

بررسی فعالیت ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی آب تھی شده از دوتریوم و اسانس نعنا بر روی آسیب ریوی ناشی از CLP

آزاده رسولی^۱، فائزه فاطمی^{۲*}، محمدرضا محمدی ملایری^۳، رضا حاجی حسینی^۱، آتوسا وزیری^۱، زهرا موسوی^۴، ماریا فروتن راد^۱ و سمانه اوتادی^۱

^۱ ایران، تهران، دانشگاه پیام نور، واحد تهران شرق، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

^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، قم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، دانشکده علوم پایه، گروه فیزیولوژی

تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۲۱

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۱۷



چکیده

سپسیس علت عمده مرگ‌ومیر بیماران در بخش مراقبت‌های ویژه است. با وجود درمان‌های حمایتی جدید و بکارگیری آنتی‌بیوتیک‌های قوی، سپسیس همچنان از جمله عوامل خطرزا در زندگی مبتلایان می‌باشد. لذا هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر آب تھی شده از دوتریوم (DDW) و اسانس نعنا روی رت‌های سپتیکی القا شده با مدل (CLP: Cecal Ligation and Puncture) می‌باشد. از این رو، رت‌ها به ۷ گروه: کنترل منفی (Laparotomy)، CLP، گروه‌های تیمار با DDW (۱۵ و ۳۰ ppm) و همراه با اسانس نعنا (۱۰۰ mg/kg b.w) و کنترل مثبت (ایندومتاسین) تقسیم شدند. ۲۴ ساعت پس از جراحی پارامترهای دخیل در آسیب اکسیداتیو و بیان ژن COX-2 در بافت ریه اندازه‌گیری شد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد 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 DDW به‌تنهایی و همزمان با اسانس نعنا به‌اندازه ایندومتاسین، در تعدیل سطح این پارامترها مؤثر بوده است، بطوریکه سبب افزایش میزان FRAP و GSH و کاهش میزان LP، MPO، PGE2 و بیان ژن COX-2 شده است. همچنین مطالعات پاتولوژی نشان می‌دهد که سپسیس منجر به ایجاد آسیب‌هایی در بافت ریه شده که این آسیب‌ها در اثر تیمار با DDW و اسانس نعنا کاهش یافته‌اند. بنابراین سپسیس موجب آسیب اکسیداتیو بافت ریه شده و استفاده از این ترکیبات با تأثیر بر روی پارامترهای استرس اکسیداتیو و آنتی‌اکسیدانی می‌تواند در جلوگیری و بهبود این آسیب‌ها مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: سپسیس، اسانس نعنا، آب تھی شده از دوتریوم، فعالیت ضدالتهابی، استرس اکسیداتیو

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۴۱۸۶۳۴۹، پست الکترونیکی: ffatemi@aeoi.org.ir

مقدمه

مبتلایان به بیماری‌هایی غیر از قلب و عروق بستری شده در بخش مراقبت‌های ویژه و جزء ده دلیل اصلی مرگ در میان کل بیماران بستری در بیمارستان است (۲۵). التهاب فرایندی است که توسط عوامل مختلف بیولوژیکی شروع گردیده و نه تنها مستقیماً با فعال‌سازی سیستم ایمنی بلکه

سپسیس واکنش سیستمیک بدن به میکروارگانیسم‌های مهاجم از جمله باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌باشد (۳۹) و یکی از بیماری‌هایی است که بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه ممکن است به آن مبتلا شوند (۱۸). سپسیس به‌عنوان یکی از علل ایجاد التهاب حاد، دومین علت شایع مرگ‌ومیر

آنتی‌اکسیدانی (۲۶ و ۱)، ضد قارچ (۴۲)، ضد باکتری (۳۳) و ضد انقباض و تشنج (۱۲ و ۳۴) می‌باشد.

