

تأثیر اسانس نعنا بر روی استرس اکسیداتیو و بیان ژن COX-2 در پیشگیری از سپسیس

ابوالفضل دادخواه^{*}، فائزه فاطمی^۲، محمدرضا محمدی ملایری^۳، آزاده رسولی^۴ و محمد حسن کاروین آشتیانی^۵^۱ ایران، قم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، دانشکده پزشکی، گروه پزشکی^۲ ایران، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده مواد و سوخت هسته‌ای^۳ ایران، گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرمسار، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی^۴ ایران، تهران، دانشگاه پیام نور، واحد تهران شرق، گروه بیوشیمی^۵ ایران، سبزوار، دانشگاه حکیم سبزواری، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۱۰

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۲۲



چکیده

نعناع با نام علمی *Mentha Spicata* یکی از گیاهان بومی ایران با اثرات درمانی بسیار است. در این تحقیق، تأثیر اسانس نعنا بر روی پارامترهای دخیل در آسیب اکسیداتیو و بیان ژن التهابی COX-2 بافت ریه در مدل تجربی التهابی CLP در رت مورد مطالعه قرار گرفته است. رت‌ها به پنج گروه کنترل منفی (Laparatomy)، CLP و گروه‌های تیمار با اسانس نعنا (۱۰۰ و ۵۰) و داروی ایندومتاسین تقسیم شدند. سپس، ۲۴ ساعت پس از جراحی، سطح فاکتورهای نظیر GSH، LP، GST، FRAP، MPO، PGE2 و بیان ژن COX-2 در پلاسما و بافت ریه اندازه‌گیری شد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که سپسیس موجب کاهش FRAP و GSH و افزایش میزان LP، MPO، PGE2 و بیان ژن COX-2 می‌گردد، ولی بر روی آنزیم GST اثری ندارد. تیمار حیوانات با اسانس نعنا به اندازه ایندومتاسین، در تعدیل سطح این پارامترها موثر بوده است، بطوریکه سبب افزایش میزان FRAP و GSH و کاهش میزان LP، MPO، PGE2 و بیان ژن COX-2 می‌گردد. همچنین مطالعات پاتولوژی نشان می‌دهد که سپسیس منجر به ایجاد آسیب‌هایی در بافت ریه شده که این آسیب‌ها در اثر تیمار با اسانس نعنا کاهش یافته‌اند. نتیجه‌گیری: سپسیس موجب آسیب اکسیداتیو بافت ریه شده و استفاده از اسانس نعنا با تأثیر بر روی پارامترهای استرس اکسیداتیو و آنتی‌اکسیدانی می‌تواند در جلوگیری و بهبود این آسیب‌ها موثر باشد.

واژه‌های کلیدی: اسانس نعنا، CLP، استرس اکسیداتیو، ضد التهاب، سپسیس

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۲۴۹۰۶۲۰، پست الکترونیکی: dadkhah_bio@yahoo.com

مقدمه

(۲۷، ۲۸). همچنین، در طب سنتی غالباً از دمکرده برگ‌های آن به عنوان مدر (۱۹)، تسریع‌کننده عمل هضم، رفع آسم، اسپاسم، درد معده، سردرد، سرماخوردگی و سرفه و همچنین به صورت استعمال خارجی برای درمان زخم‌ها و غدد متورم (۴۹) و نیز برای درمان برونشیت، نفخ شکم، بی‌اشتهایی، کولیت و اختلالات روده‌ای مانند تهوع، سوءهاضمه و اسهال (۲۹) و به عنوان آنتی‌اکسیدان (۳۵)،

امروزه مصرف گیاهان دارویی با هدف دستیابی به داروهای کم‌خطر و با حداقل عوارض جانبی، روز به روز در حال افزایش است و این به دلیل به اثبات رسیدن اثر بخشی بسیاری از این مواد در مجامع علمی و مقبولیت آن در اکثر جوامع بشری است (۴۷). گیاه نعنا (*Mentha Spicata*) یکی از این گیاهان دارویی می‌باشد که در طب سنتی ایران برای درمان معده درد و اختلالات روده استفاده می‌شود

ضدقارچ (۴۹)، ضد باکتری (۴۱، ۴۲) و ضد انقباض و تشنج (۱۹) استفاده می‌شود.

سپسیس یا عفونت خون، بیماری بالینی تهدید کننده ای است که هر ساله ۲۷ میلیون نفر در سراسر جهان را درگیر می‌کند. بروز سپسیس هنوز هم در حال افزایش است، به طوریکه در ۱۰-۳۰٪ از بخش‌های مراقبت‌های ویژه (ICU) رخ می‌دهد (۳۹، ۳۴، ۳۳). شوک سپتیک (مرحله شدید سپسیس) با مرگ و میر بالای ۴۰٪ همراه می‌باشد (۳۷). پاسخ ایمنی پس از سپسیس، منجر به پاسخ شدید التهابی و در نهایت اختلال و شوک ارگان‌ها می‌شود. التهاب فرایندی است که توسط عوامل مختلف بیولوژیکی شروع گردیده و نه تنها مستقیماً با فعال‌سازی سیستم ایمنی بلکه با واسطه سیکلوآکسیژناز - 2 (COX-2) نیز در ایجاد بیماری دخالت می‌کند (۴۵، ۳۲). علاوه بر نقش فاکتورهای التهابی در پاتوژنز بیماری سپسیس، COX-2 محصول آن PGE-2 مسئول بیشتر عوارض ناشی از سپسیس می‌باشند. در جراحی و سپسیس، پروستاگلاندین‌های تولید شده توسط COX-2 از ماکروفاژها آزاد شده و نقش بسیار مهمی را در پاسخ ایمنی ایفا می‌کنند (۳۲). سپسیس تقریباً به طور مستقیم یا غیر مستقیم عملکرد تمام انواع سلول‌های ایمنی را مختل می‌کند (۲۴، ۲۵). شدت و مدت زمان مرحله پاسخ ایمنی سبب افزایش عفونت‌های بیمارستانی و مرگ و میر ناشی از آن می‌گردد (۲۴، ۲۵). علاوه بر این، یکی دیگر از عوارض و مشکلات ناشی از سپسیس به هم خوردن تعادل سیستم استرس اکسیداتیو بدن است (۷). استرس اکسیداتیو زمانی ایجاد می‌شود که تعادل بین تشکیل گونه‌های اکسید کننده و حذف آنها توسط ترکیبات آنتی‌اکسیدان در اثر تولید زیاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن ROS (Reactive Oxygen Species) و یا تضعیف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مختل شود (۲۲). این فرآیند‌ها در سپسیس منجر به آسیب اکسیداتیو بسیاری از بافت‌های بدن از جمله قلب، کلیه، کبد و ریه و از کارافتادن بافت‌ها و در

نهایت مرگ می‌گردد (۵۰). به همین دلیل، با توجه به نقش مهم و اصلی استرس اکسیداتیو در عوارض ناشی از سپسیس، استفاده از آنتی‌اکسیدانها و عناصر طبیعی در کاهش این عوارض، مورد توجه می‌باشد (۵۰).

با توجه به نرخ بالای مرگ و میر مرتبط با سپسیس و به منظور دستیابی به داروهای کم‌خطر، برای اولین بار در این مطالعه اثر اسانس نعنا به عنوان یک گیاه بومی ایرانی در درمان بیماری ریوی ناشی از سپسیس مورد بررسی قرار گرفته است. بنابراین هدف از این مطالعه، ارزیابی اثر محافظتی اسانس نعنا بر آسیب ریه ناشی از سپسیس در روش CLP در موش‌های صحرایی با در نظر گرفتن پارامترهای ضروری استرس اکسیداتیو/آنتی‌اکسیدان و بیان ژن COX-2 می‌باشد.

مواد و روشها

تهیه اسانس نعنا: اسانس نعنا از شرکت باریج اسانس تهیه گردیده (Batch No. 3138-031-93/8(707051); Sample Serial No.:BE930347) و به روش GC-MS (Gas Chromatography - Mass Spectroscopy) آنالیز گردید (۱۷-۱۵).

