

## **The Effect of *Rosa canina* Extract Against Paraquat-induced Lung Injury**

Amirshahrokhi K\*

Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran  
\*Corresponding author. Tel: +984533522437, Fax: +984533522437, E-mail: amirshahrokhi@gmail.com

Received: Oct 22, 2019      Accepted: Dec 21, 2019

### **ABSTRACT**

**Background & objectives:** Paraquat is a toxic herbicide that is widely used in many countries. Paraquat selectively accumulates in the lung tissue and leads to severe pulmonary injury through the oxidative and inflammatory processes. The plant *Rosa canina* L. has been used for long years as an herbal medicine throughout the world. *Rosa canina* L. is a member of Rosaceae family and shows therapeutic effects against numerous disorders by its antioxidant and anti-inflammatory properties. The aim of this study was to evaluate the antioxidant effect of *Rosa canina* fruits on the paraquat induced lung injury in a mouse model.

**Methods:** Animal experiments were performed on male NMRI mice. Paraquat was injected at a single dose (20 mg/kg, ip) to induce pulmonary damage in mice. The extract of *Rosa canina* fruits (200 and 400 mg/kg/day, orally) administered by gavage for four days after the injection of paraquat. The treated mice were compared to normal mice as a control group. At the end of the experiment, lung tissue samples were collected for biochemical analysis.

**Results:** The results showed that administration of paraquat caused an oxidant-antioxidant imbalance in the lung tissue. However, treatment with *Rosa canina* increased the levels of glutathione (GSH) and catalase (CAT) antioxidants and decreased the levels of malondialdehyde (MDA) and myeloperoxidase (MPO) in the lung tissues compared with those in the paraquat group.

**Conclusion:** Treatment of paraquat-exposed mice with the extract of *Rosa canina* fruits improved oxidant-antioxidant balance in the lung tissue of mice. In other words, the present study demonstrated that *Rosa canina* has remarkable antioxidant effects against paraquat induced oxidative damage.

**Keywords:** *Rosa canina* L.; Paraquat; Lung Injury; Antioxidant Effects

## اثر عصاره نسترن کوهی در برابر آسیب ریوی ناشی از پاراکوات

کیوان / امیرشاھرخی\*

گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

\* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۵۳۵۲۲۴۳۷ · فاکس: ۰۴۵۳۳۵۲۲۴۳۷ · پست الکترونیک: amirshahrokhi@gmail.com

### چکیده

**زمینه و هدف:** پاراکوات یک علف کشنده سمی می باشد که در بسیاری از کشورها بطور وسیع استفاده می گردد. پاراکوات بطور اختصاصی در بافت ریه متمرکز شده و منجر به آسیب ریوی از طریق روندهای اکسیداتیو و التهابی می گردد. گیاه نسترن کوهی (*Rosa canina L.*) برای سالها به عنوان یک داروی گیاهی در سراسر دنیا استفاده شده است. نسترن کوهی عضوی از خانواده رزاسه بوده و در برابر اختلالات متعددی اثرات درمانی نشان می دهد که از طریق خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی می باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثر آنتی اکسیدانی میوه های نسترن کوهی بر روی آسیب ریوی ناشی از پاراکوات در مدل موشی می باشد.

**روش کار:** مطالعات حیوانی بر روی موش سوری نر جنس NMRI انجام گرفت. پاراکوات بصورت تک دوز (20 mg/kg) برای ایجاد آسیب ریوی در موش ها تزریق داخل صفاقی گردید. پس از تزریق پاراکوات، عصاره میوه های نسترن کوهی در دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ mg/kg بصورت خوراکی به مدت چهار روز استفاده شد. موشهای تیمار شده، با موشهای نرمال بعنوان گروه کنترل مقایسه گردیدند. در انتهای مطالعه، نمونه های بافت ریه برای بررسیهای بیوشیمیایی جمع آوری شدند.

**یافته ها:** نتایج نشان دادند که استفاده از پاراکوات باعث عدم تعادل اکسیدان-آنتی اکسیدان در بافت ریه گردید. درمان با نسترن کوهی سطوح آنتی اکسیدانی گلوتاتیون (GSH) و کاتالاز (CAT) را در بافت ریه در مقایسه با گروه پاراکوات افزایش و سطوح مالون دی آلدھید (MDA) و میلپراکسیداز (MPO) را کاهش داد.

**نتیجه گیری:** درمان موشهای مواجه یافته با پاراکوات بواسیله عصاره میوه های نسترن کوهی تعادل اکسیدان-آنتی اکسیدان را در بافت ریه موش ببود بخشید. به بیان دیگر مطالعه حاضر ثابت کرد که نسترن کوهی اثرات آنتی اکسیدانی قابل توجهی در برابر آسیب اکسیداتیو پاراکوات دارد.

**واژه های کلیدی:** نسترن کوهی؛ پاراکوات؛ آسیب ریوی؛ اثرات آنتی اکسیدانی

دربافت: ۱۳۹۸/۷/۳۰ · پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۳۰

خواص حشره کشی آن در سال ۱۹۵۰ شناخته شد. پاراکوات با نام شیمیایی 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride بوده و بخارتر مسمومیت ویا سوء استفاده برای خودکشی یکی از مشکلات جدی بهداشتی در کشورها بهویژه کشورهای آسیایی می باشد. تخمین زده می شود هر ساله حدود ۲۰۰۰ مورد مسمومیت با

### مقدمه

مسومومیت با علف کش ها و سایر مواد شیمیایی کشاورزی یک مشکل عمده بهداشت عمومی در سطح دنیا می باشد. از سال ۱۹۸۰ ریسک قرارگیری در معرض علف کش ها رو به افزایش بوده است. پاراکوات یک علف کش غیراختصاصی می باشد که برای اولین بار در سال ۱۸۸۲ به عنوان یک معرف احیاکننده ساخته و

