



اثرات محافظتی تجویز همزمان عصاره سرخارگل و هیدروکورتیزون

در برابر ضایعات ریوی ناشی از سپسیس در رت

ریحانه زنده دل^۱، سعید حصارکی^{۲*}

۱- دانشجوی دکتری حرفه ای، گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استادیار آسیب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

ایمیل نویسنده مسئول: s.hesaraki@srbiau.ac.ir

دوره شانزدهم، شماره یک، بهار و تابستان ۱۴۰۴

دریافت مقاله: ۱۸ اردیبهشت ۱۴۰۴، پذیرش نهایی: ۲۳ شهریور ۱۴۰۴

چکیده:

سپسیس یک بحران سایتوکایینی شدید است که معمولاً در ادامه عفونت‌های منجر به سپتی‌سمی با درگیری سیستمی و ادم ریه موجب مرگ جاندار می‌شود. کورتیکواستروئیدها در بحران سپسیس تجویز می‌شوند تا از واکنش‌های تخریبی ناشی از پاسخ اغراقی سیستم ایمنی بپوژه در ادم ریه بکاهند. هدف از این مطالعه بررسی میزان اثرات محافظت کنندگی عصاره گیاه سرخارگل همراه هیدروکورتیزون در کاهش ادم و التهاب ریه‌های رت‌هایی است که دچار بحران سپسیس شده بودند. در این پژوهش رت‌ها به سه گروه تقسیم شدند که شامل گروه سپسیس (بدون پیش‌درمان) و گروه‌های ۴۰۰ میکروگرم و ۸۰۰ میکروگرم که هر روز به مدت دو هفته بترتیب دریافت کننده ۴۰۰ میکروگرم برکیلوگرم و ۸۰۰ میکروگرم برکیلوگرم عصاره سرخارگل همراه یک تزریق ۸ میلی‌گرم برکیلوگرمی هیدروکورتیزون در روز ۱۴ (پس از ایجاد سپسیس) بودند. سپسیس به روش CLP در روز ۱۴ ایجاد شد. در این روش قانده سکوم بروش جراحی لیگاتور شده و با سوزن دو سوراخ ایجاد گردید. رت‌ها ۲۴ ساعت بعد به وسیله پنتوباریتال (۵۰ mg/kg-IP) کشته شدند. ابتدا نسبت وزن مرطوب به خشک ریه محاسبه شد. ارزیابی تعداد نوتروفیل‌های مایع برونشی-آلئولاری (bronchoalveolar lavage) انجام شد. نیمی از بافت ریه برای هیستوپاتولوژی و نیم دیگر به منظور بررسی پارامترهای مالون دی‌آلدهاید (MDA) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC) اختصاص یافت. مشخص شد که نسبت وزن مرطوب به خشک ریه در گروه سپسیس از بقیه گروه‌ها بیشتر بود ($P < 0.01$). با بررسی میزان مالون دی‌آلدهاید MDA به صورت معنی‌داری در گروه سپسیس نسبت به دو گروه دیگر بالاتر بود ($P < 0.01$). اما ذخیره آنتی‌اکسیدانی در گروه ۸۰۰ میکروگرم به شکل معنی‌داری نسبت به گروه سپسیس و گروه ۴۰۰ میکروگرم بالاتر بود ($P < 0.01$). درجات ضایعات هیستوپاتولوژی (اکسودای داخل آلئولاری و مجاری هوایی) نیز بترتیب در گروه‌های سپسیس، ۴۰۰ میکروگرم برکیلوگرم و ۸۰۰ میکروگرم برکیلوگرم کاهش معنی‌دار نشان داد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره سرخارگل در کاهش التهاب ناشی از بیماری سپسیس نقش دارد.

کلمات کلیدی: سرخارگل، هیدروکورتیزون، سپسیس، ضایعات ریوی.

مقدمه:

التهاب حاد ریوی از عوارضی است که با مرگ بیماران مبتلا به سپسیس ارتباط دارد. به همین دلیل کنترل نسبی عوارض آن بویژه آسیب ریوی حاصل از سپسیس اهمیت حیاتی دارد (۱). سپسیس عارضه‌ای است که مشکلات بالینی و اقتصادی فراوانی را در پی دارد و تحقیقات وسیعی در بخش‌های مختلف آن صورت گرفته است. با وجود پیشرفت‌های درمانی در زمینه سپسیس، این بیماری و عواقب ناشی از آن مهمترین عامل مرگ و میر در بیماران مراقبت‌های ویژه می‌باشد. یکی از عوارض و مشکلات ناشی از سپسیس به هم خوردن تعادل سیستم استرس اکسیداتیو بدن است (۲).

سرخارگل گیاهی از تیره آفتاب‌گردان، گیاهی علفی و چند ساله است. این گیاه از گیاهان متداول دارویی محسوب می‌شود. و حتی با توجه به اینکه این گیاه، منشا آمریکایی دارد و بومی کشور ایران نیست، اما چند سالی است که کشت و کار با آن معمول شده است (۳). مواد مؤثره در ریشه و پیکره رویشی سرخارگل خاصیت ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و ضد ویروسی دارند و در درمان سرماخوردگی و بیماری‌های تنفسی و مجاری ادراری مورد استفاده قرار می‌گیرد و به عنوان داروی بالقوه برای درمان ایدز مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴).

یکی از روش‌های ایجاد التهاب حاد سپتیک روش Sepsis Cecal Ligation and Puncture (CLP) است. در این روش جراح با بستن سکوم و سوراخ کردن آن منجر به آلوده کردن حفره شکمی با باکتری‌های موجود در روده شده که این کار در نهایت سبب التهاب صفاق، انقلاب سایتوکایینی و طیف وسیعی از پاسخ‌های سیستمیک می‌شود. این روش به عنوان استاندارد در مطالعات مرتبط با سپسیس در نظر گرفته می‌شود. سپسیس از طریق ورود میکروارگانیسم‌ها و باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی از لومن روده‌ای به جریان خون ایجاد می‌شود. افزایش بار میکروبی از طریق فعال سازی مسیرهای دخیل در استرس اکسیداتیو در سپسیس منجر به القاء استرس اکسیداتیو گردیده که در نهایت منجر به آسیب ارگان‌های بدن می‌گردد (۵). بنابراین با توجه به عوامل تاثیر گذار در سپسیس می‌توان راهکارهای درمانی را تعیین کرد که یکی از بهترین آن‌ها کاهش سطح بار میکروبی و کاهش عوامل اکسیداتیو و التهابی است.