آنالیز اسانس نعنا با استفاده از GC-MS: تجزیه اسانس با دستگاه GC-MS مربوط به بخش تحقیقات گیاهان دارویی در موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع انجام شد و شناسایی ترکیبات توسط متخصصین مربوطه در موسسه انجام گردید. در این روش، اسانس نعنا به وسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC Trace Thermo Finnigan) مجهز به آشکارساز یونی شعله‌ای، جداسازی شد. آنالیز نمونه‌ها بر اساس نرم‌افزار Euro Chrom 2000 از شرکت KNAUER توسط روش نرم‌الیزه کردن سطح و با استفاده از ستون سیلیکای مذاب TR-5 (۰/۲۵ μ m ضخامت فیلم، ۳۰m \times ۰/۲۵ mm) و دتکتور اسپکترومترجرمی (Dual Stage Quadrupole) Thermo Trace DSQ، برنامه

ایجاد گردید. سپس، سکوم خارج شده و بخش سکوم تا زیر دریچه ایلئوسکال بخیه زده شده و در سکوم آنها ۲ سوراخ توسط نیدل G20 ایجاد گردید. بعد از این مرحله، روده به داخل محفظه شکمی برگردانده شده و پوست و صفاق بخیه زده شد. رت‌ها ۲۴ ساعت پس از جراحی CLP بیهوش شدند و از قلب آنها خونگیری شد. در مرحله بعدی، حیوانات کشته شده و بافت ریه آنها به منظور بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی و بیوشیمی جدا گردید.

اندازه‌گیری سطح فاکتورهای دخیل در استرس اکسیداتیو در بافت ریه و پلاسما

تهیه هموژن بافت ریه: برای تهیه هموژن ۲۰٪ (W/V) از بافت ریه، ۰/۴ گرم از بافت در یک استوانه مدرج مناسب قرار داده شد و روی آن PBS سرد (pH=۷/۳) تا حجم ۲ میلی لیتر ریخته شد. سپس، مخلوط فوق داخل لوله مخصوص دستگاه هموژنایزر ریخته شده و محتویات لوله با حدود ۵ تا ۷ بار بالا و پایین کردن هموژن گردید.

اندازه‌گیری سطح MDA در هموژن بافت ریه: اساس اندازه‌گیری MDA این است که TBA با MDA ترکیب شده و محصول نارنجی رنگی ایجاد می‌کند که در ۵۳۵ نانومتر جذب دارد. غلظت MDA با اندازه‌گیری میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و از روی ضریب خاموشی آن ($1/56 \times 10^5 \text{ L/cm.mmol}$) محاسبه گردید (۵۲).

اندازه‌گیری سطح گلوتاتیون احیا در هموژن بافت ریه: GSH با استفاده از معرف Ellman's و براساس روش Seldak و Limsay (۱۹۶۸) اندازه‌گیری شد (۴۳). در این روش میزان جذب کمپلکس گلوتاتیون با CDNB در طول موج ۴۱۲ نانومتر اندازه‌گیری شده و بر اساس منحنی استاندارد میزان آن محاسبه گردید (۴۳).

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز MPO در بافت ریه: فعالیت MPO با کمی تغییر مطابق روش

دمایی $280-50^\circ\text{C}$ در میزان 10°C/min ، دمای انژکتوری 270°C ، دمای آشکارساز 230°C و گاز حامل هلیوم (۹۹/۹۹٪) انجام گرفت.

دستگاه GC/MS شامل گروماتوگراف گازی GC Trace Thermo Finnigan مجهز به اتوسمپلر Thermo AS 3000 بوده و ستون مورد استفاده نیز همانند ستون GC با شرایط فوق‌الذکر می‌باشد. اجزاء و ترکیبات اسانس‌ها توسط مقایسه طیف‌سنجی جرمی با استانداردهای موجود شناسایی شدند. شناسایی ترکیبات مجهول با مقایسه شاخص‌های بازداري آنها با ترکیبات استاندارد تأیید گردیدند.

تیمار حیوانات و نمونه‌گیری: در این تحقیق، از ۱۳۰ سر رت نر بالغ با وزن متوسط ۱۰۰ گرم استفاده گردید که از مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی از انستیتوپاستور ایران خریداری شدند. غذای حیوانات از کارخانجات فرآورده‌های غذایی تهران تهیه شده که به صورت Pellet با فرمول استاندارد بود. حیوانات بالغ نیز دسترسی آزاد به غذا و آب آشامیدنی از طریق بطری داشتند. حیوانات به ۵ گروه تقسیم شدند: ۱- گروه کنترل منفی: که حیوانات حلال اسانس نعنا (DMSO) به مدت ۲ هفته به صورت خوراکی مصرف کرده و سپس در روز پانزدهم جراحی لاپاراتومی انجام گردید. ۲- گروه CLP: که همانند گروه کنترل منفی تیمار شدند و سپس در روز پانزدهم جراحی CLP انجام گردید. ۳ و ۴- گروه‌های تیمار: که اسانس نعنا در دزهای ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg bw به صورت خوراکی، روزانه به مدت دو هفته دریافت کردند و سپس در روز پانزدهم جراحی CLP انجام گردید. ۵- گروه کنترل مثبت: که با داروی ضد التهابی ایندومتاسین (2 mg/kg bw)، به مدت دو هفته تیمار شده و سپس در روز پانزدهم جراحی CLP انجام گردید.

جراحی CLP: در روش CLP، پس از بیهوش کردن رت‌ها، در دیواره شکمی آنها به اندازه ۲ سانتی متر برش

میزان معینی از RNA برای ساخت تمامی cDNAها استفاده گردید. برای ساخت cDNA از RNA استخراج شده، از کیت شرکت تاکارا (Takara bio Inc, Japan) استفاده گردید.

انجام واکنش PCR: به منظور تأیید انجام مراحل قبل، واکنش PCR برای ژن مورد نظر انجام شد، میزان و غلظت مواد مورد استفاده برای حجم ۲۵ میکرو لیتری و برنامه چرخه حرارتی واکنش PCR در جدول های ۱ و ۲، ذکر شده است. سپس محصول حاصل بر روی ژل آگارز ۲/۵٪ بارگذاری گردید. به منظور انجام واکنش PCR و Real time PCR، از پرایمرهای اختصاصی ژن COX-2 و GAPDH استفاده شد.

جدول ۱- میزان و غلظت مواد مورد استفاده جهت تهیه مخلوط واکنش برای PCR به حجم نهایی ۲۵ μ l

غلظت	ماده مصرفی
۲/۵ μ l	۱۰X بافر
۰/۷۵ μ l	MgCl ₂ (50Mm each)
۰/۵ μ l	(10mM each) dNTP
۱ μ l	Forward primer (10 μ M each)
۱ μ l	(10 μ M each) Reverse perimer
۰/۳ μ l	(5u/ μ l) Taq DNA polymerase
۵۰ ng	Template DNA
to ۲۵ μ l	Nuclease-free water
۲۵ μ l	Total volume

جدول ۲- برنامه حرارتی PCR مورد استفاده

مرحله	عمل انجام شده در این مرحله	درجه حرارت	مدت زمان	تعداد سیکل
مرحله اول	Initial denaturation	۹۵ درجه سانتی‌گراد	۵ دقیقه	۱
مرحله دوم	Denaturation	۹۵ درجه سانتی‌گراد	۲۰ ثانیه	۳۵
	Annealing	۶۰ درجه سانتی‌گراد	۲۰ ثانیه	
	Extention	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۲۰ ثانیه	
مرحله سوم	Final Extention	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۵ دقیقه	۱

Hillegas و همکاران انجام شد (۲۳). در این روش تغییر جذب ناشی از مصرف H₂O₂ توسط آنزیم میلوپراکسیداز در طول موج ۴۶۰ نانومتر اندازه گیری شد (۲۳).

اندازه گیری فعالیت آنزیم گلوکاتایون s - ترانسفراز GST در هموزن بافت ریه: فعالیت این آنزیم با استفاده از سوبسترای CDNB و تغییر جذب آن در طول موج ۳۶۰ نانومتر اندازه گیری شد (۱۰).

اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی توتال پلاسما: ظرفیت آنتی اکسیدانی توتال پلاسما توسط تست FRAP و با استفاده از سوبسترای TPTZ در طول موج ۵۹۳ نانومتر اندازه گیری شد (۹).

اندازه گیری غلظت پروستاگلاندین E2 (PGE2) در پلاسما: غلظت PGE₂ بر اساس روش ELISA و با استفاده از کیت ELISA (Assay Desighs Co ;U.S.A) اندازه گیری شد.

بررسی بیان ژن COX-2 در سطح mRNA در بافت ریه

استخراج RNA و ساخت cDNA: به منظور استخراج RNA از کیت استخراج RNA (BioBasic Inc, Canada) استفاده شد. سپس، به منظور حذف DNA از RNA استخراج شده، از آنزیم DNase شرکت Thermo Scientific استفاده شد. به منظور یکسان بودن غلظت RNA مصرفی در ساخت cDNA، غلظت RNA موجود در نمونه‌های تیمار شده با DNase، توسط دستگاه نانودراپ (NanoDrop 2000) خوانده شد. در نهایت،

جدول ۳- توالی پرایمرهای مورد استفاده

primers	Sequence (5' → 3')	Tm	Product Length
COX2 forward	ACCTCTGCGATGCTCTTC	50.3 °C	188 bp
COX2 reverse	AGGAATCTCGGCGTAGTAC	51.1 °C	
GAPDH forward	TGCCAGCCTCGTTCATAG	53.2 °C	197 bp
GAPDH reverse	ACTGTGCCGTTGAACTGC	51.1 °C	

بررسی هیستوپاتولوژی بافت ریه: نمونه های بافتی ریه پس از جدا سازی در محلول بافر فرمالین ۱۰ درصد تثبیت گردید و در ادامه، به روش متداول از آنها قالب های پارافینی تهیه گردید و با دستگاه میکروتوم به ضخامت ۴ میکرون برش داده شد. نهایتاً برش های بافتی با هماتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شده و با میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی هیستوپاتولوژی قرار گرفتند.