پیشرفت التهاب و فیبروز ریوی جلوگیری نمایند [۴-۲]. جهت یافتن درمانی موثر برای کاهش عوارض ناشی از مسمومیت با پاراکوات بویژه عوارض ریوی آن، مطالعات فراوانی انجام گرفته است. گیاهان دارویی بعنوان منبع مهم ترکیبات با خواص درمانی بیشترین مطالعات را در خصوص درمان مسمومیت با پاراکوات به خود اختصاص داده است [۵-۹]. با توجه به مکانیسم آسیب‌زاوی سم پاراکوات می‌توان نتیجه گرفت که تمرکز اکثر مطالعات فوق بر روی یافتن ترکیباتی است که خواص آنتی اکسیدانی قوی داشته باشند.

نسترن کوهی (با نام علمی *Rosa canina L.*) گیاهی درختچه‌ای از خانواده رزاسه است که در بسیاری از مناطق دنیا از جمله در ایران رشد می‌کند. نسترن کوهی بعنوان یک گیاه دارویی در طب سنتی برای صدها سال در درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده شده است. طبق مطالعات انجام شده این گیاه برای پیشگیری و یا درمان بیماری‌هایی از قبیل عفونتها، دیابت، اختلالات گوارشی مثل زخم معده، بیماری‌های التهابی مثل اوستئوآرتрит، دردهای مزمن، افزایش اوریک اسید، بیماری‌های پوستی مثل پسوریازیس، اختلالات تنفسی مثل آسم، برونشیت، سرفه و علایم سرماخوردگی موثر می‌باشد. مکانیسم‌هایی که برای اثرات درمانی نسترن کوهی در اختلالات فوق مطرح گردیده است عمدها دو خاصیت آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی قوی آن می‌باشد. برای مصارف درمانی اکثر قسمت‌های گیاه نسترن کوهی از جمله برگ‌ها، گل‌ها و بهویژه میوه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۰-۱۴]. نتایج یک مطالعه که اثر عصاره میوه نسترن کوهی بر روی نوتروفیل‌های ایزووله شده را بررسی کرده است، نشان داد که عصاره میوه نسترن کوهی که فاقد ویتامین C اما غنی از پرو-آنتوسیانیدین‌ها و فلاونوئیدها بود، توانست آنیون‌های سوپراکساید، هیپوکلریت سدیم و پراکسید هیدروژن ناشی از فعالیت بیش از حد نوتروفیل‌ها را کاهش دهد. این

پاراکوات اتفاق می‌افتد. میزان مرگ و میر ناشی از مسمومیت با پاراکوات بسیار بالا است و دوز تقریبی کشنده آن در یک فرد بزرگسال حدود ۳-۶ گرم می‌باشد. معمول‌ترین راه مسمومیت خوردن محلول غلیظ آن است که می‌تواند بطور تصادفی یا عمدی باشد. تماس پوستی نیز بخصوص اگر دارای زخم باشد می‌تواند باعث مسمومیت شدید گردد. برای جلوگیری از خوردن تصادفی، بسیاری از کارخانجات سازنده به آن مواد رنگی، مواد دارای بوی تند و مواد تهوع آور اضافه می‌کنند [۲۱].

پاراکوات در بافت‌هایی که دارای جریان خون بالایی هستند مثل ریه‌ها، کلیه‌ها و کبد توزیع می‌شود. غلظت پاراکوات در پارانشیم ریه بدلیل جذب فعال آن ۲۰-۳۰ برابر غلظت پلاسمای آن می‌باشد. ریه هدف عمده سم پاراکوات بوده و نارسایی تنفسی ناشی از آن متدائل‌ترین علت مرگ می‌باشد. مکانیسم آسیب بافتی ناشی از پاراکوات بدین صورت می‌باشد که این سم در حضور NADPH به رادیکال‌های پاراکوات تبدیل می‌شود. سپس رادیکال‌های پاراکوات با اکسیژن واکنش داده و آنیون سوپراکساید ( $O_2^-$ ) تولید می‌کنند. مقدار بیش از حد آنیون‌های سوپراکساید باعث تشکیل آنیون‌های آزاد هیدروکسیل (OH<sup>-</sup>) شده و از طریق پراکسیداسیون لیپیدی و مهار آنزیم‌های ضروری سلول‌ها منجر به از بین رفتن سلول‌ها می‌گردد. تشخیص زودهنگام مسمومیت بسیار مهم بوده و اقدامات درمانی هرچه زودتر باید آغاز گردد. اولین اقدام درمانی در مسمومین با پاراکوات تجویز شارکول فعال (1-2g/kg) و سوربیتول ۷۰٪ می‌باشد. اقدامات حمایتی دیگر شامل کنترل مایع، الکترولیت‌ها و درد بیمار می‌باشد. برای سم پاراکوات هیچ آنتی دوت موثری وجود ندارد. متخصصین داروهای آنتی اکسیدان مختلفی برای این بیماران استفاده کرده اند از جمله: ویتامین E و C در دوزهای بالا- N- استیل سیستئین و کورتیکواستروئیدها. ترکیب سایکلوفسفامید و یک کورتیکواستروئید می‌تواند از

جمع آوری شده و از کاغذ صافی عبور داده شد. محلول بدست آمده در داخل یک بالن ریخته شده و به دستگاه روتاری جهت عصاره گیری<sup>۱</sup> متصل شد. پس از تنظیم دما و سرعت چرخش بالن حاوی حلال و عصاره، دستگاه روتاری به چیلر متصل گردید. پس از ۴ تا ۵ ساعت عصاره میوه نسترن کوهی به صورت شیرابه چسبناکی که حاوی ترکیبات شیمیایی و موثره این گیاه می باشد بدست آمد. عصاره حاصله که کاملاً محلول در آب می باشد جهت انجام آزمایشات بر روی موش سوری استفاده گردید.