درمان‌های رایج سپسیس شامل استفاده از آنتی بیوتیک‌ها برای کاهش بار میکروبی، همچنین تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی توسط داروهای مختلف می‌باشد. به علاوه داروهای ضد التهابی قوی و سریع با کاهش واکنش‌های ناشی از سپسیس

اثرات محافظتی تجویز همزمان عصاره سرخارگل و هیدروکورتیزون در برابر ضایعات ریوی ناشی از سپسیس در رت

زربند با شماره شماره ثبت فرآورده ۷۸۸۵۷۷۷۷۵۶۱۰۳۴۷۸ تهیه شد.

۲-۲- حیوانات و گروه‌های تحقیق

در این مطالعه ۱۵ سر رت نر بالغ نژاد ویستار با وزن متوسط ۲۵۰ گرم خریداری شد و خوراک حیوانات به صورت پلت با فرمول استاندارد از کارخانجات فرآورده‌های غذایی تهران تهیه شد. حیوانات بالغ دسترسی آزاد به غذا و آب و آشامیدنی داشتند. سپس حیوانات به سه گروه (۵ سری) تحقیق تجربی زیر تقسیم شدند.

۱- گروه CLP: ایجاد مدل سپسیس بوسیله عمل CLP در روز چهاردهم بدون دریافت هیچ دارویی در روزهای قبل.
۲- گروه ۴۰۰ میکروگرم میکروگرم: عصاره سرخارگل با دوز ۴۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی (۸، ۹) روزانه به مدت دو هفته و ایجاد مدل CLP در روز چهاردهم. سپس تک دوز ۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم هیدروکورتیزون (۱۰) بصورت داخل صفاقی تزریق شد.

۳- گروه ۸۰۰ میکروگرم: عصاره سرخارگل با دوز ۸۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی (۸، ۹) روزانه به مدت دو هفته و ایجاد مدل CLP در روز چهاردهم. سپس تک دوز ۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم هیدروکورتیزون (۱۰) بصورت داخل صفاقی تزریق شد.

می‌تواند باعث کاهش ضایعات یا کمک به درمان بیماری گردد (۶).

گیاهان دارویی و محصولات طبیعی منبع ارزشمندی از عوامل درمانی بوده و امروزه هنوز هم یک موضوع مهم برای شناسایی داروهای جدید هستند. در واقع امروزه داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی نقش بسیار مهمی را در درمان سپسیس ایفا می‌کنند. ولی با توجه به عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای ضدالتهابی، امروزه استفاده از ترکیبات طبیعی در درمان سپسیس و التهاب اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده‌اند (۷). با توجه به نرخ بالای مرگ و میر مرتبط با سپسیس و به منظور دستیابی به داروهای کم خطر در این مطالعه اثر عصاره سرخارگل به عنوان یک گیاه با پیشینه موثر بهداشتی در درمان بیماری ریوی ناشی از سپسیس مورد بررسی قرار گرفت و هدف از انجام این مطالعه ارزیابی اثر محافظتی سرخارگل بر آسیب ریه ناشی از سپسیس در روش CLP در رت بود.

۲- مواد و روش‌ها:

۲-۱- تهیه عصاره آبی سرخارگل

محصول استاندارد شده عصاره آبی بخش هوایی گیاه اکیناسه پورپوره (سرخارگل) بر اساس حداقل ۱/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فنول تام بر حسب کلروژنیک اسید از شرکت دارویی

مجله پژوهش‌های بالینی دامپزشکی، دوره شانزدهم، شماره یک، تابستان ۱۴۰۴

مشخص شد. برای کمی کردن داده‌ها از هر لام پنج میدان دید به صورت تصادفی شمرده شد.

۲-۵- سنجش مالون دی آلدهاید (MDA)

فعالیت MDA با ظهور رنگ زرد ناشی از واکنش نمک تترازولیوم با آنیون سوپراکسید ارزیابی شد. ارزیابی این دو نشانگر با روش فتومتریک در طول موج ۵۳۰-۵۴۰ نانومتر انجام شد. MDA همچنین با اسید تیوباریتوریک واکنش نشان داد و یک ترکیب اضافی تولید کرد که می‌توان آن را با روش فلورومتری ($Ex/Em=532/553nm$) اندازه‌گیری کرد.

۲-۶- سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC)

حدود ۱۰۰ میلی‌گرم بافت مرطوب ریه در ۰/۵ میلی‌لیتر یخ سرد ($10 \times$ Assay Buffer) همگن گردید و در $g \times 10000$ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی جمع‌آوری و به لوله‌های تازه منتقل شد. لوله‌ها روی یخ قرار داده شد. سپس روش کار مطابق دستورالعمل کیت کیازیسیت خریداری شده اجرا شد.

۲-۷- هیستوپاتولوژی

در تمام رت‌ها ریه سمت چپ مورد ارزیابی هیستوپاتولوژی قرار گرفتند. ریه‌ها بصورت نمونه 0.5×0.5 سانتی‌متری جهت ارزیابی هیستوپاتولوژی در فرمالین بافر ۱۰٪ قرار داده

در حیوانات سپسیس به روش جراحی CLP در روز ۱۴ ایجاد شد و رت‌ها ۲۴ ساعت بعد از CLP به وسیله اوردوز پنتوباریتال کشته شدند.

۲-۳- بررسی ظاهر و نسبت وزن مرطوب به خشک ریه

ابعاد ریه‌ها بر اساس سانتیمتر اندازه‌گیری شد. پس از بدست آمدن وزن مرطوب ریه‌ها درون آون قرار داده شدند تا طی مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۵ درجه سیلیسیوس خشک شوند. پس از خشک شدن، ریه‌ها دوباره وزن شده و نسبت به وزن مرطوب به وزن خشک محاسبه گردید.