جدول ۴ - چرخه حرارتی واکنش Real-Time PCR

مرحله	دما	زمان	تعداد سیکل
۱	۹۵ °C	۲'	۱
۲	۹۵ °C	۱۵"	۴۰
	۶۰ °C	۲۰"	
	۷۲ °C	۲۰"	
۳	۵۷-۹۵ °C	۱۵"	۱

همچنین، برای ارزیابی میزان تأثیر تیمارها، آسیب های بافتی به روش زیر مورد تحلیل کمی قرار گرفتند. نمونه های هیستوپاتولوژی از لحاظ شاخص های پرخونی، ادم التهابی بافت های بینابینی و شدت ارتشاح نوتروفیل در بافت های بینابینی ریه مورد ارزیابی قرار گرفته و به روش زیر امتیاز دهی شدند. شاخص شدت آسیب بافتی و میانگین تعداد نوتروفیل های نفوذ یافته و حاشیه نشین شده، از طریق شمارش تعداد سلول های التهابی چند هسته‌ای (پلی مورفونوکلیر) (نوتروفیل) در ده فیلد (میدان) میکروسکوپی و محاسبه میانگین آنها برآورد گردید.

بدین منظور، پرایمر مورد نظر با استفاده از اطلاعات موجود در بانک ژن NCBI طراحی شده و پس از اطمینان حاصل پیدا کردن، پرایمرهای مورد نظر سنتز شدند. جدول ۳ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده را نشان می دهد.

انجام واکنش Real time PCR: واکنش Real time PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی و کیت مخصوص QuantiNova SYBR Green PCR Kit انجام پذیرفت. این کیت حاوی تمام مواد لازم برای انجام واکنش PCR (آنزیم Taq، بافر همراه با $MgCl_2$ و dNTPs) و رنگ سایبرگرین می باشد که به عنوان مستر میکس مورد استفاده قرار می‌گیرد. هر واکنش Real time PCR (حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر) حاوی ۵ μl مسترمیکس، ۰/۴ μl پرایمرهای Forward و Reverse (جدول ۱)، ۰/۵ μl cDNA، و ۳/۹ μl آب عاری از Nuclease می‌باشد. پس از مخلوط کردن مواد مذکور، به منظور اطمینان از صحت انجام واکنش، نمونه‌های حاوی ژن مورد آزمایش (COX-2) و نمونه حاوی ژن کنترل داخلی (GAPDH) در پلیت‌ها به صورت سه تایی ریخته شد. همچنین، برای اطمینان حاصل کردن از عدم آلودگی و خطاهای حاصل از آن، برای هر ژن سه کنترل منفی در نظر گرفته شد که میزان الگوی مورد نظر (cDNA) با آب مقطر جایگزین گردید. در نهایت، از چرخه حرارتی ذکر شده در جدول ۴ استفاده شده و به منظور محاسبه میزان تغییرات بیان ژن COX-2 از روش $\Delta\Delta CT$ استفاده گردید.

شده با داروی ضد التهابی ایندومتاسین نیز دیده شد ($P < 0.05$). سطح گلوکوتایون و FRAP به ترتیب در ریه و پلاسما رت‌های مبتلا به سپسیس (گروه CLP) نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($P < 0.05$). تیمار رت‌های سپتیکی با اسانس نعنا با هر دو دز باعث افزایش معنی‌دار میزان گلوکوتایون گردید که این افزایش در گروه تیمار شده با ایندومتاسین نیز دیده شد ($P < 0.05$). در فعالیت آنزیم GST در بافت ریه در گروه‌های CLP و گروه‌های تیمار تغییر یافته مشاهده نگردید ($P > 0.05$) (جدول ۶).

جدول ۵- ترکیبات شیمیایی اسانس نعنا

No.	Compound	RI	%
۱	α -Pinene	۹۲۰/۹۶۷۷	۰/۸۷
۲	β -Pinene	۹۵۶/۹۸۹۲	۰/۸۱
۳	Sabinene	۹۵۳/۲۲۵۸	۰/۵۱
۴	Myrcene	۹۶۵/۵۹۱۴	۰/۳۳
۵	Limonene	۱۰۰۳/۲۲۶	۲۷/۷۷
۶	Limonene oxide	۱۱۰۸۸/۷۱	۰/۱
۷	Iso-dihydro carvone	۱۱۳۹/۸۹۱	۳/۴۷
۸	Carveol	۱۱۶۸/۳۰۶	۰/۴
۹	Pulegone	۱۱۷۳/۲۲۴	۰/۸۱
۱۰	Carvone	۱۱۸۸/۵۲۵	۶۱/۴۳
۱۱	Carvone oxide	۱۲۰۴/۶۲۴	۰/۱۱
۱۲	Iso pulegone acetate	۱۲۳۹/۳۰۶	۰/۱۲
۱۳	Trans carvyl acetate	۱۲۴۶/۲۴۳	۰/۰۴
۱۴	Carvyl acetate	۱۲۶۶/۴۷۴	۰/۷۲
۱۵	Bourbunene	۱۲۸۷/۸۶۱	۰/۴۳
۱۶	Iso Caryophyllene	۱۳۰۴/۲۱۷	۰/۰۶
۱۷	Caryophyllene (Isomer)	۱۳۱۵/۶۶۳	۱/۴۲
۱۸	Farnesene	۱۳۳۴/۹۴	۰/۱۲
۱۹	Caryophyllene (Isomer)	۱۳۴۱/۵۶۶	۰/۱۴
۲۰	Germacrene	۱۳۶۲/۰۴۸	۰/۰۳
۲۱	Caryophyllene epoxide	۱۴۴۲/۰۳۸	۰/۳۱
	Total		۱۰۰

شاخص هیستولوژیکی بر اساس شدت آسیب بافتی از ۰ تا ۴ درجه بندی شد، بدین صورت که عدد (درجه) صفر نشانگر تعداد ۰ تا ۹ نوتروفیل، عدد (درجه) ۱ نشان دهنده تعداد ۱۰ تا ۱۹ نوتروفیل، عدد (درجه) ۲ نشانگر تعداد ۲۰ تا ۲۹ نوتروفیل، عدد (درجه) ۳ نشان دهنده تعداد ۳۰ تا ۳۹ نوتروفیل و نهایتاً عدد (درجه) ۴ نشانگر ۴۰ تا ۴۹ نوتروفیل نفوذ یافته یا حاشیه نشین شده در هر میدان میکروسکوپی بود. برای امتیاز دهی به شاخص پرخونی و ادم بافت بینایی مقیاس درجه بندی نیمه کمی مورد استفاده قرار گرفت، به طوری که عدد (درجه) صفر برای توصیف حالت طبیعی بودن تغییر بافتی؛ +۱: برای تغییرات بافتی خفیف؛ +۲: برای تغییرات بافتی ملایم (متوسط) و +۳: برای تغییرات شدید و +۴: برای تغییرات خیلی شدید مورد استفاده قرار گرفت.

آنالیز آماری: تفاوت‌های بین داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و تست ANOVA تعیین گردید. با استفاده از این نرم افزار P-value داده‌ها، محاسبه گردید و $P < 0.05$ به عنوان تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی آنالیز اسانس نعنا بر اساس کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS): طبق جدول ۵، ۲۱ نوع ترکیب در اسانس نعنا شناسایی گردید که در بین آنها بیشترین مقدار را کاروون (۶۱/۴۳٪)، لیمونن (۲۷/۷۷٪) و ایزودی‌هیدرو کاروون (۳/۴۷٪) دارا می‌باشند (جدول ۵).