### طرح آزمایش

در این مطالعه آزمایشات بر روی موش های سوری جنس نر گونه NMRI انجام گرفت. تعداد ۲۰ عدد موش با وزن ۲۵-۳۰ گرم به چهار گروه به ترتیب زیر تقسیم شد (n=5).

- ۱- گروه کنترل نرمال، دریافت کننده نرمال سالین.
- ۲- گروه پاراکوات، دریافت کننده پاراکوات (درمانی اول، دریافت کننده پاراکوات (۲۰ mg/kg دوز، تزریق داخل صفاقی) و عصاره گیاه خوارکی، بمدت ۴ روز).
- ۳- گروه درمانی دوم، دریافت کننده پاراکوات (۲۰ mg/kg دوز، تزریق داخل صفاقی) و عصاره گیاه خوارکی، بمدت ۴ روز.
- ۴- گروه دریافت کننده پاراکوات (۲۰۰ mg/kg/day) و عصاره گیاه خوارکی، بمدت ۴ روز.

عصاره میوه نسترن کوهی در دو دوز مختلف (۲۰۰ و ۴۰۰ mg/kg) استفاده گردیدند که بر اساس مطالعه قبلی ما انتخاب شدند [۱۰]. دوز پاراکوات نیز بر اساس مطالعه قبلی (۲۰ mg/kg) انتخاب گردید [۴]. در روز اول پاراکوات بصورت تک دوز تزریق شد و عصاره گیاه بصورت خوارکی (محلول در آب) از روز اول تا چهارم هر روز یک نوبت استفاده گردید. پس از اتمام آزمایش، در روز پنجم موش ها در هر چهار گروه با کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زایلازین (۱ mg/kg) پیوшен شده و بافت ریه آنها بطور کامل جدا گردید.

مطالعه تایید کننده اثر ضدالتهابی غیرمستقیم عصاره میوه نسترن کوهی می باشد [۱۵]. مطالعه دیگری که اثر میوه نسترن کوهی را بر روی سلول های سرطانی کولون انسان بررسی کرده است، نشان داد که این گیاه می تواند سیکل سلولی سلول های سرطانی را دچار اختلال کرده و باعث مرگ آنها گردد. مکانیسم پیشنهاد شده برای این اثر داشتن خاصیت آنتی اکسیدانی، ضد تمایز سلولی و تحریک آپوپتوزیس در سلول های سرطانی می باشد. مطالعه مذکور خواص فوق را مدعیون و بتامین C، فلاونوئیدها و پلی فنول های موجود در میوه نسترن کوهی دانسته است [۱۶].

با توجه به مطالب ارائه شده در مورد مکانیسم آسیب زایی مسمومیت با پاراکوات، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات آنتی اکسیدانی عصاره میوه های نسترن کوهی برای کاهش عوارض ریوی سم پاراکوات در موش سوری می باشد. در این مطالعه فاکتورهای اکسیدان و آنتی اکسیدان در بافت ریه مورد بررسی قرار گرفت.

### روش کار

کد اخلاق مطالعه IR.ARUMS.REC.1398.508 می باشد.

### آماده سازی عصاره گیاه

ابتدا میوه های خشک شده گیاه نسترن کوهی بوسیله دستگاه خوردن بر قی کاملاً به شکل پودر در آورده شد. مقدار مشخص از پودر میوه های گیاه در داخل حلال آبی الکلی ریخته و کاملاً مخلوط گردید. حلال هیدرو الکلی مذکور دارای ۷۰ درصد آب و ۳۰ درصد متانول می باشد. مخلوط پودر میوه گیاه با حلال آبی- متانولی در داخل قیف های مخروطی مخصوص جداسازی ریخته و به مدت یک شبانه روز در شرایط تاریک و خنک قرار داده شد. در این شرایط ترکیبات موثره موجود در گیاه وارد حلال می شود. با باز کردن شیر پایین قیف مخروطی، حلال حاوی عصاره گیاه

<sup>۱</sup> Rotary Evaporator

طبق تعریف هر یک واحد MPO مقداری از آن می‌باشد که برای شکستن ۱ میکرومول پراکسید هیدروژن در مدت زمان ۱ دقیقه در دمای اتاق لازم است.

#### اندازه گیری GSH

در حدود ۵۰ میکرولیتر از نمونه با ۵۰ میکرولیتر تری کلورواستیک اسید (۱۰٪) مخلوط شده و سانتریفیوژ شدند تا پروتئین اضافی جدا گردد. نمونه حاصله با حدود ۱۵۰ میکرولیتر محلولی بنام ۵-۵-تیوبیس-۲-نیتروبنزوئیک اسید (DTNB) با غلظت ۱ میلی مول مخلوط گردید. گلوتاتیون موجود در نمونه با DTNB واکنش داده و دچار تغییر رنگ گردید. شدت رنگ حاصله در طول موج ۴۱۲ نانومتر بوسیله دستگاه Microplate Reader خوانده شد. مقدار  $\mu\text{M}/\text{mg tissue}$  GSH موجود در هر نمونه بر حسب  $\text{nM}/\text{mg tissue}$  بیان گردید.