از سوی دیگر، DDW یا آب سبک دارای اثرات بیولوژیکی است (۲۱) و یک مکمل درمانی سودمند محسوب می‌شود. DDW آبی است که محتوای دوتریوم در آن در مقایسه با استاندارد آب اقیانوسی پایین‌تر (۱۲۰-۳۰ ppm) بوده و ظاهر فیزیکی آن بی‌رنگ، طعم‌دار و با مقدار کمی یون است (۶). DDW هم نقش درمانی و هم پیشگیری‌کننده از سرطان را دارد (۲۴). سطوح پایین دوتریوم در سلول باعث عملکرد مناسب سلول می‌شود (۲۹). آب فاقد دوتریوم رشد سلول سرطانی را مهار کرده و باعث بهبود کیفیت زندگی می‌شود و برخلاف داروهای ضد سرطان اثرات جانبی و تهاجمی ندارد (۴۴ و ۴۵).

باتوجه به اثرات متعدد این گیاه و آب تهی شده از دوتریوم در درمان و کاهش آسیب‌ها، بررسی عملکرد آنها حائز اهمیت خواهد بود. از این رو در این تحقیق، اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی آب تهی شده از دوتریوم به‌تهایی و همزمان با اسانس نعنا بر روی آسیب‌های اکسیداتیو بافت ریه ناشی از مدل التهابی CLP بررسی می‌گردد.

مواد و روشها

دراین مطالعه از آب تهی شده از دوتریوم (تهیه‌شده از مجتمع آب‌سنگین اراک، سازمان انرژی اتمی ایران) و اسانس نعنا (خریداری شده از شرکت باریج اسانس، Batch No:3138-031-93/8 (707051); Sample Serial No:BE930347 استفاده گردید.

علاوه براین، از ۷۰ سر رت نر بالغ با وزن متوسط ۱۰۰ گرم خریداری شده از مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی انستیتوپاستور ایران استفاده گردید. خوراک حیوانات به‌صورت Pellet با فرمول استاندارد از کارخانجات فرآورده‌های غذایی تهران تهیه شد. حیوانات

با واسطه سیکلواکسیژناز ۲ (COX-2) نیز در ایجاد بیماری دخالت می‌کند (۲۰ و ۳۷). یکی از روش‌های تجربی ایجاد التهاب حاد، مدل (cecal ligation and puncture) CLP می‌باشد که از سال ۱۹۷۸ تاکنون، برای بررسی جنبه‌های مختلف سپسیس از جمله وضعیت متابولیسم بدن، چگونگی درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها، عوامل میکروبی دخیل، پاسخهای قلبی-عروقی، عملکرد سیستم ایمنی، واسطه‌های ترشح‌شده در التهاب و الگوی بیان سایتوکین‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (۱۶). COX-2 مسئول بیشتر آثار مضر و خطرناک سپسیس بوده (۲۰) و مهار اختصاصی آن منجر به کاهش سایتوکین‌های پیش التهابی و کاهش مرگ‌ومیر می‌شود (۴۰). همچنین پارامترهای دخیل در تعادل سیستم استرس اکسیداتیو / آنتی‌اکسیدانی از جمله (LP, GSH, MPO) نیز در سپسیس دستخوش تغییر شده و در عوارض آن نقش قابل توجهی دارند (۸).

امروزه داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی (NSAIDs) نقش بسیار مهمی را در درمان سپسیس ایفا می‌کنند. ولی باتوجه به عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای ضدالتهابی، امروزه استفاده از ترکیبات طبیعی در درمان سپسیس و التهاب اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده‌اند (۱۹).

جنس *Mentha* متعلق به تیره نعنا، دارای ۲۹ تا ۳۱ گونه گیاهی، اغلب در مناطق معتدل اروپا و آسیا، استرالیا و جنوب آفریقا یافت می‌شود (۱۲). *Mentha longifolia* L. گیاهی چندساله و معطر است (۳۸) که در طب سنتی غالباً از دم‌کرده برگ‌های آن استفاده می‌شود (۱۲). تسریع‌کننده عمل هضم، رفع آسم، اسپاسم، درد معده، سردرد، سرماخوردگی و سرفه و همچنین در استعمال خارجی برای درمان زخم‌ها و غدد متورم (۴۲) و نیز برای درمان برونشیت، نفخ شکم، بی‌اشتهایی، کولیت و اختلالات روده ایی مانند تهوع و سوءهاضمه و اسهال استفاده می‌شود (۱۶ و ۴۷). این گیاه همچنین دارای اثراتی نظیر خواص

به‌منظور مقایسه تغییرات بافتی، لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری بررسی و از آنها عکس‌برداری به عمل آمد.