تاثیر اسانس نعنا بر روی فاکتورهای استرس اکسیداتیو بافت ریه: همانطور که در جدول ۶ نشان داده شده است، سطح MDA به عنوان محصول لیپید پراکسیداسیون در بافت ریه رت‌های مبتلا به سپسیس (گروه CLP) افزایش می‌یابد ($P < 0.05$). تیمار رت‌های سپتیکی با اسانس نعنا در دو دز ۵۰ mg/kg b.w و ۱۰۰ باعث کاهش معنی‌دار سطح پراکسیداسیون لیپیدها گردید که این کاهش در گروه تیمار

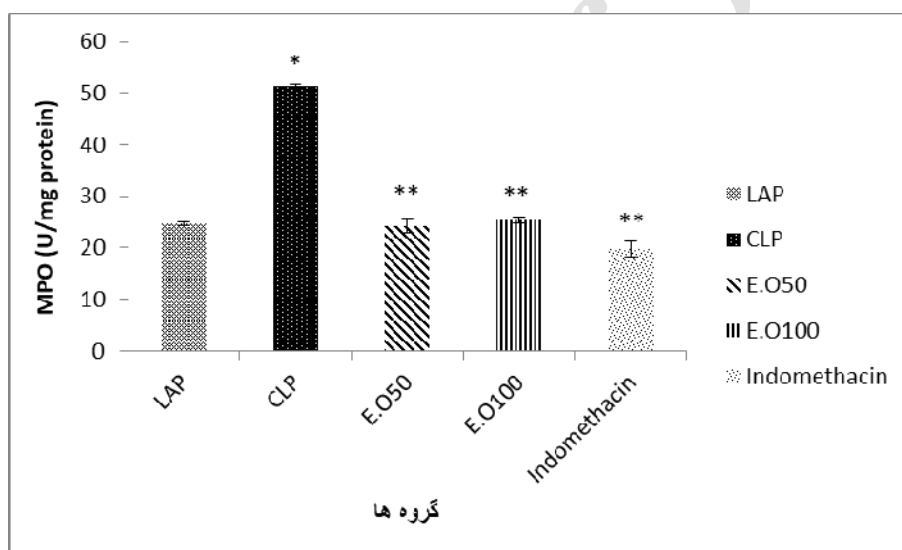
جدول ۶- تأثیر اسانس نعنا بر روی فاکتورهای استرس اکسیداتیو بافت کبد

گروه‌ها	MDA	GSH	FRAP	GST
LAP	۸/۵۲ ± ۰/۶۵	۳/۶۳ ± ۰/۳۶	۴۰۷ ± ۲۱/۷۶	۹۲ ± ۴/۶۵
CLP	۱۴/۴۱ ± ۰/۹۳*	۲ ± ۰/۱۸*	۲۵۷ ± ۱۰/۹۸*	۹۵/۳۳ ± ۴/۴۱
E.O 50	۹/۶۶ ± ۰/۸۹**	۳/۳۳ ± ۰/۳۶**	۳۸۷ ± ۹/۳**	۹۸/۲ ± ۵/۷۷
E.O 100	۹/۵۵ ± ۰/۸۴**	۳/۵۲ ± ۰/۲۷**	۳۷۹ ± ۱۲/۸۶**	۱۲۷ ± ۵/۹۳
Indomethacin	۹/۶۸ ± ۰/۳۵**	۳/۵ ± ۰/۲۴**	۲۸۰ ± ۱۸/۲	۹۲ ± ۵/۰۴

علامت * نشان دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه CLP بوده که با گروه LAP معنی دار است ($P < 0.05$). علامت ** نشان دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه‌های مختلف تیمار بوده که با گروه CLP معنی دار هستند ($P < 0.05$).

تأثیر اسانس نعنا بر روی فعالیت میلوپراکسیداز بافت ریه: آنزیم میلوپراکسیداز در بافت ریه‌های سپتیک (گروه CLP) نسبت به گروه کنترل (لاپاراتومی) در ۲۴ ساعت پس از القاء سپسیس افزایش معنی داری پیدا کرد ($P < 0.05$). تیمار رت‌ها با اسانس نعنا در دو دوز ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg b.w و نیز داروی ایندومتاسین باعث کاهش سطح آنزیم میلوپراکسیداز در بافت ریه‌های مبتلا به سپسیس گردید ($P < 0.05$) (نمودار ۱).

تأثیر اسانس نعنا بر روی فعالیت میلوپراکسیداز بافت ریه: آنزیم میلوپراکسیداز در بافت ریه‌های سپتیک (گروه CLP) نسبت به گروه کنترل (لاپاراتومی) در ۲۴ ساعت پس از القاء سپسیس افزایش معنی داری پیدا کرد

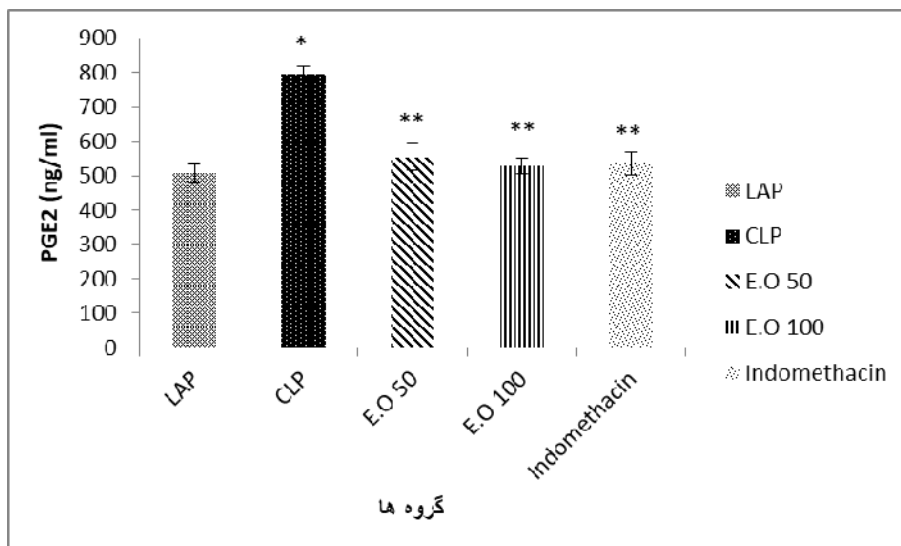


نمودار ۱- تأثیر اسانس نعنا بر میزان فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز در بافت ریه

علامت * نشان دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه CLP بوده که با گروه LAP معنی دار است ($P < 0.05$). علامت ** نشان دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه‌های مختلف تیمار بوده که با گروه CLP معنی دار هستند ($P < 0.05$).

اسانس نعنا در دو دوز ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg b.w باعث کاهش سطح پلاسمایی پروستاگلاندین E2 ۲۴ ساعت بعد از القاء سپسیس گردید ($P < 0.05$) که این کاهش در گروه تیمار شده با داروی ایندومتاسین (گروه کنترل مثبت) نیز دیده شد ($P < 0.05$) (نمودار ۲).

تأثیر اسانس نعنا بر روی غلظت پروستاگلاندین E2 (PGE2) در پلاسما: بر اساس نمودار ۲، میزان پروستاگلاندین E2 در پلاسماهای رت‌های سپتیک (گروه CLP) - ۲۴ ساعت بعد از القاء سپسیس - نسبت به گروه کنترل (لاپاراتومی) افزایش معنی داری داشت ($P < 0.05$).

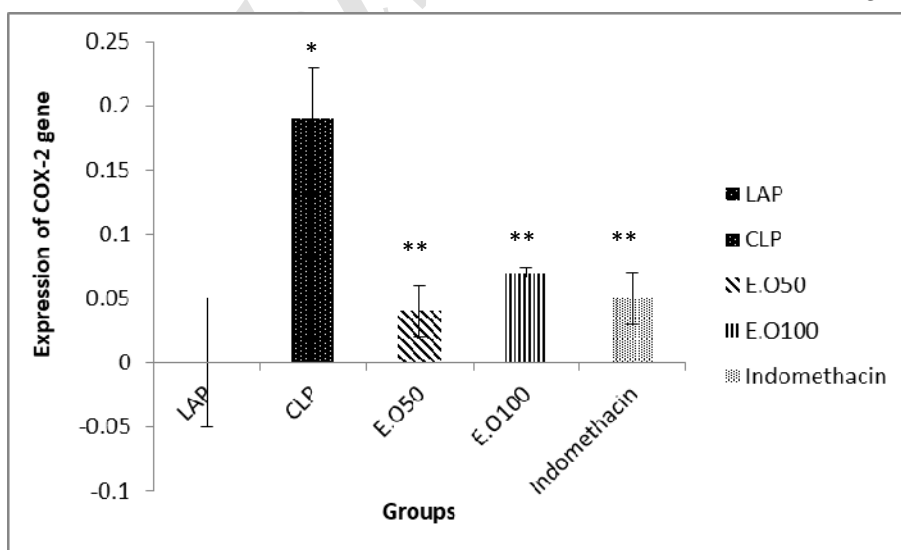


نمودار ۲- تاثیر اسانس نعنا بر روی غلظت پروستاگلاندین E2 در پلاسما

علامت * نشان دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه CLP بوده که با گروه LAP معنی دار است ($P < 0.05$). علامت ** نشان دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه‌های مختلف تیمار بوده که با گروه CLP معنی دار هستند ($P < 0.05$).