#### اندازه گیری CAT

اندازه گیری آنزیم کاتالاز به روش Aebi انجام گرفت [۱۷]. ابتدا  $5\text{ml}/0.5\text{ml}$  بافر فسفات (۵۰ میلی مول با pH ۷) به یک کووت ریخته شد و سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه به آن اضافه گردید. واکنش با افزودن  $5\text{ml}/0.5\text{ml}$  هیدروژن پراکساید (۳۰ میلی مول) شروع می‌شود. تغییر جذب در طول موج ۴۰۰ نانومتر بوسیله یک دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم CAT معادل مقدار آنزیمی است که بتواند ۱ میلی مول هیدروژن پراکساید را در مدت یک دقیقه تجزیه نماید. نتایج بر اساس میلی واحد آنزیم CAT در یک دقیقه به ازای میلی گرم بافت آنزیم (mU/min/mg tissue) بیان گردید.

#### تجزیه و تحلیل آماری

نتایج بصورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد<sup>۱</sup> بیان شدند. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از روش ANOVA یک طرفه و آزمون توکی<sup>۲</sup> انجام گرفت. تفاوت بین

بافت‌های ریه ابتدا در داخل نرمال سالین شستشو داده شده و سپس جهت بررسی‌های بیوشیمیایی در داخل فریزر با دمای منفی ۷۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

#### آماده سازی نمونه‌های بافتی

بافت‌های ریه جدا شده از موش‌ها در حجم مشخصی از بافر  $200\text{ mg}/1\text{ ml}$  بافت در Trizma-HCl (Trizma-HCl) بوسیله یک هموژنایزر هموژن گردیدند. سپس نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شده و مایع روی آنها جدا گردید. نمونه‌های سوپرناتانت جهت اندازه گیری فاکتورهای بیوشیمیایی مورد نظر مورد استفاده قرار گرفتند.

#### اندازه گیری MDA

در داخل یک میکروتیوب در حدود ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه با ۱۰۰ میکرولیتر تری کلورواستیک اسید (۲۰٪) و ۱۰۰ میکرولیتر محلول تیوباریتوریک اسید (TBA) با غلظت ۵ میلی مول مخلوط گردید. مخلوط حاصل در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت حرارت داده شد. به تدریج MDA موجود در نمونه با TBA ماده واکنش داده و محلول به رنگ صورتی و یا متمایل به قرمز در می‌آید. محصول واکنش به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع روی آن جدا و در میکروپلیت ریخته شد. شدت رنگ حاصله در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد و مقدار MDA موجود در هر نمونه بر حسب  $\text{nM}/\text{mg tissue}$  بیان گردید.

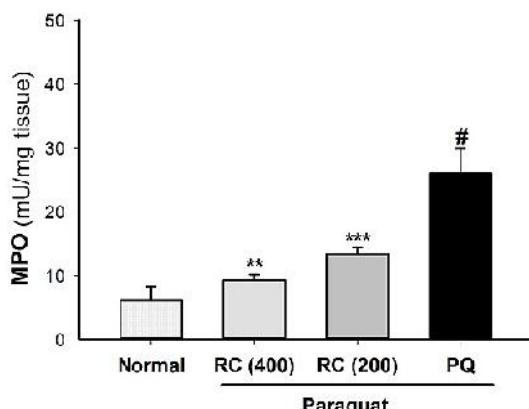
#### اندازه گیری MPO

در حدود ۵۰ میکرولیتر از نمونه با ۵۰ میکرولیتر محلول تترامتوکسی بنزیدین (TMB) با غلظت  $2/5\text{ mM}$  در حلال دی متیل سولفوکساید مخلوط گردید. واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محلول پراکسیدهیدروژن (با غلظت  $1/5\text{ Mm}$  در بافر فسفات) آغاز گردید. در طی این واکنش یک رنگ متمایل آبی بدست می‌آید که شدت آن در طول موج ۳۷۰ نانومتر خوانده شد. میزان MPO موجود در هر نمونه بر حسب  $\text{mU}/\text{mg tissue}$  بیان گردید.

<sup>1</sup> Mean  $\pm$  Standard Error

<sup>2</sup> Tukey

قابل توجهی در مقایسه با گروه کنترل نرمال افزایش دهد ( $p < 0.001$ ) (شکل ۲). استفاده از عصاره نسترن کوهی به مدت چهار روز با دوز  $400\text{ mg/kg}$  مانع از افزایش سطح MPO بافت ریه در مقایسه با گروه پاراکوات (PQ) شد ( $p < 0.001$ ). همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود مشابه همین اثر در گروه دریافت‌کننده نسترن کوهی با دوز  $200\text{ mg/kg}$  دیده می‌شود که دارای تفاوت معنی‌دار با گروه پاراکوات (PQ) می‌باشد ( $p = 0.008$ ).



شکل ۲. میزان MPO موجود در بافت ریه در موش‌های گروه کنترل نرمال، پاراکوات (PQ)، نسترن کوهی با دوز  $400\text{ mg/kg}$  (RC 400) و نسترن کوهی با دوز  $200\text{ mg/kg}$  (RC 200). استفاده از سم پاراکوات باعث افزایش معنی‌دار سطح MPO بافت ریه گردید و درمان با RC 400 و RC 200 گروه ۲۰۰ در هر دو گروه ۲۰۰ و RC 400 توانست سطح MPO را کاهش دهد.  $\# p < 0.001$  میزان MPO در مقایسه با گروه PQ را کاهش دهد.  $\# p < 0.001$  میزان MPO در مقایسه با گروه ۲۰۰ و  $\# p < 0.01$  میزان MPO در مقایسه با گروه ۴۰۰.