غلظت مالون دی‌آلدئید (MDA) با اندازه‌گیری میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۵۳۵ نانومتر و از روی ضریب خاموشی آن ($1/56 \times 10^5 \text{ L/cm.mmol}$) محاسبه گردید (۴۶). سطح گلوتاتیون احیاء (GSH) به روش Seldak and Limdsay توسط اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۴۱۲nm (۳۵) و فعالیت آنزیم گلوتاتیون S-ترانسفراز (GST) به روش Habig و با استفاده از سوبسترای (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene) CDNB توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۳۴۰ nm اندازه‌گیری شد (۱۳). همچنین، فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز (MPO) با کمی تغییر مطابق روش هایلگاس و همکاران (۱۹۹۰) انجام شد. در این روش تغییر جذب ناشی از مصرف H_2O_2 توسط آنزیم میلوپراکسیداز در طول‌موج ۴۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۵).

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی توتال پلازما توسط تست FRAP (Ferric reducing ability of plasma) و با استفاده از سوبسترای TPTZ در طول‌موج ۵۹۳ نانومتر اندازه‌گیری شد (۷). علاوه بر این، غلظت پروستاگلاندین E_2 (PGE_2) براساس روش ELISA و با استفاده از کیت ELISA (Assay Desighs Co, U.S.A) اندازه‌گیری شد.

به‌منظور بررسی بیان ژن COX-2 در بافت ریه، استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA (BioBasic Inc, RNA Canada) انجام شد. سپس، به‌منظور حذف DNA از RNA استخراج شده، از آنزیم DNase شرکت Thermo Scientific استفاده شد. به‌منظور 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، میزان معینی از RNA برای ساخت تمامی cDNAها استفاده گردید. برای ساخت cDNA از RNA استخراج شده، از کیت شرکت

بالغ دسترسی آزاد به غذا و آب آشامیدنی از طریق بطری داشتند. حیوانات به ۷ گروه تقسیم شدند:

۱) گروه کنترل منفی: تیمار با حلال اسانس نعنا (DMSO) و آب معمولی به مدت ۲ هفته به‌صورت خوراکی و ایجاد laparotomy در روز پانزدهم. ۲) گروه CLP: تیمار با حلال اسانس نعنا (DMSO) و آب معمولی به مدت ۲ هفته به‌صورت خوراکی و ایجاد مدل CLP در روز پانزدهم. گروه‌های تیمار: ۳ و ۴) گروه‌های تیمار حیوانات با غلظت‌های ۱۵ ppm و ۳۰ از DDW به مدت ۲ هفته به‌صورت خوراکی و ایجاد مدل CLP در روز پانزدهم. ۵ و ۶) گروه‌های تیمار اسانس نعنا در دوز 100 mg/kg bw به‌صورت خوراکی و همچنین تیمار هم‌زمان حیوانات با غلظت‌های ۱۵ ppm و ۳۰ از DDW روزانه به مدت دو هفته و ایجاد مدل CLP در روز پانزدهم. ۷) گروه کنترل مثبت: تزریق داروی ضدالتهابی ایندومتاسین (mg/kg ۲bw)، به مدت دو هفته و ایجاد مدل CLP (روش CLP). در دیواره شکمی رت‌های بی‌هوش شده برشی به‌اندازه ۲ سانتی‌متر ایجاد شد، سکوم خارج و از بخش سکوم تا زیر دریچه ایلئوسکال بخیه و در سکوم آنها ۲ سوراخ توسط نیدل G20 ایجاد گردید. سپس روده را به داخل محفظه شکمی برگردانده و پوست و صفاق بخیه زده شد. رت‌ها ۲۴ ساعت پس از جراحی CLP بی‌هوش شدند و از قلب آن‌ها خون‌گیری و سرم به‌وسیله سانتریفیوژ به‌منظور بررسی آنزیم FRAP و PGE_2 جدا گردید. در مرحله بعدی، حیوانات کشته‌شده و بافت ریه آن‌ها به‌منظور بررسی پارامترهای مربوط به آسیب اکسیداتیو (LP, GSH, GST, MPO) و بیان ژن COX-2 جدا و هموژن گردید.