۲-۴- شمارش نوتروفیل‌های مایع برونکوسی-آلوئولی

(bronchoalveolar lavage)

ریه‌ها برای اولین بار با حجم ۸ میلی‌لیتر سرم سالین شستشو داده شده و مایع لاواژ برونشی-آلوئولی حاصل در یک لوله جداگانه نگهداری شد. سپس، ریه‌ها سه بار دیگر با حجم ۸ میلی‌لیتر سرم سالین شستشو داده شدند. تمام نمونه‌ها در ۲۵۰ دور به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند، مایع رویی خارج شد رسوب سلولی حاصل از شستشوی اول با سلول‌های شستشوی بعدی ترکیب و در ۱ میلی‌لیتر بافر حل شد. بعد از آماده‌سازی، نمونه‌ها با رنگ گیمسا Giemsa رنگ‌آمیزی و سپس در زیر میکروسکوپ درصد تعداد نوتروفیل‌ها نسبت به درصد کل سلول‌ها

اثرات محافظتی تجویز همزمان عصاره سرخارگل و هیدروکورتیزون در برابر ضایعات ریوی ناشی از سپیس در رت

شدند. در ادامه جهت انجام پاساژ بافتی نمونه‌ها پس از گذراندن مراحل پاساژ بافتی شامل آب‌گیری توسط الکل با درصد‌های صعودی سپس شفاف سازی به وسیله محلول گزبلول و آغشتگی به پارافین در دمای ۵۸-۶۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه پاساژ بافت انجام و در نهایت نمونه‌ها برای انجام قالب‌گیری آماده سازی شدند. در نهایت برش‌های با ضخامت ۴-۶ میکرون به وسیله میکروتوم مدل LEICA-RM2245 ساخت کشور آلمان تهیه شده و رنگ آمیزی عمومی هماتوکسیلین - ائوزین بر بافت ریه انجام گرفت. داده‌های مشاهده شده در متوسط ۵ زمینه با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر بررسی و نتایج با آزمون آماری تفسیر گردید. هجوم لکوسیت، نکروز، اکسودای سروزی-فیبرینی و درصد درگیری پارانشیم ریه از ۰ تا ۳ امتیازدهی شدند (جدول ۳-۱).

جدول ۳-۱- امتیازدهی بافت‌شناسی ضایعات ریوی

موارد درجه‌بندی	اکسودای سروزی- فیبرینی	نکروز لبولی	*هجوم لکوسیت	درصد پارانشیم ریه
۰	کمتر از ۵٪	بدون نکروز	تا ۵ سلول	عدم وجود ناحیه آسیب دیده
۱	۵-۳۰٪	کمتر از ۱۰٪	۵ تا ۱۰ سلول	کمتر از ۱۰٪
۲	۳۰-۶۰٪	از ۱۰٪ تا ۳۰٪	۱۰-۲۰ سلول	از ۱۰٪ تا ۳۰٪
۳	بیش از ۶۰٪	بیش از ۳۰٪	بیش از ۲۰ سلول	بیش از ۳۰٪

* در بزرگنمایی ۴۰۰ برابر

امتیاز نهایی آسیب شناسی با لحاظ کردن همه موارد شامل هجوم لکوسیت + نکروز + اکسودای سروزی-فیبرینی + درصد درگیری ریه تجمیع شد (۱۱). حداکثر امتیاز حاصل ۱۲ و حداقل آن صفر بود. امتیاز بیشتر نشانه درجات جراحات بافتی بیشتر بود.

داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و تست توکی برای فراسنجه‌های سرمی، و آزمون‌های آماری کروسکال والیس برای هیستوپاتولوژی (ANOVA Way One)، Wallis-Kruskal) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

۳- نتایج:

۳-۱- میزان بقا در طول پژوهش

۲-۸- تجزیه و تحلیل آماری

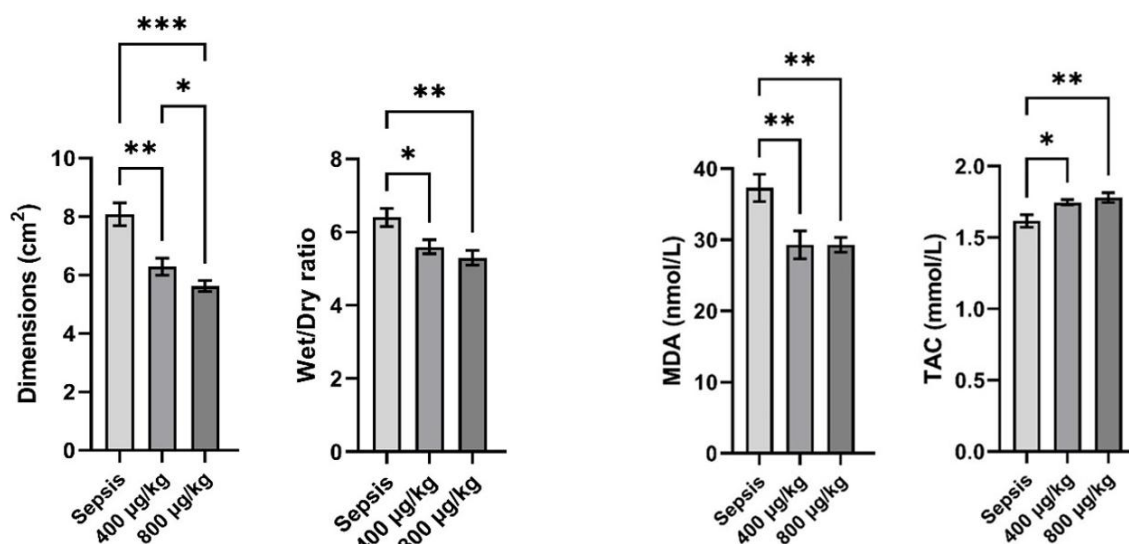
ریه‌های گروه ۴۰۰ میکروگرم میکروگرم نیز کمی بزرگتر از گروه ۸۰۰ میکروگرم میکروگرم گزارش شد ($P < 0.05$). در مورد نسبت وزن ریه‌ها مشاهده شد که ریه‌های هر دو تیمار با گروه سپسیس اختلاف معنی‌دار داشتند ($P < 0.05$). بین گروه‌های ۴۰۰ میکروگرم و ۸۰۰ میکروگرم تفاوت

معنی‌دار دیده نشد (شکل ۱).

در طول این پژوهش، همه‌ی رت‌های گروه سپسیس و یک موش از گروه ۴۰۰ میکروگرم میکروگرم و یک موش از گروه ۸۰۰ میکروگرم میکروگرم قبل از ۲۴ ساعت از بین رفتند و همان لحظه کالبدگشایی شدند.

۲-۳- بررسی ابعاد و نسبت وزن مرطوب به خشک ریه

ریه‌های گروه سپسیس بطور معنی‌داری بزرگتر از گروه‌های تیمار ۴۰۰ میکروگرم و ۸۰۰ میکروگرم بود ($P < 0.01$).