#### اثر نسترن کوهی بر میزان گلوتاتیون (GSH) بافت ریه

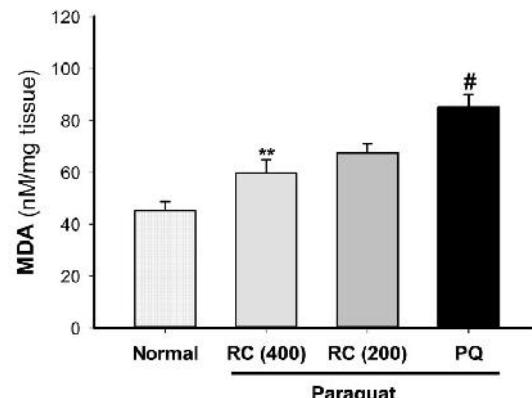
همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود تزریق پاراکوات ( $20\text{ mg/kg}$ ) به موش‌ها توانست میزان GSH موجود در بافت ریه موش را به میزان قابل توجهی در مقایسه با گروه کنترل نرمال کاهش دهد ( $p = 0.005$ ). در حالی که استفاده از عصاره نسترن کوهی به مدت چهار روز بصورت خوراکی با دوز  $400\text{ mg/kg}$  مانع از کاهش سطح GSH بافت ریه در مقایسه با گروه پاراکوات (PQ) شد ( $p = 0.01$ ).

گروه‌ها زمانی معنادار در نظر گرفته شدند که  $p < 0.05$  بود.

#### یافته‌ها

##### اثر نسترن کوهی بر میزان مالون دی‌آلدھاید (MDA) بافت ریه

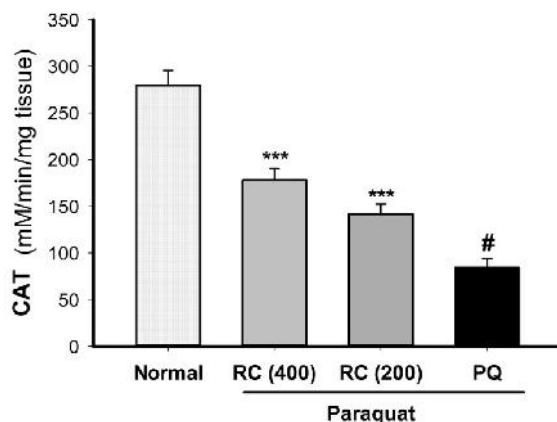
در گروه پاراکوات (PQ) تزریق سم پاراکوات در  $20\text{ mg/kg}$  به موش‌ها توانست سطح MDA در بافت ریه را نسبت به گروه کنترل نرمال بطور معنی‌داری افزایش دهد ( $p < 0.001$ ) (شکل ۱). مصرف عصاره گیاه نسترن کوهی در دوز  $400\text{ mg/kg}$  به مدت چهار روز مانع از این افزایش در بافت ریه موش‌ها گردید ( $p < 0.001$ ). اثر عصاره نسترن کوهی در دوز  $200\text{ mg/kg}$  بر روی میزان MDA بافت ریه در مقایسه با گروه پاراکوات (PQ) از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $p = 0.92$ ).



شکل ۱. میزان MDA موجود در بافت ریه در موش‌های گروه کنترل نرمال، پاراکوات (PQ)، نسترن کوهی با دوز  $400\text{ mg/kg}$  (RC 400) و نسترن کوهی با دوز  $200\text{ mg/kg}$  (RC 200). استفاده از سم پاراکوات باعث افزایش معنی‌دار سطح MDA گردید و درمان با عصاره میوه نسترن کوهی در گروه ۴۰۰ توانست سطح MDA بافت ریه را کاهش دهد.  $\# p < 0.001$  میزان MDA در مقایسه با گروه PQ در مقایسه با گروه RC 400  $p < 0.01$  \*\*.

#### اثر نسترن کوهی بر میزان میلوبراکسیداز (MPO) بافت ریه

تزریق پاراکوات ( $20\text{ mg/kg}$ ) به موش‌ها توانست میزان MPO موجود در بافت ریه موش را به میزان

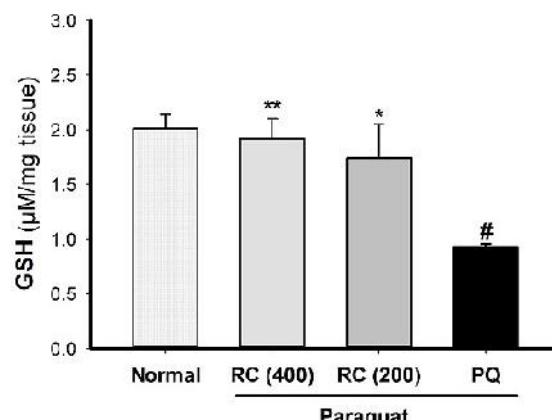


شکل ۴. میزان CAT موجود در بافت ریه در موش‌های گروه کنترل نرمال، پاراکوات (PQ)، نسترن کوهی با دوز ۴۰۰ mg/kg (RC 400) و نسترن کوهی با دوز ۲۰۰ mg/kg (RC 200). تزریق سم پاراکوات با دوز ۲۰ mg/kg باعث کاهش معنی دار سطح CAT گردید و درمان با RC 400 و RC 200 در هر دو گروه ۲۰۰ و ۲۰۰ mg/kg باعث کاهش معنی دار سطح CAT گردید. گروه PQ در مقایسه با گروه نرمال،  $p < 0.001$ . گروه‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ در مقایسه با گروه PQ  $p < 0.01$ . \*\*\* $p < 0.001$  # $p < 0.001$ .