همچنین، بافت ریه برای بررسی هیستوپاتولوژیک برداشته شد و در بافر فرمالین ۱۰ درصد فیکس گردید. برش‌های نازکی به ضخامت ۵-۶ میکرون از بافت بلوک شده در پاریفین تهیه و به روش H&E رنگ‌آمیزی شدند. سپس،

نتایج

براساس جدول ۱، سطح MDA به‌عنوان محصول لیپید پراکسیداسیون و آنزیم میلوپراکسیداز در بافت ریه رت‌های مبتلابه سپسیس (گروه CLP) افزایش می‌یابد ($P < 0/05$). تیمار رت‌های سپتیکی با آب تھی شده از دوتریوم در دوزهای ۱۵ و ۳۰ ppm به تنهایی و همزمان با اسانس باعث کاهش معنی‌دار سطح پراکسیداسیون لیپیدها می‌گردد که این کاهش در گروه تیمار شده با داروی ضدالتهابی ایندومتاسین نیز دیده می‌شود ($P < 0/05$). همچنین، سطح گلوکوتایون در گروه CLP نسبت به گروه کنترل کاهش می‌یابد ($P < 0/05$). تیمار رت‌های سپتیکی با DDW و اسانس نعا به‌صورت مجزا و باهم در هر دو دوز باعث افزایش معنی‌دار میزان گلوکوتایون می‌گردد که این افزایش در گروه تیمار شده با ایندومتاسین نیز دیده می‌شود ($P < 0/05$).

نتایج نشان می‌دهد که نه تنها بیماری سپسیس بلکه تیمار رت‌ها با اسانس نعا و DDW در تمام دوزها تأثیری بر روی آنزیم GST ندارد ($P > 0/05$). به‌علاوه، میزان FRAP در نمونه‌ی پلاسمای موش‌های سپتیکی، ۲۴ ساعت پس از ایجاد CLP کاهش و در گروه‌های تیمار هم‌زمان با اسانس نعا و DDW افزایش می‌یابد ($P < 0/05$) درحالی‌که آب فاقد دوتریوم به تنهایی در دوزهای ۳۰ و ۱۵ ppm تأثیری بر میزان FRAP ندارد ($P > 0/05$). همچنین ایندومتاسین نتایج مشابه با گروه‌های تیمار با DDW را در خصوص میزان FRAP نشان می‌دهد ($P > 0/05$).

از سوی دیگر، ایجاد سپسیس منجر به افزایش قابل‌ملاحظه سطح PGE2 در پلازما نسبت به گروه لاپاراتومی می‌شود ($P < 0/05$) و سطح این فاکتور در گروه‌های تیمار با آب تھی شده از دوتریوم در دوزهای ۱۵ و ۳۰ ppm، اسانس نعا همراه با آب در هر دو دوز به‌صورت معنی‌داری کمتر از گروه CLP می‌باشد ($P < 0/05$). همچنین در گروه کنترل مثبت (ایندومتاسین) نیز مقدار PGE2 کاهش می‌یابد ($P < 0/05$) (جدول ۲). علاوه بر این، نتایج نشان‌دهنده

تاکارا (Takara bio Inc, Japan) استفاده گردید. در ادامه به‌منظور تأیید انجام مراحل قبل، واکنش PCR برای ژن موردنظر انجام شد و سپس محصول حاصل بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد بارگذاری گردید.

به‌منظور انجام واکنش PCR و Real time PCR، از پرایمرهای اختصاصی ژن Cox-2 (F: 5'ACCTCTGCGATGCTCTTC3', R: 5'AGGAATCTCGGCGTAGTAC3') و (F: 5'TGCCAGCCTCGTCTCATAG3', R: 5'ACTGTGCCGTTGAACCTGCG3') استفاده شد. درنهایت، 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 می‌باشد که به‌عنوان مستر میکس مورد استفاده قرار می‌گیرد. هر واکنش Real time PCR (حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر) حاوی ۵ μl مستر میکس، ۰/۴ μl پرایمرهای Forward و Reverse، ۰/۵ μl cDNA و ۳/۹ μl آب عاری از Nuclease می‌باشد. به‌منظور اطمینان از صحت انجام واکنش، نمونه‌های حاوی ژن مورد آزمایش (COX-2) و نمونه حاوی ژن کنترل داخلی (GAPDH) در بلیت‌ها به‌صورت سه‌تایی ریخته شد. درنهایت، از چرخه حرارتی شامل ۳ مرحله، دناتوراسیون اولیه با دمای $95^{\circ}C$ به مدت ۲ دقیقه - ۴۰ سیکل دمایی شامل $95^{\circ}C$ به مدت ۱۵ ثانیه، $60^{\circ}C$ و $72^{\circ}C$ هرکدام به مدت ۲۰ ثانیه - طولی سازی نهایی با دمای $95-57^{\circ}C$ به مدت ۱۵ ثانیه، جهت انجام واکنش Real-Time PCR استفاده شد. به‌منظور محاسبه میزان تغییرات بیان ژن COX-2 از روش $\Delta\Delta CT$ استفاده گردید.