باعث کاهش سطح ژن COX-2 ۲۴ ساعت بعد از القاء سپسیس در بافت ریه گردید ($P < 0.05$). کاهش سطح ژن COX-2 از 0.19 ± 0.04 در گروه CLP به 0.05 ± 0.02 در گروه تیمار شده با داروی ایندومتاسین (گروه کنترل مثبت) نیز دیده شد ($P < 0.05$) (نمودار ۳).

تاثیر اسانس نعنا بر روی بیان ژن COX-2: همانطور که در نمودار ۳ نشان داده شده است، ژن COX-2 در بافت ریه رت‌های سپتیکی (گروه CLP) - ۲۴ ساعت بعد از القاء سپسیس - نسبت به گروه کنترل (لاپاراتومی) افزایش معنی داری (از 0.19 ± 0.04 به 0.05 ± 0.02) داشت ($P < 0.05$). اسانس نعنا در دو دز ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg b.w



نمودار ۳- تاثیر اسانس نعنا بر روی بیان ژن COX-2

علامت * نشان دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه CLP بوده که با گروه LAP معنی دار است ($P < 0.05$). علامت ** نشان دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه‌های مختلف تیمار بوده که با گروه CLP معنی دار هستند ($P < 0.05$).

بطور معنادار باعث کاهش ادم شود. از لحاظ پرخونی، بافت ریه در گروه CLP بطور معنادار پرخون‌تر از گروه کنترل مشاهده شد و تیمار با اسانس نعنا در دو دز 50 mg/kg b.w و 100 (شکل ۱، C,D) توانست بطور معنادار باعث کاهش پرخونی شود (جدول ۷).

شاخص شدت ذات‌الریه بینایی که از میانگین مقادیر متغیرهای دیگر هر نمونه بدست آمده است نشان می‌دهد که شدت ذات‌الریه در گروه CLP نسبت به گروه کنترل به صورت معنا داری بیشتر است و تیمار با اسانس نعنا در دو دز 50 mg/kg b.w و 100 (شکل ۱، C,D) توانست بطور معنادار باعث کاهش شدت ذات‌الریه بینایی شود (جدول ۷). کاهش معنی دار شاخص‌های فوق در گروه تیمار شده با ایندومتاسین نیز دیده شد به طوری که شاخص هیستولوژیکی شدت آسیب بافت ریه و تعداد نوتروفیل‌های نفوذ یافته و حاشیه نشین شده، پس از تیمار رت‌های دچار سپسیس با داروی ایندومتاسین کاهش شدید یافت ($P < 0.05$) (شکل ۱، E).

بحث

سپسیس پاسخ سیستمیک میزبان به عفونت، پس از تهاجم پاتوژن‌های میکروبی به جریان خون است که به دنبال خود، سرکوب ایمنی منجر شونده به عدم عملکرد چندین ارگان و حساسیت به عفونت‌های بیمارستانی را در پی دارد (۱).

نتایج هیستوپاتولوژی بافت ریه: مطالعه هیستوپاتولوژیک بافت ریه نشان داد که در گروه کنترل (لاپاراتومی) خفیف‌ترین ضایعات بصورت پرخونی، ارتشاح نوتروفیل‌ها در بافت بینایی و ادم التهابی بافت بینایی رخ داده است (شکل ۱، A). بیشترین آسیب بافت ریه در گروه رت‌های مبتلا به سپسیس (گروه CLP) مشاهده می‌گردد. در این گروه، بافت ریه در بررسی ظاهری (ماکروسکوپی) دچار پرخونی است. در بررسی هیستوپاتولوژیک نیز پرخونی شدید دیده می‌شود. ادم شدید بافت بینایی باعث گسترش دیواره همبندی بین لوبولی شده است. همچنین ادم بینایی و پیرامون عروقی و خونریزی‌های کانونی در این گروه دیده می‌شود. دیواره آلئول‌های ریوی ضخیم شده و به دلیل هاپرتروفی ماکروفاژهای درون عروقی و بینایی ریوی و نیز بدلیل نفوذ و حاشیه نشینی نوتروفیل‌ها در دیواره سیاهرگ‌ها (margination)، بافت ریه هیپرسلولار به نظر می‌رسد. تمام این تغییرات نشان‌دهنده وقوع ذات‌الریه بینایی حاد در بافت‌های ریه نمونه‌های این مطالعه بود (شکل ۱، B1,B2). همچنین، این تغییرات با شدت‌های مختلف در سایرگروه‌های تیمار نیز دیده شد (شکل ۱، C,D).

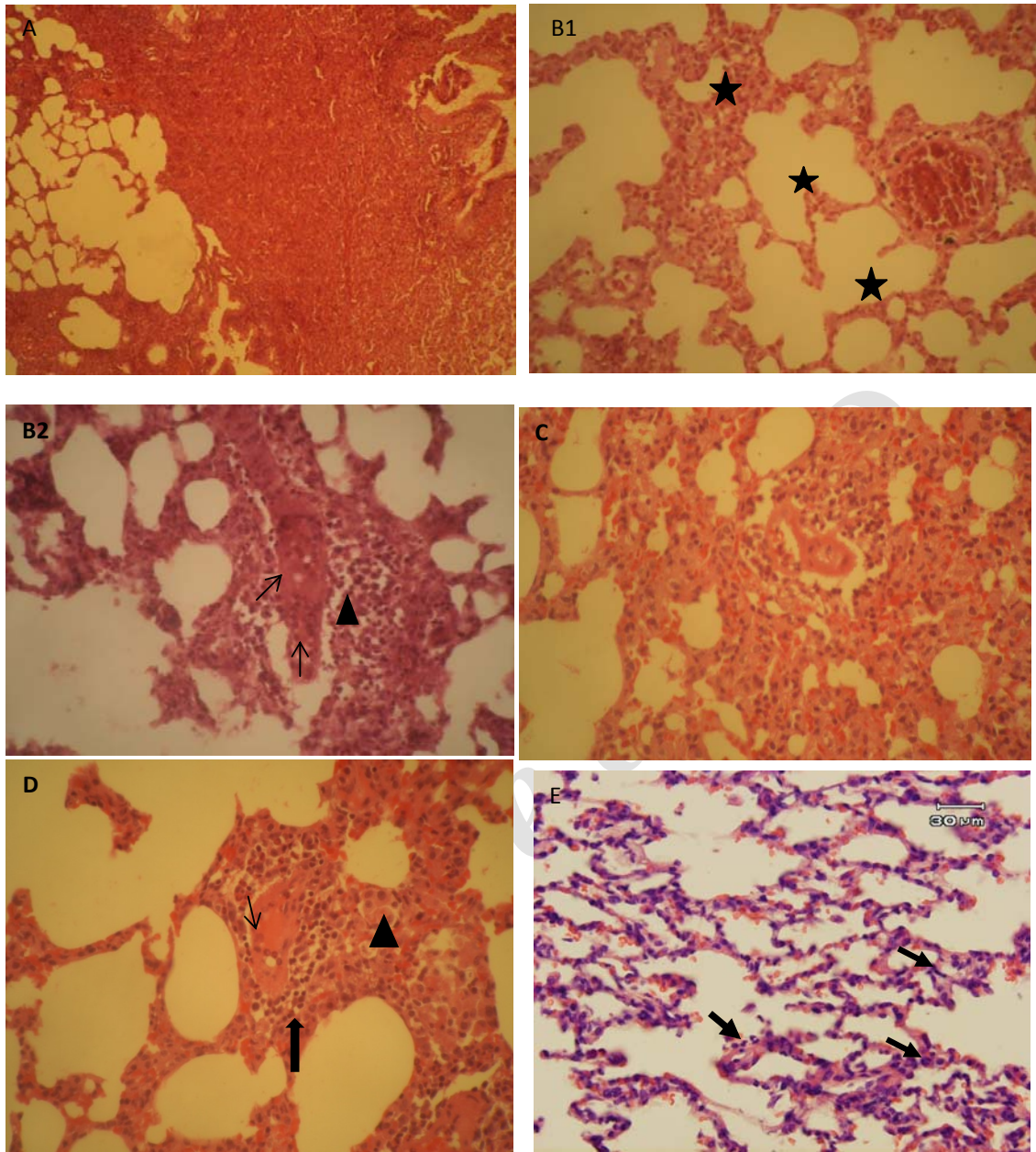
همانطور که در جدول ۷ مشاهده می‌شود، در گروه CLP بطور معنادار نسبت به گروه کنترل، ادم التهابی و ارتشاح نوتروفیل در بافت‌های بینایی ایجاد شده و گروه تیمار اسانس نعنا در دز 50 mg/kg b.w (شکل ۱، C) توانست