شکل ۱- مقایسه‌ی ابعاد، درصد نسبت وزن مرطوب به خشک، میزان MDA و TAC بافت ریه گروه‌های مختلف تحقیق اثرات سرخارگل-هیدروکورتیزون روی جراحات ناشی از سپسیس در رت. ابعاد و نسبت وزن در گروه ۸۰۰ میکروگرم بهترین حالت را نسبت به گروه‌های سپسیس و گروه ۴۰۰ میکروگرم نشان داد. کاهش MDA و افزایش TAC در گروه‌های تیمار نشان داده شده است. (*): $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

– سنجش مالون دی آلدهید MDA

تیمار ۴۰۰ ($P < 0/01$) و ۸۰۰ ($P < 0/05$) بود. بین دو گروه

تیمار ۴۰۰ میکروگرم برکیلوگرم و ۸۰۰ میکروگرم برکیلوگرم تفاوت معنی دار نبود (شکل ۲).

۳-۶- بررسی تغییرات میکروسکوپی

همانطور که در شکل ۲ و ۳ نشان داده شده است، موش های

گروه ۸۰۰ میکروگرم دارای بافت با اکسودای فیبرینی کمتری

بودند در حالی که ریه های رت های سپسیس دارای تغییرات

التهابی معنی داری بودند که با اکسودای سروز-فیبرینی زیاد

ریه و افزایش لکوسیت ها مشخص می شد. کاهش ضایعات

پاتولوژیک در گروه درمان با عصاره سرخارگل با دوز ۸۰۰

نمود بارزتری نسبت به گروه ۴۰۰ میکروگرم میکروگرم،

($P < 0/05$) نشان داد، زیرا سرخارگل- هیدروکورتیزون

بسیاری از علائم جراحی حاد ریوی را کاهش داد

($P < 0/01$).

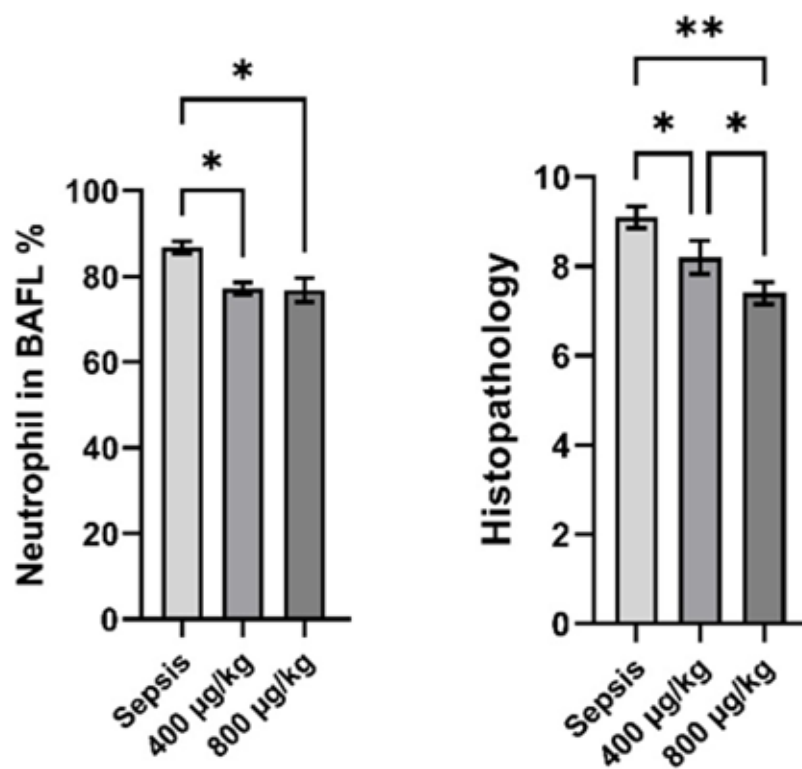
با توجه به شکل ۱ مشخص شد که سطح مالون دی آلدهید در تحقیق اثرات حمایتی سرخارگل- هیدروکورتیزون بر ریه های دچار سپسیس در ۲۴ ساعت پس از CLP در گروه سپسیس نسبت به دو گروه دریافت کننده عصاره سرخارگل با دوز ۴۰۰ و دوز ۸۰۰ بیشتر و این تفاوت معنی دار بوده است ($P < 0/01$).

۳-۴- ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی تام (TAC)

در شکل ۱، ظرفیت آنتی اکسیدانی تام در بافت ریه گروه های سپسیس و تیمار شده به وسیله سرخارگل- هیدروکورتیزون مورد ارزیابی قرار گرفت. ظرفیت تام آنتی اکسیدانی در گروه سپسیس در مقایسه با گروه تیمار ۸۰۰ ($P < 0/05$) تفاوت معنی دار نشان داد.

۳-۵- نوتروفیل های مایع برونکوسی-آلوئولی

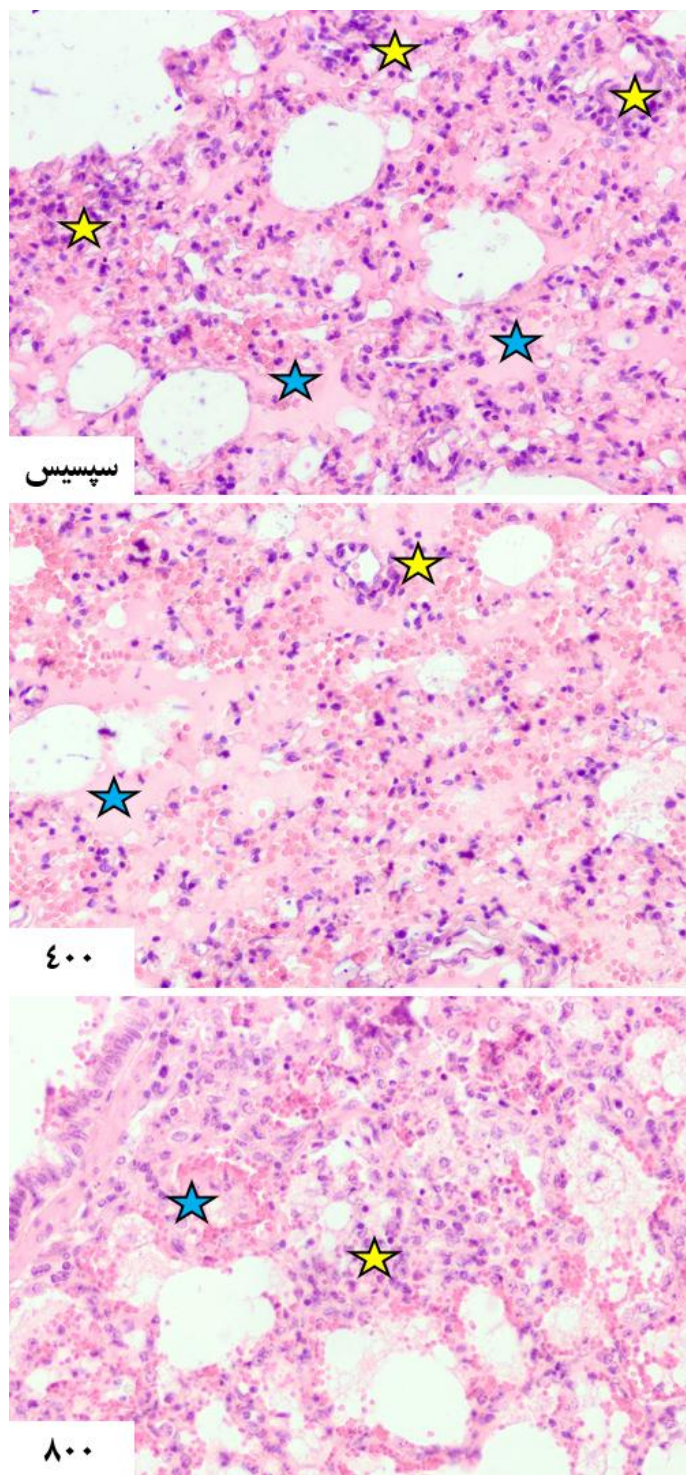
در ساعات پس از جراحی CLP، افزایش درصد نوتروفیل ها در رت های گروه سپسیس، بیشتر از موش های گروه های



