PaO<sub>2</sub> خون شریانی در زمان صفر محاسبه گردید (شکل شماره ۱ و ۲)



نمودار ۲- اثر داروی گیاهی در جلوگیری از هیپوکسی ناشی از تزریق اسید اولئیک (3g/kg) خوراکی، دو بار در روز به مدت دو هفته)

### بحث

نتایج این تحقیق نشان دهنده اثر پیشگیری کننده این گیاه در هیپوکسی ناشی از تزریق اسید اولئیک بود. در توجه این مساله مکانیسم های متفاوتی را می توان پیشنهاد نمود، هر چند که برای اثبات هر کدام از فرضیات زیر احتیاج به انجام آزمایشات متعدد دیگری می باشد. تا کنون نقش پلی مرفونوکلترها (PMNs) در ایجاد آسیب ریوی به دنبال تزریق اسید اولئیک نشان داده شده. گلبول های سفید به سلول های اندوتلیال عروق ریه چسبیده و با ایجاد آنیون های سوپراکسید و آزاد کردن آنزیم های مختلف از جمله کاتالاز و الاستاز باعث ایجاد آسیب ریوی می گردند [۸، ۹].

نمودار ۱- اثر داروی گیاهی در جلوگیری از هیپوکسی ناشی از تزریق اسید اولئیک (3g/kg) داخل صفاقی، سه ساعت قبل از تزریق اسید اولئیک)

تزیق لیپولی ساکارید باکتری‌های گرام منفی (اندوتوکسین) پرداخته‌اند [۵، ۶، ۱۹]. از طرف دیگر با توجه به اینکه میزان فعالیت فسفولیپاز A2 در مایع حبابچه‌ای به دنبال تزیق اسید اولئیک افزایش یافته [۷، ۲۰]، می‌توان به نقش کلیدی PAF در آسیب ریوی به دنبال تزیق اسید اولئیک اشاره نمود [۲۰]. Takeuchi و همکاران در مطالعه‌ای به اثر مهارگی گیاه Shoseiryuto بر تولید PAF در نوتروفیل‌ها اشاره کرده‌اند [۲۱]. PAF باعث گشادی و افزایش نفوذپذیری عروق ریه، و در نهایت ایجاد ادم و هیپوکسی می‌گردد. در پایان مکانیسم احتمالی دیگری را که می‌توان برای اثر این گیاه در جلوگیری از هیپوکسی به دنبال تزیق اسید اولئیک بیان نمود بر اساس مطالعه‌ای است که توسط Furue و همکاران انجام شده [۷]. آنها نشان دادند که به کارگیری ماده S-5920/LY315920Na که یک مهارکننده گروه II، فسفولیپاز A2 می‌باشد نه تنها از هیپوکسی به دنبال تزیق اسید اولئیک جلوگیری می‌نماید بلکه از پیدایش ادم ریه همچنین تخریب سرفکتانت نیز جلوگیری کرده از طرف دیگر تولید ترومبوکسان A2 و لکوترین B4 نیز کاهش می‌یابد. از آنجا که ترکیبات glycyrrhizin موجود در گیاه Shoseiryuto خاصیت مهار فسفولیپاز A2 را دارند [۱۳، ۲۲] می‌تواند کمک به توضیح و توجیه اثر محافظتی این گیاه در جلوگیری از هیپوکسی بنماید. با توجه به اثر بارز این گیاه در جلوگیری از هیپوکسی ناشی از تزیق اسید اولئیک به نظر می‌رسد این دارو را می‌توان به عنوان کاندید درمانی، معرفی و آزمایشات تکمیلی دیگری را طراحی نمود.

آنیون‌های سوپراکسید از طریق واکنش‌های فنتون (Fenton reactions) تولید رادیکال‌های هیدروکسیل اکسیدکننده می‌نماید که به نوبه خود با پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلول‌های اندوتلیال باعث آسیب این سلول‌ها، افزایش نفوذپذیری و نهایتاً پیدایش ادم ریوی می‌شوند [۱۴]. نشان داده شده که میزان cAMP داخل سلولی نقش تنظیم‌کننده در اعمال PMNs دارد، به طوری که افزایش میزان cAMP با کاهش میزان آسیب ریوی همراه است [۱۵]. با توجه به مهار آنزیم فسفودیاستراز توسط فلاونوئیدهای موجود در این گیاه (Glycyrrhizae Radix dicoricidin) [۱۶] احتمال افزایش cAMP در نوتروفیل‌ها و کاهش تولید آنیون‌های سوپراکسید وجود دارد، که به نوبه خود می‌تواند اثر حفاظتی این گیاه در جلوگیری از هیپوکسی را توجیه نماید. در بعضی مقالات اشاره به نقش پروستاگلین در هیپوکسی ناشی از اسید اولئیک شده به طوری که استفاده از مهارکننده‌های سیکلواکسیژناز (ایندومتاسین، مکلوفنات) میزان 6-ketoprostaglandin  $F_{1\alpha}$  که یک متابولیت پایدار پروستاگلین (PGI<sub>2</sub>) می‌باشد را کاهش و اکسیژناسیون خون بعد از تزیق اسید اولئیک را بهبود بخشیده است [۱۷، ۱۸]. با توجه به اینکه ترکیبات موجود در این گیاه مانند Zingiberis Siccatur Rhizoma، Gingeral and Diarylheptanoids اثر مهارگی در تولید پروستاگلاندین‌ها دارند [۱۳]، می‌تواند توضیحی احتمالی در مورد اثر مشاهده شده در این آزمایش باشد. سومین مکانیسم احتمالی را می‌توان در رابطه با نقش PAF مطرح نمود. تا کنون مطالعات متعددی به بررسی نقش PAF در ARDS در انسان، همچنین در آسیب ریوی به دنبال