تفاوت‌های بین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و تست ANOVA تعیین گردید. با استفاده از این نرم‌افزار P-value داده‌ها، محاسبه گردید و $P < 0/05$ به‌عنوان تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شد.

افزایش میزان بیان ژن COX-2 در بافت ریه پس از القا سپسیس می‌باشد. گروه‌های مختلف تیمار نتایج مشابهی را در تعدیل بیان ژن COX-2 نشان می‌دهند و میزان بیان این

ژن را به‌صورت معنی‌داری کاهش و به سطح بیان آن در گروه کنترل منفی می‌رسانند ($P < 0.05$).

جدول ۱- سطح فاکتورهای دخیل در سیستم استرس اکسیداتیو/آنتی‌اکسیدان در بافت ریه

گروه‌ها	MDA (n mol/ mg protein)	GSH (n mol/ mg protein)	FRAP ($\mu\text{mol/L}$)	GST (n mol/min/ mg protein)	MPO (U/mg protein)
لاپاراتومی	8.52 ± 0.65	3.63 ± 0.36	40.7 ± 21.76	92 ± 4.65	24.66 ± 0.41
CLP	14.41 ± 0.93^a	2 ± 0.18^a	25.7 ± 10.98^a	95.33 ± 4.41	51.33 ± 0.4^a
DDW15	9.21 ± 0.78^b	3.06 ± 0.13^b	26.5 ± 15.54	115 ± 7.22	24.6 ± 0.67^b
DDW30	9.58 ± 0.83^b	3.88 ± 0.2^b	24.6 ± 9.7	97.33 ± 2.43	25.25 ± 0.69^b
اسانس+DDW15	8.91 ± 0.61^b	3.88 ± 0.29^b	42.0 ± 16.56^b	151 ± 3.33	23.16 ± 1.19^b
اسانس+DDW30	9 ± 0.6^b	3.47 ± 0.33^b	37.4 ± 6.7^b	132 ± 3.8	22.8 ± 1.59^b
ایندومتاسین	9.68 ± 0.35^b	3.5 ± 0.24^b	28.0 ± 18.2	92 ± 5.04	19.83 ± 1.53^b

علامت a نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه CLP بوده که با گروه لاپاراتومی معنی‌دار است ($P < 0.05$)
 علامت b نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه‌های مختلف تیمار بوده که با گروه CLP معنی‌دار هستند ($P < 0.05$). نتایج به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار (mean \pm SEM) بیان شده است

جدول ۲- نتایج حاصل از بیان ژن COX-2 و محصول آن (PGE2)