شکل ۲- مقایسه درصد نوتروفیل‌های مایع برونکوسی-آلوئولی و درجات ضایعات هیستوپاتولوژی ریه در تحقیق اثرات حمایتی سرخارگل-

هیدروکورتیزون بر ریه رت‌های دچار سپسیس در ۲۴ ساعت پس از چالش CLP.

اثرات محافظتی تجویز همزمان عصاره سرخارگل و هیدروکورتیزون در برابر ضایعات ریوی ناشی از سپسیس در رت



شکل ۳- ضایعات میکروسکوپی در گروه ۸۰۰ میکروگرم بهترین حالت را نسبت به گروه‌های سپسیس و ۴۰۰ میکروگرم نشان داد. ستاره آبی : اکسودای سروزی-فیبرینی و ستاره زرد : افزایش نوتروفیل (رنگ آمیزی H&E؛ بزرگنمایی: ۱۰۰ برابر). (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$).

بحث:

سپسیس یک سندرم پاسخ التهابی سیستمیک و یکی از مهم‌ترین علل مرگ بیماران بدحال است که توسط باکتری‌ها، ویروس‌ها و سایر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در بدن ایجاد می‌شود. طبق دستورالعمل‌های اجماع بین‌المللی (Third International Consensus) در مورد سپسیس (ویرایش سوم، ۲۰۱۶)، سپسیس یک اختلال عملکرد چند عضوی است که توسط اختلالات پاسخ التهابی میزبان تحت سلطه عفونت‌ها ایجاد می‌شود (۱۲). بیماران مبتلا به نارسایی حاد ریه (ALI) ناشی از سپسیس به دلیل التهاب ریه و آسیب بافتی، عملکرد تبادل گاز ضعیفی دارند. فرآیندهای پاتولوژی شامل آسیب اندوتلیال عروق ریوی، کاهش کشش سطحی آلوئول‌ها، آزادسازی فاکتور التهابی و فیبروز بینابینی ریوی است (۱۳). در حال حاضر هیچ روش درمانی موثری برای سپسیس در دسترس نیست.

در ایجاد سپسیس بوسیله عمل جراحی مدل CLP (بستن دریچه سکوم و سوراخ کردن آن) میکروارگانیسم‌های روده‌ای به داخل جریان خون نفوذ پیدا می‌کنند. سپسیس با التهاب حاد ریوی همراه است و این یکی از عوارض این بیماری می‌باشد و این التهاب حاد سبب مرگ بیماران می‌شود از این در جلوگیری از بیماری سپسیس و عوارض ناشی از آن

اهمیت بسیار زیادی دارد. سپسیس پاسخ مرتب به عفونت پس از حمله پاتوژن‌های میکروبی به جریان خون است که به دنبال سرکوب ایمنی ارگان‌های عدم عمل‌کننده و حساسیت به عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد (۱۴).

در سپسیس، مهاجرت بسیار قوی نوتروفیل‌ها به ریه‌ها منجر به آسیب سلول‌های اندوتلیال و ایجاد اکسودای سروزی فیبرینی پایدار داخل آلوئولی fibrinous intra-alveolar exudate خطرناک می‌شود. بیماران مبتلا به زجر حاد تنفسی (ARDS) هنگام سپسیس، نفوذ زیادی از نوتروفیل‌ها را در بافت‌های ریه نشان می‌دهند که با شدت آسیب ریه در نتیجه آزاد شدن مقادیر زیادی آنزیم‌های پروتئولیتیک و سایتوکاین‌های التهابی از نوتروفیل‌های نفوذ یافته به بسترهای بافت ریه مرتبط است (۱۵).

Legras و همکاران در سال ۲۰۰۰ ضمن یک مطالعه مورد-شاهدی چند مرکزی در مورد داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی عنوان کردند که NSAIDs ها زمان درمان آنتی‌بیوتیکی مؤثر را طولانی‌تر کرده و یک عامل خطر برای سپسیس شدید و شوک سپتیک هستند (۷). این در حال است که Tongyoo و همکارانش در سال ۲۰۰۰ به این نتیجه رسیدند که درمان ARDS مرتبط با سپسیس بوسیله هیدروکورتیزون موجب بهبود قابل توجهی در فیزیولوژی و

اثرات محافظتی تجویز همزمان عصاره سرخارگل و هیدروکورتیزون در برابر ضایعات ریوی ناشی از سپسیس در رت

بدنی و جراحات ریوی موش‌ها را در مدل سپسیس شدید بهبود بخشید (۱۷).

در تحقیق حاضر نیز برای کنترل طوفان سایتوکایینی کشنده در سپسیس از هیدروکورتیزون استفاده شد تا بتوان در کنار آن اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی سرخارگل را نیز در ریه‌ها بررسی کرد.