### بحث

آسیب ریوی جدی‌ترین عارضه مسمومیت با سم پاراکوات می‌باشد که در بسیاری از موارد می‌تواند منجر به مرگ بیمار گردد. پاراکوات اثرات سمی و خطرناک خود را از طریق واکنش‌های اکسیداسیون و متعاقب آن واکنش‌های التهابی بروز می‌دهد. پاراکوات از نظر ساختاری یک مولکول دارای آمونیوم چهارظرفیتی می‌باشد که در داخل سلول‌ها با مولکول اکسیژن واکنش داده و باعث تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS)<sup>۱</sup> شامل آنیون سوپراکساید ( $O_2^-$ )، هیدروژن پراکساید ( $H_2O_2$ )، رادیکال آزاد (ONOO<sup>-</sup>) و هیدروکسیل (HO) و پراکسی نیتریت (NO<sup>-</sup>) می‌شود. از نظر واکنش پذیری این رادیکال‌های سمی بسیار فعال بوده و می‌توانند با بسیاری از ترکیبات سلول واکنش داده و در نتیجه به قسمت‌های مختلف سلول آسیب بزنند [۱۸.۵]. رادیکال‌های آزاد می‌توانند با اسیدهای چرب غیر اشباع و لیپوپروتئین‌های موجود

موش‌های دریافت کننده نسترن کوهی با دوز ۲۰۰ mg/kg بالاتری نسبت به گروه پاراکوات (PQ) بودند که از نظر آماری معنادار بود ( $p = 0.037$ ).



شکل ۳. میزان GSH موجود در بافت ریه در موش‌های گروه کنترل نرمال، پاراکوات (PQ)، نسترن کوهی با دوز ۴۰۰ mg/kg (RC 400) و نسترن کوهی با دوز ۲۰۰ mg/kg (RC 200). تزریق سم پاراکوات با دوز ۲۰ mg/kg باعث کاهش معنی دار سطح GSH گردید و درمان با RC 400 و RC 200 در هر دو گروه ۲۰۰ و ۲۰۰ mg/kg باعث کاهش معنی دار سطح GSH گردید. گروه PQ در مقایسه با گروه نرمال،  $p < 0.01$ . \* $p < 0.05$ . \*\* $p < 0.01$ . # $p < 0.001$ .

اثر نسترن کوهی بر میزان کاتالاز (CAT) (بافت ریه) اندازه گیری فعالیت آنزیم CAT بافت ریه موش‌ها نشان داد که پاراکوات باعث کاهش بارز CAT نسبت به گروه کنترل نرمال می‌گردد ( $p < 0.001$ ) (شکل ۴). درمان موش‌ها با عصاره نسترن کوهی در هر دو دوز ۴۰۰ و ۲۰۰ mg/kg به مدت چهار روز توانست سطح آنزیم CAT را در بافت ریه بطور کاملاً معناداری افزایش دهد ( $p < 0.001$ ).

<sup>۱</sup> Reactive Oxygen Radicals = ROS

آنزیم پراکسیداز است که در گرانول‌های نوتروفیل‌ها وجود دارد و به محض فعال شدن نوتروفیل‌ها در اثر محرك‌های التهابی، MPO آزاد می‌گردد. این آنزیم می‌تواند باعث تولید هیپوکلروس اسید (HOCl) شود که ماده اخیر یک اکسیدانته قوی بوده و می‌تواند باعث آسیب بافتی در طی روند اکسیداتیو استرس و التهاب گردد. نتایج مطالعات نشان داده که میزان MPO در بافت‌های مختلف در طی مسمومیت با سم پاراکوات افزایش می‌یابد [۲۲.۲۳]. در مطالعه حاضر نیز اندازه‌گیری سطح MPO در بافت ریه موش‌هایی که در معرض پاراکوات بوده اند نشان داد که میزان آن افزایش یافته است. درمان این موش‌ها با عصاره MPO نسترن کوهی توانست باعث کاهش سطح گردد. این یافته ثابت می‌نماید که گیاه نسترن کوهی دارای اثرات ضد اینفلتراسیون نوتروفیلی بوده و به نوعی خاصیت ضد التهابی از خود نشان می‌دهد. همچنین می‌توان این یافته را با نتیجه یک مطالعه دیگر که بر روی نوتروفیل‌های ایزووله شده انجام گرفته است، مقایسه کرد. در این مطالعه ثابت شده است که میوه نسترن کوهی که غنی از پرو-آنتوسیانیدین‌ها و فلاونوئیدها می‌باشد، توانست محصول فعالیت بیش از حد نوتروفیل‌ها یعنی تولید بیش از حد رادیکال‌های واکنش پذیر اکسیژن را کاهش دهد [۱۵].

مهمترین سیستم دفاعی و آنتی اکسیدانی بدن برای حذف ROS و حمایت سلول‌ها در برابر آسیب ناشی آنها، عبارتند از گلوتاتیون احیا شده (GSH) و آنزیم CAT (CAT)، می‌توان میزان فعالیت GSH و کاتالاز (CAT) را به عنوان معیار تعادل اکسیدان-آنتی اکسیدان یک بافت در نظر گرفت. گلوتاتیون یک پیتید دارای گروه تیول در ساختار خود می‌باشد و مهمترین آنتی اکسیدان داخل سلولی محسوب می‌گردد. در طی فرایند اکسیداتیو، GSH تبدیل به فرم گلوتاتیون دی‌سولفاتید GSSG شده و در اثر این تبدیل رادیکال‌های آزاد را خنثی می‌کند. گلوتاتیون نقش مهمی در حفاظت از DNA سلول‌ها، خنثی کردن