## References:

- [1] Golbidi S. Moriuchi H. Yang C. Irikura M. Irie T. Hamasaki N. Preventive effect of phosphoenolpyruvate on hypoxemia induced by oleic acid in guinea pigs. *Biol Pharm Bull* 2003; 26: 336-340.
- [2] Kollef MH. Schuster DP. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1995; 332: 27-37.
- [3] Schuster DP. ARDS: clinical lessons from the oleic acid model of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 254-260
- [4] Selig WM. Patterson CE. Henry DP. Rhoades RA. Role of histamine in acute oleic acid induced lung injury. *J Appl Physiol* 1986; 61: 233-239.
- [5] Matsumoto K. Taki F. Kondo Y. Taniguchi H. Takagi K. Matsuzaki M. et al. Platelet activating factor and tumor necrosis factor-alpha in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ARDS. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 1993; 31: 330-335.
- [6] Miotla JM. Jeffery PK. Hellewell PG. Platelet-activating factor plays a pivotal role in the induction of experimental lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18: 197-204.
- [7] Furue S. Kuwatara K. Mikawa K. Nishina K. Shiga M. Maekawa N. et al. Crucial role of group IIA phospholipase A2 in oleic acid-induced acute lung injury in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1292-1302
- [8] Moriuchi H. Yuizono T. Pentoxifylline prevents a decrease in arterial oxygen tension in oleic acid-induced lung injury. *Critical Care Med* 1995; 23: 357-364
- [9] Moriuchi H. Zaha M. Fukumoto T. Yuizono T. Activation of polymorphonuclear leukocytes in oleic acid induced lung injury. *Intensive Care Med* 1998; 24: 709-715.
- [10] Egashira Y. Kampo treatment of intractable asthma. *Pharma Medica* 1987; 5: 83-96

- [11] Nyunt AK. Takeuchi Y. Yokomuro K. Miyanaga Y. Comparative studies on the antiallergic effects of kampo medicines used for the therapy of respiratory disease. *Arerugi* 1995; 44: 503-512.
- [12] Umesato Y. Irikura T. Nakamura Y. Asthmatic children and Chinese medicine. Scientific study of shoseiryuto and saibokuto. *Arerugi* 1984; 33: 1047-1052.
- [13] Kiuchi F. Iwakami S. Shibuya M. Hanaoka F. Sankawa U. Inhibition of prostaglandin and leukotriene biosynthesis by Gingerols and Dearylheptanoids. *Chem Pharm Bull* 1992; 40: 387-391.
- [14] Yang C. Moriuchi H. Takase J. Ishitsuka Y. Irikura M. Irie T. Oxidative stress in early stage of acute lung injury induced with oleic acid in guinea pigs. *Biol Pharm Bull* 2003; 26: 424-428.
- [15] Ladd PM. Goldberg BJ. Smiley PA. Olson CV. Receptor-specific threshold effects of cyclic AMP are involved in the regulation of enzyme release and superoxide production from human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1985; 846: 286-296
- [16] Kusano A. Nikaido T. Kuge T. Ohmoto T. Delle Monache G. Botta B. et al. Inhibition of adenosine 3-5-cyclic monophosphate phosphodiesterase by flavonoids from licorice roots and 4-aryl coumarins. *Chem Pharm Bull* 1991; 39: 930-933.
- [17] Leeman M. Delcroix M. Vachiere JL. Melot C. Naeije R. Blunted hypoxic vasoconstriction in oleic acid lung injury: effect of cyclooxygenase inhibitors. *J Appl Physiol* 1992; 72: 251-258.
- [18] Sprague RS. Stephenson AH. Lonigro AJ. Prostaglandin I<sub>2</sub> supports blood flow to hypoxic alveoli in anesthetized dogs. *J Appl Physiol* 1984; 56: 1246-1251.
- [19] Nakos G. Kitsioulis ET. Tsangaris I. Lekka ME. Bronchoalveolar lavage fluid characteristics of early intermediate and late phases of ARDS: alterations in leukocytes, proteins, PAF and surfactant components. *Intensive Care Med* 1998; 24: 296-303.
- [20] Anderson BO. Moore EE. Banerjee A. Phospholipase A2 regulates critical inflammatory mediators of multiple organ failure. *J Surg Res* 1994; 56: 199-205.
- [21] Takeuchi Y. Nishimura Y. Yoshikawa T. Kuriyama J. Kimura Y. Saiga T. A comparison between Chinese blended medicine "shoseiryuto", tranilast and ketotifen on the anti-allergic action in the guinea pigs. *Arerugi* 1985; 34: 387-393.
- [22] Okimasu E. Moromizato Y. Watanabe S. Sasaki J. Shiraishi N. Morimoto YM. et al. Inhibition of phospholipase A2 and platelet aggregation by glycyrrhizin, an anti-inflammation drug. *Acta Med Okayama* 1983; 37: 385-391.