Chen و همکارانش در سال ۲۰۲۴ اثر محافظتی زنجبیل در برابر آسیب حاد ریه ناشی از سپسیس و مکانیسم‌های اساسی آن را ارزیابی کردند. آنها با استفاده از بررسی‌های بافت‌شناسی دریافتند که زنجبیل آسیب حاد ریه ناشی از سپسیس را به میزان زیادی کاهش می‌دهد. همچنین، درمان با زنجبیل غلظت سایتوکاین التهابی ناشی از سپسیس و همچنین تعداد سلول‌های التهابی نفوذی در مایع برونشی-آلوئولی را در مقایسه با حیوانات سپسیس درمان نشده کاهش داد. گروه‌های سپسیس پیش درمان شده با زنجبیل، فعالیت میلوپراکسیداز ریوی (MPO) کمتری نسبت به گروه‌های سپسیس داشتند. علاوه بر این، Chen بیان کرد مکانیسم اساسی اثر محافظتی زنجبیل بر سپسیس با فعال شدن ژن‌های آنتی‌اکسیدانی مانند نیتریک اکسید سنتاز (iNOS)، سیکلواکسیژناز-۲ (COX-2)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و هم اکسیژناز ۱ (HO-1) انجام می‌شود. نتایج به‌دست‌آمده Chen نشان داد که

بافت آسیب دیده ریوی می‌شود اما تاثیری روی میزان زنده ماندن حیوانات درگیر سپسیس تاثیری ندارد (۱۶). در تحقیق حاضر نیز درجات ضایعات هیستوپاتولوژی در گروه‌های تیمار ۴۰۰ میکروگرم برکیلوگرم و ۸۰۰ میکروگرم برکیلوگرم سرخارگل-هیدروکورتیزون بطورمعنی‌داری کمتر شده بود. شروع آسیب حاد ریه ناشی از سپسیس در ارتباط مستقیم با فعال شدن آبشارهای پیچیده سایتوکاین‌ها و میانجی‌های التهابی است. اقدامات درمانی مبتنی بر مکانیسم سایتوکاین‌ها شامل گلوکوکورتیکوئید، مهارکننده سایتوکاین و مهارکننده فسفودی‌استراز-۴ است. بنابراین استفاده از گلوکوکورتیکوئید می‌تواند نقش حیات‌بخش برای بیماران گرفتار سپسیس حاد داشته باشد (۱۷).

Aziz و Wang در سال ۲۰۲۱ نشان دادند که مقاومت به گلوکوکورتیکوئید منجر به هایپرلاکتامی می‌شود و این ترکیب موجب افزایش کشندگی سپسیس می‌شود. در واقع مقاومت به گلوکوکورتیکوئید اغلب اثربخشی درمانی گلوکوکورتیکوئید را در سپسیس کاهش می‌دهد. با این حال، مکانیسم آن به طور کامل شناخته نشده است (۱۸).

Park و همکاران در سال ۲۰۲۲ نشان دادند که درمان زودهنگام با ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم دگزامتازون، وضعیت

زنجبیل آسیب حاد ریه ناشی از سپسیس را از طریق فعالیت ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی خود از طریق مهار مسیر NF- κ B و فعال‌سازی مسیر HO-1 مهار می‌کند. یافته‌های ما نشان می‌دهد که پیش‌درمانی با زنجبیل، آسیب حاد ریه ناشی از سپسیس را از طریق فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی سرکوب می‌کند، که نشان می‌دهد زنجبیل می‌تواند یک عامل پیشگیرانه مناسب برای آسیب حاد ریه ناشی از سپسیس باشد (۱۹).

در سال ۲۰۱۸ Aziz و همکاران اثبات کردند که حضور زیاد لنفوسیت B-1a نقش ارزنده‌ای در کاهش سایتوکاین‌های التهابی و نیز ضایعات بافتی ناشی از سپسیس دارند. Aziz در تصاویر بافت‌شناسی بافت ریه کاهش سطح احتقان آلوئولی، ترشحات، نفوذ سلولی بینابینی و آلوئولی، خونریزی مویرگی داخل آلوئولی و آسیب به ساختار اپیتلیال را در موش‌های CLP تحت درمان با سلول B-1a در مقایسه با موش‌های CLP تحت درمان با PBS نشان داد. این تغییرات بافت‌شناسی کاهش قابل توجه نمره آسیب بافت ریه در موش‌های تحت درمان با سلول B-1a در مقایسه با موش‌های CLP تحت درمان با PBS با میانگین ۵۴٪ بهبود را منعکس کرد (۲۰).

در تحقیق حاضر کاهش معنی‌دار ضایعات پاتولوژی نظیر ادم و اکسودای داخل آلوئول‌های ریه و نیز کاهش جمعیت سلول‌های التهابی مشاهده شد. میزان ضایعات پاتولوژی در گروه سپیس به طور معنی‌داری بیشتر از گروه های ۴۰۰ میکروگرم برکیلوگرم و ۸۰۰ میکروگرم برکیلوگرم دیده شد ($P<0/01$). همچنین گروه ۸۰۰ میکروگرم به طور معنی‌داری کاهش ضایعات بیشتری را نسبت به گروه ۴۰۰ میکروگرم میکروگرم نشان داد ($P<0/05$). این واقعیت که سرخار گل می‌تواند موجب کاهش ضایعات پاتولوژی ریه مبتلا به سپسیس شود در تحقیق حاضر مشهود بود.

استرس اکسیداتیو و برهم خوردن تعادل بین رادیکال‌های آزاد و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن، یکی از عوامل مهم در زمان مبتلا شدن به سپسیس است و با بررسی عوامل مؤثر و تاثیر گذار بر آن می‌توان خواص دارویی و درمانی گیاه سرخارگل را بر کاهش میزان التهاب سنجید. یکی از فراسنجه‌های مهم در برآورد استرس اکسیداتیو بافت، مالون دی آلدهید (MDA) است که در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه مشخص شد که سطح مالون دی آلدهید بافت ریه در تحقیق اثرات حمایتی سرخار گل-هیدروکورتیزون بر ریه‌های دچار سپسیس در ۲۴ ساعت پس از چالش CLP در گروه سپسیس بطور معنی‌داری بالاتر است

اثرات محافظتی تجویز همزمان عصاره سرخارگل و هیدروکورتیزون در برابر ضایعات ریوی ناشی از سپسیس در رت

التیام‌دهنده زخم برای بهبود سیستم ایمنی و درمان علائم تنفسی ناشی از عفونت‌های باکتریایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. عصاره‌های سرخارگل فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی نشان داده و بی‌خطر هستند (۳).