در غشای سلول‌های بدن واکنش داده و باعث واکنشی بنام Lipid Peroxidation گردد. اکسیداسیون لیپیدی سلول‌ها توسط پاراکوات مهمترین مرحله از سمیت پاراکوات در پستانداران محسوب می‌شود [۳]. مهمترین فاکتور بیوشیمیایی فرایند لیپید پراکسیداسیون، ترکیبی بنام مالون دی‌آلدهاید (MDA) می‌باشد. ثابت شده است که پاراکوات می‌تواند باعث افزایش میزان MDA در بسیاری از بافت‌ها از جمله در ریه گردد [۱۹.۵.۴]. مطالعه حاضر نشان داد که پاراکوات باعث افزایش سطح MDA در بافت ریه شده است. درمان موش‌های در معرض پاراکوات بوسیله عصاره نسترن کوهی توانست میزان MDA ناشی از پاراکوات را بطور قابل توجهی کاهش دهد. با توجه به اینکه میزان MDA میان میزان حمله ROS به سلول‌ها می‌باشد بنابراین این یافته نشان‌دهنده اثر آنتی اکسیدانی قوی گیاه نسترن کوهی می‌باشد. به عبارت دیگر این گیاه دارای این قابلیت است که غشای سلول‌های ریوی را در مقابل آسیب لیپید پراکسیداسیون ناشی از پاراکوات حفاظت نماید. نتیجه گیری فوق با یافته مطالعات دیگران که کاهش میزان MDA در اثر مصرف عصاره گیاه نسترن کوهی را نشان داده اند، هماهنگ می‌باشد. در این مطالعات ثابت شده است که این گیاه بطور قابل توجهی میزان آسیب لیپید پراکسیداسیون به سلول‌ها را کاهش می‌دهد [۲۱.۲۰].

مطالعات نشان داده‌اند که فرایند التهاب در پیشرفت آسیب ریوی ناشی از پاراکوات دارای نقش مهمی می‌باشد. در طی التهاب بافت ریه، نوتروفیل‌های فعال شده از سیستم جریان خون ریه وارد فضای بین سلولی و آلورول‌های ریوی شده<sup>۱</sup> و با آزادسازی مדיاتورهای التهابی و نیز ROS باعث تشدید آسیب ریوی بیمار می‌شوند. یکی از مهمترین مارکرهای بیوشیمیایی اینفلتراسیون نوتروفیل‌ها، میلو پراکسیداز (MPO) می‌باشد. میلو پراکسیداز در واقع یک نوع

<sup>۱</sup> Neutrophil Infiltration

عصاره گیاه نسترن کوهی را نشان داده اند، هماهنگ می باشد [۲۱، ۲۵].

### نتیجه گیری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می دهد که عصاره میوه نسترن کوهی می تواند آسیب ریوی ناشی از سم پاراکوات را کاهش دهد. به نظر می آید گیاه نسترن کوهی با افزایش آنتی اکسیدان های سلولی (GSH و CAT) کاهش فرایند لپید پراکسیداسیون (MDA) و اینفیلتراسیون نوتروفیل ها (MPO) توانست سلول های ریوی را در برابر پاراکوات حفاظت نماید. با توجه به محدودیت های مطالعه حاضر، پیشنهاد می گردد برای اثبات کامل مکانیسم اثر درمانی نسترن کوهی در مقابل آسیب ریوی پاراکوات، مطالعات پاتولوژیک بافت ریه و بررسی های فاکتورهای التهابی نیز در مطالعات آینده مد نظر قرار گیرد. در نهایت با توجه به مطالعات دیگران و پژوهش حاضر می توان توصیه نمود که میوه نسترن کوهی نه تنها به عنوان ماده غذایی بلکه به عنوان یک گیاه دارویی می تواند در اختلالات متعدد از جمله مسمومیت خفیف با سم پاراکوات استفاده گردد.

سموم و متابولیزه کردن داروها دارد. کاتالاز یک آنزیم درون سلولی مهم می باشد و هیدروژن پراکساید را که خاصیت اکسید کنندگی بسیار قوی دارد شکسته و تبدیل به مولکول های آب و اکسیژن می نماید. بنابراین فعالیت GSH و CAT می تواند از فرایندهای تخریبی اکسیداتیو مثل لپید پراکسیداسیون در بافت های مختلف جلوگیری نماید [۴]. گزارش شده است که میزان GSH و CAT در بافت ها در طی مسمومیت با پاراکوات کاهش و در طی درمان افزایش می یابد [۲۴، ۶، ۱۹]. در مطالعه حاضر نیز پاراکوات باعث کاهش سطوح GSH و CAT در بافت ریه گردید. علت کاهش آنها را می توان چنین توجیه نمود که آنتی اکسیدان های فوق برای خنثی سازی رادیکال های آزاد و ترکیبات سمی ناشی از پاراکوات مصرف شده اند. درمان موش ها با عصاره نسترن کوهی نشان داد که سطوح GSH و CAT بافت ریه نسبت به گروه پاراکوات افزایش یافته است. بنابراین می توان نتیجه گرفت که گیاه نسترن کوهی می تواند توانایی آنتی اکسیدانی سلول ها را افزایش داده و تعادل اکسیدان - آنتی اکسیدان را بهبود بخشد. نتیجه گیری فوق با یافته مطالعات دیگر که افزایش سطوح GSH و CAT در اثر مصرف