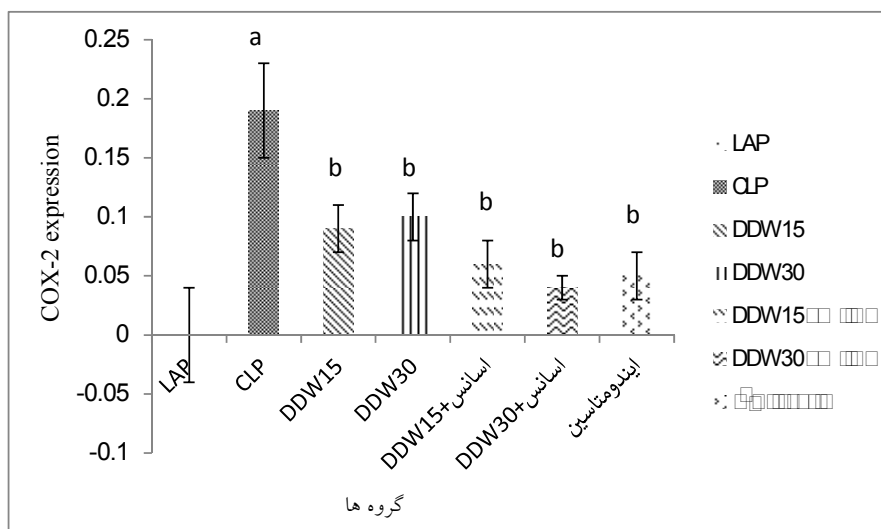
گروه‌ها	PGE2 (ng/ml)	COX-2 expression
لاپاراتومی	50.8 ± 26.7	0 ± 0.04
CLP	79.6 ± 20.7^a	0.19 ± 0.04^a
DDW15	58.4 ± 18.4^b	0.09 ± 0.02^b
DDW30	70.9 ± 18^b	0.10 ± 0.02^b
اسانس+DDW15	51.0 ± 25.8^b	0.06 ± 0.02^b
اسانس+DDW30	54.3 ± 40.3^b	0.04 ± 0.01^b
ایندومتاسین	53.6 ± 32.8^b	0.05 ± 0.02^b

علامت a نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه CLP بوده که با گروه لاپاراتومی معنی‌دار است ($P < 0.05$)
 علامت b نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه‌های مختلف تیمار بوده که با گروه CLP معنی‌دار هستند ($P < 0.05$). نتایج به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار (mean \pm SEM) بیان شده است

مطالعات هیستوپاتولوژیک بافت ریه نشان می‌دهد که در گروه کنترل (لاپاراتومی) خفیف‌ترین ضایعات بصورت پرخونی، ارتشاح نوتروفیل‌ها در بافت بینابینی و ادم التهابی بافت بینابینی رخ می‌دهد (شکل ۱- A). بیشترین آسیب بافت ریه در گروه رت‌های مبتلا به سپسیس (گروه CLP) مشاهده می‌گردد. در این گروه، بافت ریه در بازرسی ظاهری (ماکروسکوپی) دچار پرخونی است. در بررسی هیستوپاتولوژیک نیز پرخونی شدید دیده می‌شود. ادم

(margination)، بافت ریه هیپرسولولار به نظر می‌رسد. تمام این تغییرات نشان‌دهنده وقوع ذات‌الریه بینابینی حاد در بافت‌های ریه می‌باشد (شکل ۱- B). همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، در گروه CLP، ادم التهابی، ارتشاح نوتروفیل، پرخونی و ذات‌الریه در بافت‌های بینابینی بطور معنادار نسبت به گروه کنترل ایجاد می‌شود.

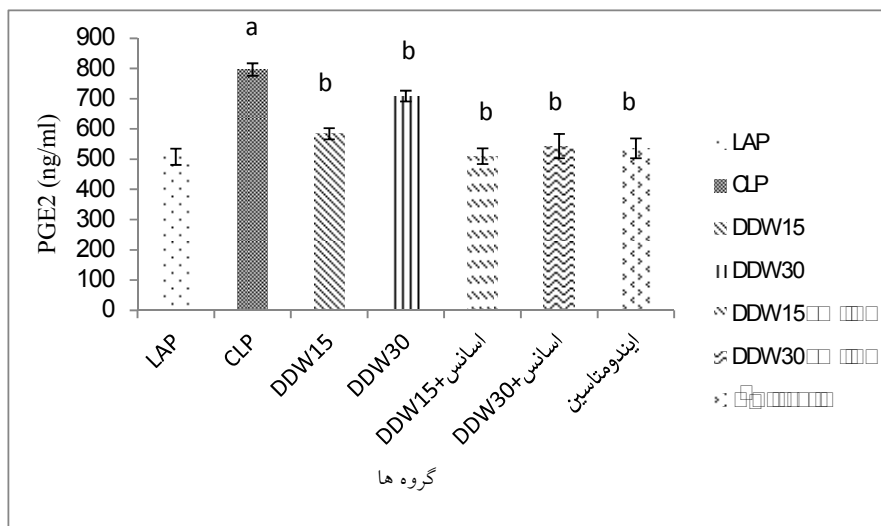
شدید بافت بینابینی باعث گسترش دیواره همبند بین لوبولی می‌گردد. همچنین ادم بینابینی و پیرامون عروقی و خونریزی‌های کانونی در این گروه دیده می‌شود. دیواره آئینول‌های ریوی ضخیم شده و به دلیل هایپرتروفی ماکروفاژهای درون عروقی و بینابینی ریوی و نیز بدلیل نفوذ و حاشیه‌نشینی نوتروفیل‌ها در دیواره سیاهرگ‌ها