جدول ۷- میانگین و خطای استاندارد مقادیر عددی شاخص‌های آسیب‌شناسی در گروه‌های مختلف مطالعه

گروه‌های مطالعه	ادم التهابی	ارتشاح نوتروفیل	پرخونی	شدت ذات‌الریه بینایی
LAP	$1/6 \pm 0/4$	$0/8 \pm 0/3$	1 ± 0	$1/1 \pm 0/2$
CLP	$3/14 \pm 0/1^*$	$3/5 \pm 0/2^*$	$3/5 \pm 0/2^*$	$3/2 \pm 0/1^*$
E.O50	$1/2 \pm 0/2^{**}$	$2/4 \pm 0/4$	$2/2 \pm 0/2^{**}$	$2 \pm 0/1^{**}$
E.O100	$2 \pm 0/3$	$2/2 \pm 0/2$	$2/2 \pm 0/2^{**}$	$2/1 \pm 0/1^{**}$
Indomethacin	$1/8 \pm 0/2^{**}$	$2 \pm 0/2$	$2/2 \pm 0/2^{**}$	$1/9 \pm 0/2^{**}$

** دارای اختلاف معنادار با گروه CLP

** دارای اختلاف معنادار با گروه LAP



شکل ۱- A) گروه لاپاراتومی LAP: پرخونی و ادم ملایم بافت بینابینی و عدم مشاهده نوتروفیل در بافت ریه *۴۰۰ (B1, B2) گروه CLP: پرخونی شدید، ادم و التهاب وسیع بافت بینابینی ریه (نواحی که با ستاره مشخص گردیده اند) *۱۰۰، گروه CLP: مشاهده ادم التهابی در اطراف سیاهرگ در بافت بینابینی ریه. تجمع آستین وار نوتروفیل‌ها در اطراف سیاهرگ (سریکان). مرز نشینی نوتروفیل‌ها در مجاور آندوتلیوم سیاهرگ (پیکان‌ها). *۴۰۰ C) گروه اسانس نعنا در دز ۵۰ mg/kg b.w: پرخونی و ادم ملایم و ارتشاح نوتروفیل‌ها در بافت بینابینی *۴۰۰ (D) گروه اسانس نعنا در دز mg/kg ۱۰۰ b.w: ارتشاح ملایم نوتروفیل‌ها در اطراف سیاهرگ (پیکان بزرگ). مرز نشینی نوتروفیل‌ها در مجاور آندوتلیوم سیاهرگ (پیکان کوچک). حضور تعدادی ماکروفاژ در بافت بینابینی (سریکان) *۴۰۰ (E) گروه ایندومتاسین: لکوسیت‌های چند هسته‌ای (پلی مورفونوکلتر) از نوع نوتروفیل نفوذ یافته و حاشیه نشین شده در بافت ریه *۴۰۰

همچنین نتایج حاصل از بررسی مارکرهای آسیب اکسیداتیو بافتی نظیر MPO, GSH, LP در بافت ریه نشان می‌دهند که اسانس نعنا در هر دو دوز ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن باعث مهار تغییر پارامترهای فوق در رتهای مبتلا به سپسیس در ۲۴ ساعت پس از CLP می‌گردد (جدول ۶، نمودار ۱) که نتایج پاتولوژی نیز اثر اسانس نعنا در تعدیل آسیب بافتی را تایید می‌کند (شکل ۱، C, D). جبران کاهش گلوکوتایون که یک جزء مهم از سیستم حفاظتی داخل سلولی بر علیه استرس اکسیداتیو می‌باشد، منجر به بازیافت مکانیسم دفاع سلولی و توقف پراکسیداسیون لیپیدها گردیده که در نتیجه سلول را در مقابل آسیب اکسیداتیو بافتی محافظت می‌کند. این نتیجه با گزارش ارائه شده توسط Villa مبنی بر نقش محافظتی گلوکوتایون در سپسیس مطابقت دارد (۵۱). از سوی دیگر نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که میزان FRAP در نمونه ی پلاسماي موش های سپتیکی، ۲۴ ساعت پس از ایجاد CLP کاهش می‌یابد و تیمار رت‌ها با اسانس نعنا در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ kg/mg b.w باعث افزایش و بازگشت سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پلاسما (FRAP) به حالت نرمال می‌شود (جدول ۶). اندازه‌گیری‌های انجام گرفته در بیماران مبتلا به شوک سپتیک نشان می‌دهد که میزان FRAP و فاکتورهای دخیل در آن مثل اسید اوریک و بیلی‌روبین متناسب با شدت سپسیس افزایش می‌یابد (۵). علاوه بر این، نتایج حاصل از تحقیق نشان می‌دهد که بیماری سپسیس تاثیری بر آنزیم GST ندارد (جدول ۶). این نکته حائز اهمیت است که نتایج حاصل از تیمار رت‌های مبتلا به سپسیس با اسانس نعنا با دوز ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن همانند نتایج حاصل از داروی شناخته شده ضد التهابی ایندومتاسین - که در این تحقیق به عنوان گروه کنترل مثبت استفاده شده است - می‌باشد.

بر اساس آنالیز GC-MS بیشترین ترکیبات موجود در اسانس نعنا کاروون و لیمونن بودند (جدول ۵). بسیاری از

به طور کلی در مدل CLP، با عمل جراحی (بستن دریچه سکوم و سوراخ کردن آن) میکروارگانیزم‌های روده‌ای به داخل جریان خون نشت پیدا کرده و سپسیس ایجاد می‌شود. ایجاد مدل سپسیس توسط جراحی CLP بسیار کم‌هزینه و سریع می‌باشد و استاندارد کردن آن نیز آسان است (۲۶).

نتایج حاصل از بررسی پارامترهای دخیل در آسیب اکسیداتیو در بافت ریه رتهای مبتلا به سپسیس نشان داد که در گروه CLP، سطح پارامترهای مربوط به استرس اکسیداتیو ۲۴ ساعت بعد از القاء سپسیس دچار اختلال می‌شوند. این پارامترها (آنزیم میلوپراکسیداز، مالون دی‌آلدئید و گلوکوتایون) از شاخص‌های وضعیت سیستم استرس اکسیداتیو می‌باشند که در سپسیس به دلیل نقص در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی دچار اختلال می‌شوند (۱۱). اولین مشاهدات در آسیب اکسیداتیو بافتی حاصل از سپسیس افزایش پراکسیداسیون لیپیدها (LP) در بافت ریه در گروه CLP نسبت به گروه کنترل می‌باشد ($P < 0.05$). افزایش LP در بافت مذکور همراه با افزایش فعالیت آنزیم MPO و کاهش سطح گلوکوتایون (GSH) در ۲۴ ساعت پس از القاء سپسیس رخ داده است ($P < 0.05$) (جدول ۶، نمودار ۱). آنزیم MPO نقش بسیار مهمی را در شروع پراکسیداسیون لیپیدها در سیستم *in vivo* ایفاء می‌کند. علاوه بر آن، شروع پراکسیداسیون لیپیدها و تشکیل ایکوزانویدهای فعال فرایندهای مهمی در التهاب هستند (۵۴). این داده‌ها همراه با نتایج هیستوپاتولوژیکی (شکل ۱) نشان می‌دهند که آسیب اکسیداتیو بافت ریه حاصل از سپسیس، تخریب بافتی شدیدی را در ۲۴ ساعت پس از CLP موجب شده است. مطالعات دیگر نیز نشان دادند که در مدل التهابی CLP، تغییر پارامترهای دخیل در استرس اکسیداتیو منجر به آسیب بافتی می‌شود که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (۴، ۴۴).

بررسی پارامتر دخیل در فرایند التهاب در گروه CLP نشان داد که افزایش تولید ROS در رت‌های سپتیکی منجر به افزایش بیان ژن COX-2 و منجر به افزایش تولید PGE2 و در نتیجه افزایش سطح آن در پلاسما می‌شود که در نهایت منجر به آسیب بافتی در ریه می‌گردد (نمودار ۳). در سپسیس و التهاب حاد، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و میانکنش بین انواع سایتوکین‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی باعث از کار افتادن بسیاری از ارگان‌ها و در نهایت مرگ می‌گردد (۱۴، ۴۰). در این بیماری، اجزاء مهمی از فرایندهای پاتولوژیکی دست به دست هم می‌دهند تا نوتروفیل‌ها را برای آزادسازی یک سری از واسطه‌هایی که در تخریب سلول‌های نرمال نقش دارند، تحریک کنند. در این میان افزایش تولید ROS توسط ماکروفاژها، نقش مهمی را در آغاز فرآیند التهاب بازی می‌کند. مطالعات نشان می‌دهند که القاء ژن COX-2 با تشدید استرس اکسیداتیو در گسترش آسیب‌های بافتی ناشی از التهاب نقش مهمی دارند (۱۴). همچنین نتایج حاصل از بررسی بیان ژن COX-2 و PGE2 در بافت ریه نشان می‌دهد که اسانس نعنا در هر دو دز ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن باعث تعدیل بیان این ژن و محصول آن (PGE2) در رت‌های مبتلا به سپسیس در ۲۴ ساعت پس از CLP می‌گردد. قابل ذکر است که بیان ژن COX-2 در سلول‌های نرمال در سطح بسیار پایینی قرار دارد. این آنزیم در ماکروفاژها و سلول‌های آندوتلیال در طول شرایط التهابی از جمله سپسیس القاء گردیده و افزایش شدیدی می‌یابد (۱۲).