### References

- 1- Yanling W, Duo G, Zuojun G, Zhongqiang S, Yankai W, Shan L, et al. Radiomics nomogram analyses for differentiating pneumonia and acute paraquat lung injury. *Sci Rep.* 2019 Oct;9(1):15029.
- 2- Sittipunt C. Paraquat poisoning. *Respir Care.* 2005 Mar;50(3):383-5.
- 3- Gawarammana IB, Buckley NA. Medical management of paraquat ingestion. *Br J Clin Pharmacol.* 2011 Nov;72(5):745-57.
- 4- Amirshahrokhi K, Khalili AR. Carvedilol attenuates paraquat-induced lung injury by inhibition of proinflammatory cytokines, chemokine MCP-1, NF- B activation and oxidative stress mediators. *Cytokine.* 2016 Dec;88:144-153.
- 5- Amirshahrokhi K, Bohlooli S. Effect of methylsulfonylmethane on paraquat-induced acute lung and liver injury in mice. *Inflammation.* 2013 Oct;36(5):1111-21.
- 6- Novaes RD, Gonçalves RV, Cupertino MC, Marques DC, Rosa DD, Peluzio Mdo C, et al. Bark extract of *Bathysa cuspidata* attenuates extra-pulmonary acute lung injury induced by paraquat and reduces mortality in rats. *Int J Exp Pathol.* 2012 Jun;93(3):225-33.
- 7- Schapochnik A, da Silva MR, Leal MP, Esteves J, Hebeda CB, Sandri S, et al. Vitamin D treatment abrogates the inflammatory response in paraquat-induced lung fibrosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2018 Sep;355:60-67.

- 8- Jiang Y, Yang W, Gui S. Procyanidin B2 protects rats from paraquat-induced acute lung injury by inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Immunobiology*. 2018 Oct;223(10):555-561.
- 9- Li GP, Yang H, Zong SB, Liu Q, Li L, Xu ZL, et al. Diterpene ginkgolides meglumine injection protects against paraquat-induced lung injury and pulmonary fibrosis in rats. *Biomed Pharmacother*. 2018 Mar;99:746-754.
- 10- Amirshahrokhi K. Protective effect of *Rosa Canina* against gastric ulcer induced by NSAIDs. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences*, 2019 Jun;19(2) 216-226. [Full text in Persian]
- 11- Gruenwald J, Uebelhack R, Moré MI. *Rosa canina* - Rose hip pharmacological ingredients and molecular mechanics counteracting osteoarthritis - A systematic review. *Phytomedicine*. 2019 Jul;60:152958.
- 12- Javanmard M, Asadi-Gharneh HA, Nikneshan P. Characterization of biochemical traits of dog rose (*Rosa canina* L.) ecotypes in the central part of Iran. *Nat Prod Res*. 2018 Jul;32(14):1738-1743.
- 13- Kikuchi H, Kogure S, Arai R, Saino K, Ohkubo A, Tsuda T, et al. Rosehip inhibits xanthine oxidase activity and reduces serum urate levels in a mouse model of hyperuricemia. *Biomed Rep*. 2017 May;6(5):539-544.
- 14- Taghizadeh M, Rashidi AA, Taherian AA, Vakili Z, Sajad Sajadian M, Ghardashi M. Antidiabetic and antihyperlipidemic effects of ethanol extract of *Rosa canina* L. fruit on diabetic rats: An experimental study with histopathological evaluations. *J Evid Based Complementary Altern Med*. 2016 Oct;21(4):NP25-30.
15. Daels-Rakotoarison DA, Gressier B, Trotin F, Brunet C, Luyckx M, Dine T, et al. Effects of *Rosa canina* fruit extract on neutrophil respiratory burst. *Phytother Res*. 2002 Mar;16(2):157-61.
16. Jiménez S, Gascón S, Luquin A, Laguna M, Ancín-Azpilicueta C, Rodríguez-Yoldi MJ. *Rosa canina* extracts have antiproliferative and antioxidant effects on Caco-2 human coloncancer. *PLoS One*. 2016 Jul 28;11(7):e0159136.
- 17- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984 105: 121–126.
- 18- Morán, JM, Ortiz-Ortiz MA, Ruiz-Mesa LM, Fuentes JM. Nitric oxide in paraquat-mediated toxicity: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2010;24: 402–409.
- 19- El-Aarag B, Magdy M, AlAjmi MF, Khalifa SAM, El-Seedi HR. Melittin exerts beneficial effects on paraquat-induced lung injuries in mice by modifying oxidative stress and apoptosis. *Molecules*. 2019 Apr 16;24(8). pii: E1498.
- 20- Sadeghi H, Hosseinzadeh S, Akbartabar Touri M, Ghavamzadeh M, Jafari Barmak M, Sayahi M, et al. Hepatoprotective effect of Rosa canina fruit extract against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rat. *Avicenna J Phytomed*. 2016 Mar-Apr;6(2):181-8.
- 21- Sadigh-Eteghad S, Tayefi-Nasrabadi H, Aghdam Z, Zarredar H, Shafehbandi D, Khayyat L, et al. *Rosa canina* L. Fruit hydro-alcoholic extract effects on some immunological and biochemical parameters in rats. *Bioimpacts*. 2011;1(4):219-24.
- 22- Dinis-Oliveira RJ, Sousa C, Remião F, Duarte JA, Ferreira R, Sánchez Navarro A, et al. Sodium salicylate prevents paraquat-induced apoptosis in the rat lung. *Free Radic. Biol. Med.* 2007 Jul 1;43(1):48-61.
- 23- Zhi Q, Sun H, Qian X, Yang L. Edaravone, a novel antidote against lung injury and pulmonary fibrosis induced by paraquat? *International Immunopharmacology*. 2011 Jan;11(1): 96–102.
- 24- Rodrigues da Silva M, Schapochnik A, Peres Leal M, Esteves J, Bichels Hebeda C, Sandri S, et al. Beneficial effects of ascorbic acid to treat lung fibrosis induced by paraquat. *PLoS One*. 2018 Nov 5;13(11):e0205535.
- 25- Soualeh N, Stiévenard A, Baudelaire E, Soulimani R, Bouayed J. Improvement of cytoprotective and antioxidant activity of *Rosa canina* L. and *Salix alba* L. by controlled differential sieving process against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in mouse primary splenocytes. *Int J Vitam Nutr Res*. 2017 May;87(3-4):191-200.