Duan و همکارانش در سال ۲۰۲۴ نشان دادند که شیرین بیان با مهار مسیرهای سیگنالینگ NF- κ B و MEK/ERK، سپسیس ناشی از CLP را کاهش می‌دهد. نکته قابل توجه این است که شیرین بیان نه در شرایط آزمایشگاهی و نه در شرایط درون‌تنی، در رشد باکتری‌ها اختلال ایجاد نکرد. التهاب سیستمیک و تولید بیش از حد ROS از ویژگی‌های اصلی سپسیس هستند. یافته‌های Duan افزایش سطح $TNF-\alpha$ ، IL-1 β و IL-6 را در طول سپسیس و التهاب ناشی از LPS نشان داد در حالی که درمان با شیرین بیان این آبشار التهابی را مهار کرد. در نتیجه، کاهش تولید فاکتورهای التهابی و ROS به عنوان یک استراتژی حیاتی در مدیریت سپسیس ظهور کرده است (۲۲).

در مطالعه حاضر با بررسی هیستوپاتولوژی موش‌های گروه ۸۰۰ میکروگرم دارای بافت طبیعی‌تر بودند در حالی که ریه‌های رت‌هایی که در معرض چالش CLP قرار گرفتند، تغییرات التهابی معنی‌داری را نشان دادند که با ادم ریه و ارتشاح نوتروفیل مشخص شد. کاهش ضایعات پاتولوژیک

و تفاوت معناداری در مقایسه با گروه دریافت کننده عصاره سرخارگل با دوز ۴۰۰ و گروه ۸۰۰ میکروگرم نشان داد ($P < 0.01$).

با توجه به عوامل تأثیر گذار دیگر در ایجاد سپسیس راهکارهای زیادی برای کنترل آن وجود دارد دیرباز استفاده از آنتی بیوتیک‌ها مرسوم بود و از آنتی بیوتیک‌ها برای کاهش بار ویروسی، همچنین بهتر کردن عملکرد سیستم دفاعی بدن استفاده می‌شد. اما روز به روز استفاده از گیاهان دارویی برای جایگزین کردن با آنتی‌بیوتیک‌ها در نظر گرفته شده است و دلایل استفاده از آن خاصیت ضد التهابی و ضد اکسیدانی آن بوده است (۳، ۲۱). در این مطالعه به بررسی درمانی گیاه سرخارگل همزمان با تجویز هیدروکورتیزون بعنوان یک ضد التهاب قوی بر التهاب ناشی از سپسیس پرداخته شده است. البته اثرات سرخارگل علاوه بر ضد التهاب بودن شامل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی نیز می‌باشد. در سال‌های اخیر مطالعاتی درباره اثر ضد میکروبی انواع اسانس‌ها و عصاره‌ها صورت گرفته و نتایج نشان دهنده این موضوع است که این گیاهان دارویی اثرات مطلوب بسیار بر خاصیت میکروب‌زایی و ضدباکتریایی دارند (۳).

در مطالعه Sharifi-Rad و همکاران در سال ۲۰۱۸ بیان شد که عصاره‌های گیاه سرخارگل به طور سنتی به عنوان

در گروه درمان با سرخارگل مشاهده شد، زیرا سرخارگل بسیاری از علائم جراحی حاد ریوی را کاهش داد.

مطالعاتی که در گذشته انجام شده است حاکی از این موضوع می‌باشد سپیس با نوتروفیلی شدید همراه است (۲۳).

افزایش میزان نوتروفیل ناشی از سپیس چه در مطالعات حیوانی و چه مطالعات انسانی رخ داده است، در مطالعه Gharebaghi و همکاران در سال ۲۰۱۹ به منظور ارزیابی

نسبت نوتروفیل به لنفوسیت مشخص شد که میزان نوتروفیل در گروه افرادی که فوت شدند نسبت ترخیص شدگان بیشتر می‌باشد (۲۴). در مطالعه حاضر مشخص شد که میزان

نوتروفیل در گروه CLP نسبت به دو گروه دریافت کننده عصاره سرخار گل با دوز ۴۰۰ میکروگرم برکیلوگرم و ۸۰۰ میکروگرم برکیلوگرم بیشتر بود.

نتیجه گیری:

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثربخشی ضد التهابی عصاره سرخارگل در رت‌ها انجام شد، در این مطالعه رت‌ها به سه گروه تقسیم شدند، گروه ۸۰۰ میکروگرم، گروه CLP و گروه ۴۰۰ میکروگرم، در این مطالعه مشخص شد که ظاهر

ریه در گروه CLP ملتهب‌تر و با ادم بیشتر و ریه پر خون‌تر و بزرگتر بوده است. با بررسی وزن مرطوب به وزن خشک، سطح نوتروفیلی و سطح مالون دی آلدئید مشخص شد که این میزان در گروه CLP نسبت به گروه ۴۰۰ میکروگرم و گروه ۸۰۰ میکروگرم بطور معنی‌داری بیشتر بود. اما ذخایر آنتی‌اکسیدانی در گروه ۸۰۰ میکروگرم نسبت به گروه دریافت کننده ۴۰۰ میکروگرم سرخارگل بیشتر و دریافت کننده ۴۰۰ میکروگرم سرخارگل نسبت به گروه CLP بیشتر بود. نتایج نهایی مطالعه حاضر حاکی از این موضوع بوده است که مصرف عصاره سرخار گل به حد مطلوب و معنی‌داری از التهاب ناشی از سپیس می‌کاهد.

سپاسگزاری

نویسندگان از گروه پاتوبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی دانشکده پزشکی تهران تشکر می‌کنند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌نمایند که در این پژوهش هیچگونه تعارض منافی ندارند.