به طور خلاصه این نتایج بیان می‌کنند که اسانس نعنا با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی دارای نقش محافظتی در برابر عوارض و آسیب‌های بافتی ناشی از سپسیس می‌باشد که در نهایت منجر به کاهش آسیب‌های ناشی از سپسیس در بافت ریه می‌شود. این نتایج با مشاهدات هیستوپاتولوژی نیز تایید شده است.

مطالعات نشان داده‌اند که این دو ترکیب در خانواده نعنا دارای خواص بسیاری از جمله خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی هستند (۲۰، ۳۱، ۴۶، ۵۳). بر اساس این مطالعات، انتظار می‌رود که مصرف اسانس توسط حیوانات سپتیکی منجر به تعدیل پارامترهای مرتبط با واکنش‌های استرس اکسیداتیو/آنتی‌اکسیدانی شود. برخی از مطالعات *in vivo* و *in vitro* نیز نشان داده‌اند که آنتی‌اکسیدانهای طبیعی، بافت‌ها را در مقابل آسیب اکسیداتیو القاء شده توسط عوامل تولیدکننده رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کنند. به عنوان مثال، سیلیمارین (مخلوطی از فلاونولیگنان‌های جدا شده از گیاه خار مریم) با کاهش پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش گلوتاتیون از آسیب اکسیداتیو بافتی حاصل از استامینوفن در مغز رت جلوگیری می‌کند (۳۶). دیگر مطالعات نیز نشان داده‌اند که آنتی‌اکسیدان‌هایی از قبیل سیلیمارین و N-استیل‌سیستئین با تعدیل پارامترهای دخیل در استرس اکسیداتیو از جمله گلوتاتیون، پراکسیداسیون لیپیدها و آنزیم‌های میلوپراکسیداز، از آسیب اکسیداتیو بافتی به خصوص کبد و ریه در سپسیس جلوگیری می‌کنند (۲۱، ۴۸). تیمار رت‌های مدل CLP با متیلن‌بلو نیز با تعدیل عوامل دخیل در استرس اکسیداتیو از جمله گلوتاتیون، پراکسیداسیون لیپیدها، آنزیم‌های میلوپراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دسموتاز در بافت ریه از آسیب اکسیداتیو این بافت در رت‌های سپتیکی جلوگیری می‌کند (۱۳). علاوه بر این، در مطالعه‌ای نشان داده شد که کورکومین موجود در زردچوبه از طریق خواص ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی خود دارای اثرات مفیدی بر روی آسیب کبدی رت‌های نژاد ویستار داشته است (۳). مطالعه‌ی دیگری نشان داد تیمار حیوانات با اسانس آویشن شیرازی، از طریق تعدیل پارامترهای دخیل در متابولیسم گزنوبیوتیک‌ها (GST، CYP 450) و مهار افزایش سطح AST سرم به عنوان مارکر آسیب کبدی، منجر به کاهش آسیب‌های بافتی کبد ناشی از مسمویت نانوذرات آهن می‌شود (۲).

منابع

۱. دکتر عبدالرضا اسماعیل زاده، نازیلا بهمنی. ۱۳۹۴. نشریه ی آزمایشگاه و تشخیص سال هفتم - شماره ی ۳۰، ۵۳-۶۴.
۲. حدیث کوهی نژاد، آزاده رسولی، رضا حاجی حسینی، آتوسا وزیری، میثم صغیری. ۱۳۹۶. بررسی تاثیر اسانس آویشن شیرازی بر روی متابولیسم گزنوبیوتیک ها در مسمویت حاد ناشی از نانو ذرات آهن. مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)، آماده انتشار.
۳. محمد نبیونی، ویدا حجتی، آرزیتا قربانی و لطیفه کریم زاده باردنی. ۱۳۹۵. اثرات کورکومین بر کبد رت‌های ویستار مبتلا به سندرم تخمدان پلیکیستیک القاء شده با استرادیول والرات. مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۲۹، شماره ۱، صفحات ۱۱۸-۱۰۶.
4. Aksoy AN, Toker A, Celik M, Aksoy M, Halici Z, Aksoy H. 2014. The effect of progesterone on systemic inflammation and oxidative stress in the rat model of sepsis. *Indian J Pharmacol.* 46: 622-626.
5. Andresen M, Regueira T, Bruhn A, Perez D, Strobel P, Dougnac A, Marshall G, Leighton F. 2008. Lipoperoxidation and protein oxidative damage exhibit different kinetics during septic shock. *Mediators Inflamm.* 16: 1-8.
6. Angus DC, van der Poll T. 2013. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 369 (9): 840-851.
7. Basu S, Eriksson M. 2000. Lipid Peroxidation Induced by an Early Inflammatory Response in Endotoxaemia. *Acta Anaesthesiol Scand.* 14: 17-23.
8. Basu S, Eriksson M. 2006. Vitamin E in Relation to Lipid Peroxidation in Experimental Septic Shock. *Eur J Pharmacol.* 534: 202-209.
9. Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal Biochem.* 239: 70-76.
10. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72(1-2): 248-254.
11. Cherian S, Jameson S, Rajarajeswari C, Helena V, Latha L, Anu Rekha MR, Nagamma T, Subba Raju V, Kini PG, Rao A. 2007. Oxidative stress in sepsis in children. *Indian J Med Res.* 125(2): 143-148.
12. Crofford LJ, Lipsky PE, Brooks P, Abramson SB, Simon LS, van de Putte LB. 2000. Basic biology and clinical application of specific cyclooxygenase-2 inhibitors. *Arthritis Rheum.* 43(1): 4-13.
13. Demirbilek S, Sizanli E, Karadag N, Karaman A, Bayraktar N, Turkmen E, Ersoy MO. 2006. The effects of methylene blue on lung injury in septic rats. *Eur Surg Res.* 38(1): 35-41.
14. Esmaeili B, Rezaee SAR, Layegh P, Tavakkol Afshari J, Phil Dye PH, Ghayoor Karimiani E, Kalalinia F, Rafatpanah H. 2011. Expression of IL-17 and COX2 Gene in Peripheral Blood Leukocytes of Vitiligo Patients. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 10(2): 81-89.
15. Fatemi F, Allameh A, Khalafi H, Ashrafihelan J. 2010a. Hepatoprotective effects of g-irradiated caraway essential oils in experimental sepsis. *Appl Radiat Isotopes.* 68: 280-285.
16. Fatemi F, Allameh A, Khalafi H, Rajaei R, Davoodian N, Rezaei MB. 2011. Biochemical properties of γ -irradiated caraway essential oils. *J Food Biochem.* 35: 650-62.
17. Fatemi F, Allameh A, Khalafi H, Rezaei MB, Seyhoon M. 2010b. The effect of essential oils and hydroalcoholic extract of caraway seed on oxidative stress parameters in rats suffering from acute lung inflammation before and after γ -irradiation. *J Med Aroma Plant.* 25(4): 441-455.
18. Fatemi F, Allameh A, Khalafi H, Rezaei MB, Seyhoon M. 2010. The effect of essential oils and hydroalcoholic extract of caraway seed on oxidative stress parameters in rats suffering from acute lung inflammation before and after γ -irradiation. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants.* 25(4): 441-445.
19. Ghaderi P, Ahmadi R, Balkanyian F, Moridikyia A, Mahdavi E, Tavakoli P. 2014. In-vitro antibacterial activity of buniun persicum and *Mentha longifolia* against *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. International Conference on Chemical, Agricultural and Medical Sciences. May 2-3, Antalya, Turkey.
20. Golluce M, Sahin F, Sokmen M, Ozer H, Daferera D, Sokmen A, Polissiou M, Adiguzel A, Ozken H. 2007. Antimicrobial and

- antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L.ssp.*longifolia*. *Food Chem.* 103(4):1449-1456.
21. Güreş A, Özdoğan M, Gökakin AK, Gömceli I, Gülbaha RO, Arikök AT, Kulaçoğlu H, Aydın R. 2009. Tissue oxidative stress level and remote organ injury in two-hit trauma model of sequential burn injury and peritoneal sepsis are attenuated with N-acetylcysteine treatment in rats. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 15(1): 1-6.
 22. Gutteridge JM, Mitchell J. 1999. Redox Imbalance in the Critically Ill. *Br Med Bull.* 55: 9-75.
 23. Hillegass LM, Griswold DE, Brickson B, Albrightson- Winslow C. 1990. Assessment of myeloperoxidase activity in whole rat kidney. *J Pharmacol Methods.* 24(4): 285-295.
 24. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. 2013. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis.* 13(3): 260-268.
 25. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. 2013. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev. Immunol.* 13(12): 862-874.
 26. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD. 2005. Cecal ligation and puncture. *Shock.* 24(1): 52-57.
 27. Jalilzadeh-Amin G, Maham M. 2015. Antidiarrheal activity and acute oral toxicity of *Mentha longifolia* L. essential oil. *AJP.* 5: 128-137.
 28. Jalilzadeh-Amin G, Maham M. 2015. The application of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in medicinal plants, inhibits castor oil-induced diarrhea in rats. *Pharm Biol.* 53(4): 594-9.
 29. Jalilzadeh-Amin G, Mahama M. 2013. Evaluation of pulegone on transit time and castor-oil induced diarrhea in rat. *Pharmaceutical Sci.* 19: 77-82.
 30. Kagan Coskun A, Yigiter M, Oral A, Odabasoglu F, Halici Z, Menten O, Cadirci E, Atalay F, Suleyman H. 2011. The Effects of Montelukast on Antioxidant Enzymes and Proinflammatory Cytokines on the Heart, Liver, Lungs, and Kidneys in a Rat Model of Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis. *Sci World J.* 11: 1341-1356.
 31. Kamkar A, Asadi F, Jebelli Javan A, Jamshidi R. 2009. Antioxidant capacity of essential oil and extract of Iranian *Mentha spicata*. *J Vet Med Lab.* 1: 69-77.
 32. Keller SA, Paxian M, Lee SM, Clemens MG and Huynh T. 2005. Kupffer Cell Ablation Attenuates Cyclooxygenase-2 Expression after Trauma and Sepsis. *J Sur Res.* 124:126-133.
 33. Levy MM, Artigas A, Phillips GS, Rhodes A, Beale R, Osborn T, Vincent JL, Townsend S, Lemeshow S, Dellinger RP. 2012. Outcomes of the surviving sepsis campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 12 (12): 919-924.
 34. Mayr FB, Yende S, Angus DC. 2014. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence.* 5 (1): 4-11.
 35. Nelson SD. 1995. Mechanisms of the formation and disposition of reactive metabolites that can cause acute liver injury. *Drug Metab Rev.* 27: 147-177.
 36. Nencini C, Giorgi G, Micheli L. 2007. Protective effect of silymarine stress in rat brain. *Phytomedicine.* 14: 129-135.
 37. Pavon A, Binquet C, Kara F, Martinet O, Ganster F, Navellou JC, Castelain V, Barraud D, Cousson J, Louis G, Perez P, Kuteifan K, Noirot A, Badie J, Mezher C, Lessire H, Quantin C, Abrahamowicz M, Quenot JP. 2013. Profile of the risk of death after septic shock in the present era: an epidemiologic study. *Crit. Care Med.* 41 (11): 2600-2609.
 38. Prasad S, Subash C.Gupta, Amit K.Tyagi. 2017. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett.* 387: 95-105.
 39. Quenot JP, Binquet C, Kara F, Martinet O, Ganster F, Navellou JC, Castelain V, Barraud D, Cousson J, Louis G, Perez P, Kuteifan K, Noirot A, Badie J, Mezher C, Lessire H, Pavon AE. 2013. Study Group, The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Crit. Care* 17 (2): R65.
 40. Rackow EC, Astiz ME. 1991. Pathophysiology and treatment of septic shock. *JAMA.* 266: 548.
 41. Razavi SM, Zarrini G. and Molavi G. 2012. The evaluation of some biological activity of *Mentha longifolia* (L.) Huds growing wild in Iran. *Pharmacologia.* 3(10): 535-538.
 42. Saeidi S, Hassanpour K, Ghamgosha M, Heiat M, Taheri RA, Mirhosseini A, Farnoosh G. 2014. Antibacterial activity of ethyl acetate and

- aqueous extracts of *Mentha longifolia* L. and hydroalcoholic extract of *Zataria multiflora* Boiss. plants against important human pathogens. *Asian Pac J Trop Med*. 7(1): S186-S189.
43. Seldak J, Lindsay. 1986. Estimation of total protein bound and non-protein sulfidryl groups in tissue with Elman's reagent. *Anal Biochem*. 25: 192-205.
44. Şener G, Toklu H, Ercan F, Erkanli G. 2005. Protective effect of β -glucan against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Int Immunopharmacol*. 5: 1387-96.
45. Sharma RA, Dalglish AG, Steward WP, O'byrne KJ. 2003. Angiogenesis and the immune response as targets for the prevention and treatment of colorectal cancer (Review). *Oncol Rep*. 10: 1625-1631.
46. Singh R, Muftah A, Shoshni M, Asma B. 2011. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arab J Chem*. 10:1016-1017.
47. Swan DK, Ford B. 1997. Chemoprevention of cancer: review of the literature. *Oncol NursForum*. 24: 719-727.
48. Toklu HZ, Tunali Akbay T, Velioglu-Ogunc A, Ercan F, Gedik N, Keyer-Uysal M, Sener G. 2008. Silymarin, the antioxidant component of *Silybum marianum*, prevents sepsis-induced acute lung and brain injury. *J Surg Res*. 145(2): 214-22.
49. Unnithan CR, Gebreselassie H, Sushen U, Reddy DN, Woldu A, Muuz M. 2013. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Mentha longifolia* L of Mekole, Ethiopia. *J Biol Scie Opin*. 1(3): 151-153.
50. Victor VM, Rocha M, Fuente MD. 2004. Immune Cells: Free Radicals and Antioxidants in Sepsis. *Int Immunopharmacol*. 4: 327-347.
51. Villa P, Sacconi A, Sica A. 2002. Glutathione protects mice from lethal sepsis by limiting inflammation and potentiating host defense. *J Infect Dis*. 185: 1115-20.
52. Wills ED. 1969. Lipid peroxide formation in microsomes: General consideration. *Biochem J*. 113: 315-324.
53. Zare Bidaki M, Arab M, Khazaei M, Afkar E. 2014. Anti-bacterial effect of *Mentha spicata* L. essence on eight standard species of gastrointestinal pathogens. *J Birjand Univ Med Sci*. 21 (3): 274-282.
54. Zhang R, Brennan ML, Shen Z, Macpherson JC, Schmitt D, Cheryl Molenda Ch, Hazen SL. 2002. Myeloperoxidase Functions as a Major Enzymatic Catalyst for initiation of Lipid Peroxidation at Sites of Inflammation. *J Bio Chem*. 277(48): 46116-22.

Archive

The effects of *Mentha Spicata* on oxidative stress and COX-2 gene expression in prevention of sepsis

Dadkhah A.¹, Fatemi F.², Mohammadi Malayeri M.R.³, Rasooli A.⁴ and Karvin Ashtiani M.H.⁵

¹ Dept. of Medicine, Faculty of Medicine, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, I.R. of Iran

²Materials and Nuclear Fuel Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, I.R. of Iran

³ Dept. of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, I.R. of Iran

⁴ Dept. of Biochemistry, Faculty of Sciences, Payame-e-Noor University, Tehran, I.R. of Iran

⁵ Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Hakim sabzevari University, Sabzevar, I.R. of Iran

Abstract

Mentha Spicata is an Iranian native plant with therapeutic effects. In this study, the effects of *M. Spicata* essential oils were investigated through considering oxidative injury parameters as well as expression of COX-2 inflammatory gene in lung tissue of experimental cecal ligation and puncture (CLP) rat model. Rats were divided into 5 groups: negative control (lapratomy), CLP, treatment groups with *M. Spicata* E.O (50 and 100 mg/kg b.w) and indomethacin. Then, 24h after CLP induction, LP, GSH, GST, FRAP, MPO, PGE2 and COX-2 expression were measured in plasma and lung tissues. The data indicated that the sepsis induction reduced GSH, FRAP and increased LP, MPO, PGE2 and COX-2 levels but didn't affected GST activity. Treatments of rats with E.Os as well as indomethacin were been effective in increasing the GSH, FRAP and decreasing the LP, MPO, PGE2 and COX-2 levels. Histopathological examinations indicated that sepsis caused lung tissue damage which was decreased by E.O treatments. In conclusion, sepsis causes oxidative lung tissue damage and use of *M. Spicata* can prevent injuries through modulation the oxidative stress/antioxidant parameters.

Key words: *Mentha Spicata* essential oils, CLP, Antioxidant system balance, Anti-inflammatory, Sepsis