1. Kumar V. Pulmonary innate immune response determines the outcome of inflammation during pneumonia and sepsis-associated acute lung injury. *Frontiers in immunology*. 2020;11:1722.
2. Prauchner CA. Oxidative stress in sepsis: Pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy. *Burns*. 2017;43(3):471-85.
3. Sharifi-Rad M, Mnayer D, Morais-Braga MFB, Carneiro JNP, Bezerra CF, Coutinho HDM, et al. Echinacea plants as antioxidant and antibacterial agents: From traditional medicine to biotechnological applications. *Phytother Res*. 2018;32(9):1653-63.
4. Burlou-Nagy C, Bănică F, Jurca T, Vicaș LG, Marian E, Muresan ME, et al. Echinacea purpurea (L.) Moench: Biological and pharmacological properties. A review. *Plants*. 2022;11(9):1244.
5. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue III LW, Bland KI, Chaudry IH. Cecal ligation and puncture. *Shock*. 2005;24:52-7.
6. Deng Z, He M, Hu H, Zhang W, Zhang Y, Ge Y, et al. Melatonin attenuates sepsis-induced acute kidney injury by promoting mitophagy through SIRT3-mediated TFAM deacetylation. *Autophagy*. 2024;20(1):151-65.
7. Legras A, Giraudeau B, Jonville-Bera AP, Camus C, François B, Runge I, et al. A multicentre case-control study of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as a risk factor for severe sepsis and septic shock. *Crit Care*. 2009;13(2):R43.
8. Barnes J, Anderson LA, Gibbons S, Phillipson JD. Echinacea species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties. *J Pharm Pharmacol*. 2005;57(8):929-54.
9. Guiotto P, Woelkart K, Grabnar I, Voinovich D, Perissutti B, Invernizzi S, et al. Pharmacokinetics and immunomodulatory effects of phytotherapeutic lozenges (bonbons) with *Echinacea purpurea* extract. *Phytomedicine*. 2008;15(8):547-54.
10. Tsai MS, Huang CH, Wang CH, Cheng HJ, Wu SN, Chang WT, Chen WJ. Post-Cardiac Arrest Hydrocortisone Use Ameliorates Cardiac Mitochondrial Injury in a Male Rat Model of Ventricular Fibrillation Cardiac Arrest. *J Am Heart Assoc*. 2021;10(10):e019837.
11. Moorthy AN, Rai P, Jiao H, Wang S, Tan KB, Qin L, et al. Capsules of virulent pneumococcal serotypes enhance formation of neutrophil extracellular traps during in vivo pathogenesis of pneumonia. *Oncotarget*. 2016;7(15):19327-40.
12. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama*. 2016;315(8):801-10.
13. Ingbar DH. Mechanisms of repair and remodeling following acute lung injury. *Clin Chest Med*. 2000;21(3):589-616.
14. Czermak BJ, Breckwoldt M, Ravage ZB, Huber-Lang M, Schmal H, Bless NM, et al. Mechanisms of enhanced lung injury during sepsis. *Am J Pathol*. 1999;154(4):1057-65.
15. Fein AM, Calalang-Colucci MG. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in sepsis and septic shock. *Crit Care Clin*. 2000;16(2):289-317.
16. Tongyoo S, Permpikul C, Mongkolpun W, Vattanavanit V, Udompanturak S, Kocak M, Meduri GU. Hydrocortisone treatment in early sepsis-associated acute respiratory distress syndrome: results of a randomized controlled trial. *Crit Care*. 2016;20(1):329.

17. Park YJ, Lee MJ, Bae J, Lee JH, Lee HAR, Mun S, et al. Effects of Glucocorticoid Therapy on Sepsis Depend Both on the Dose of Steroids and on the Severity and Phase of the Animal Sepsis Model. *Life (Basel)*. 2022;12(3).
18. Aziz M, Wang P. Glucocorticoid resistance and hyperlactatemia: A tag team to worsen sepsis. *Cell Metab*. 2021;33(9):1717-8.
19. Chen J, Zhou L, Li X, Wu X, Li Y, Si L, Deng Y. Protective effect of zerumbone on sepsis-induced acute lung injury through anti-inflammatory and antioxidative activity via NF- κ B pathway inhibition and HO-1 activation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2024;397(4):2241-55.
20. Aziz M, Ode Y, Zhou M, Ochani M, Holodick NE, Rothstein TL, Wang P. B-1a cells protect mice from sepsis-induced acute lung injury. *Molecular Medicine*. 2018;24(1):26.
21. Aarland RC, Bañuelos-Hernández AE, Fragoso-Serrano M, Sierra-Palacios ED, Díaz de León-Sánchez F, Pérez-Flores LJ, et al. Studies on phytochemical, antioxidant, anti-inflammatory, hypoglycaemic and antiproliferative activities of *Echinacea purpurea* and *Echinacea angustifolia* extracts. *Pharm Biol*. 2017;55(1):649-56.
22. Duan M, Jie J, Li C, Bai X, Hua S, Tang M, Li D. Echinatin alleviates sepsis severity through modulation of the NF- κ B and MEK/ERK signaling pathways. *Biomed Pharmacother*. 2024;179:117359.
23. Li W, Wu AH, Zhu S, Li J, Wu R, D'Angelo J, Wang H. EGCG induces G-CSF expression and neutrophilia in experimental sepsis. *Immunol Res*. 2015;63(1-3):144-52.
24. Gharebaghi N, Hasanloei MA, Khalifani A, Pakzad S, Lahooti D. Neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with gram-negative sepsis admitted to intensive care unit. *Anaesthesiology Intensive Therapy*. 2019;51(1):11-6.

Protective effects of Echinacea extract and hydrocortisone coadministration against sepsis-induced pulmonary lesions in rats

Reyhane Zendedel, Saeed Hesaraaki*

1- Department of Pathobiology, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

Email: s.hesaraki@srbiau.ac.ir

Abstract

Sepsis is a severe cytokine crisis with the systemic and pulmonary edema, causing death. Corticosteroids are prescribed in sepsis crises to reduce the destructive reactions caused by the exaggerated immune system response, especially in pulmonary edema. This study aimed to investigate the protective effects of Echinacea extract combined with hydrocortisone in reducing edema and inflammation in the lungs of rats that had suffered from sepsis crises. In this study, the rats were split into three groups: one group had sepsis without any treatment, and the other two groups received daily doses of 400 and 800 micrograms/kg of Echinacea extract for two weeks, plus an injection of 8 mg/kg of hydrocortisone on the 14th day after sepsis. Sepsis was induced by CLP on day 14, and rats were sacrificed 24 hours later by pentobarbital (250 mg/kg IP). First, the wet-to-dry weight ratio of the lung was calculated. The neutrophil count in bronchoalveolar lavage fluid was assessed. Half of the lung tissue was allocated for histopathology, and the other half was allocated for evaluating malondialdehyde (MDA) and total antioxidant capacity (TAC) parameters. The wet-to-dry weight ratio of the lung in the sepsis group was found to be higher than the other groups ($P<0.01$). The amount of malondialdehyde (MDA) was significantly higher in the sepsis group than in the other two groups ($P<0.01$). However, the antioxidant reserve in the 800 group was significantly higher than in the sepsis and 400 groups ($P<0.01$). The levels of tissue damage (fluid buildup in the air sacs and airways) were also significantly lower in the sepsis, 400, and 800 groups, respectively. The results of the present study indicated that Echinacea extract plays a role in reducing inflammation caused by sepsis.

Keywords: *Echinacea, Hydrocortisone, Sepsis, Pulmonary lesions*