نمودار ۱- نتایج حاصل از بیان ژن COX-2 در بافت ریه

علامت a نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه CLP بوده که با گروه لاپاراتومی معنی‌دار است ($P < 0.05$)

علامت b نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه‌های مختلف تیمار بوده که با گروه CLP معنی‌دار هستند ($P < 0.05$)



نمودار ۲- غلظت پروستاگلاندین E2 در پلاسما

علامت a نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه CLP بوده که با گروه لاپاراتومی معنی‌دار است ($P < 0.05$)

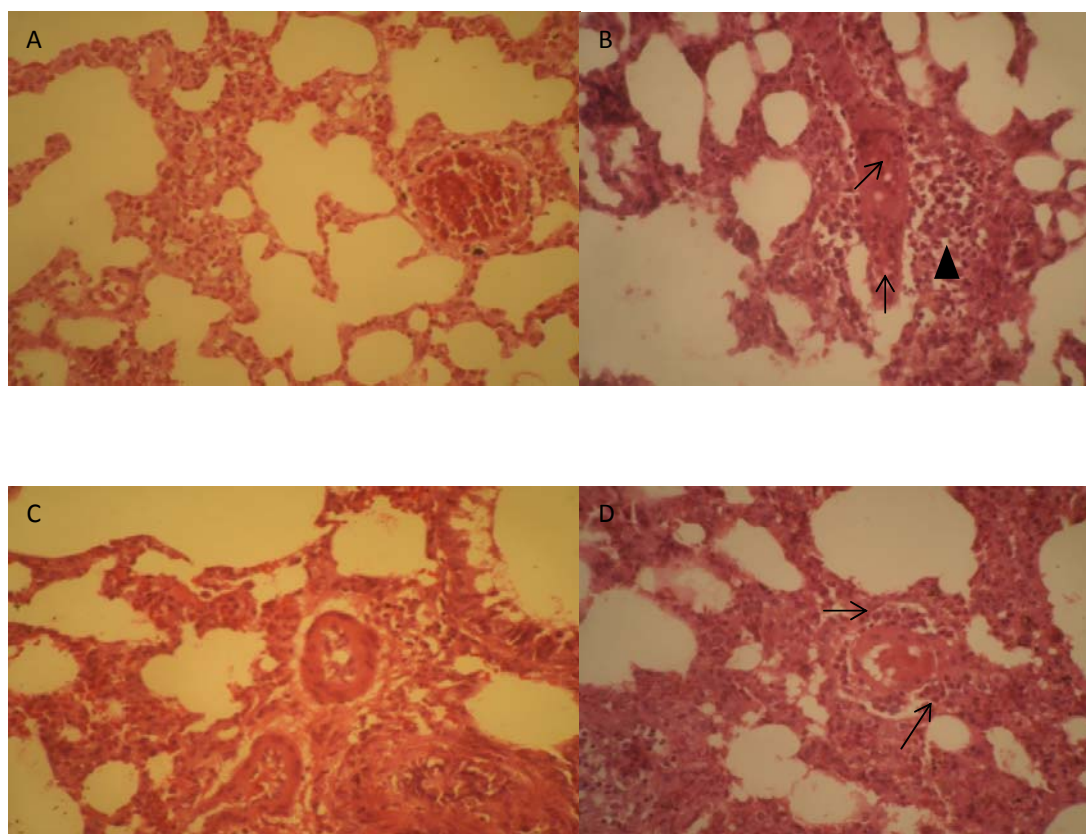
علامت b نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه‌های مختلف تیمار بوده که با گروه CLP معنی‌دار هستند ($P < 0.05$)

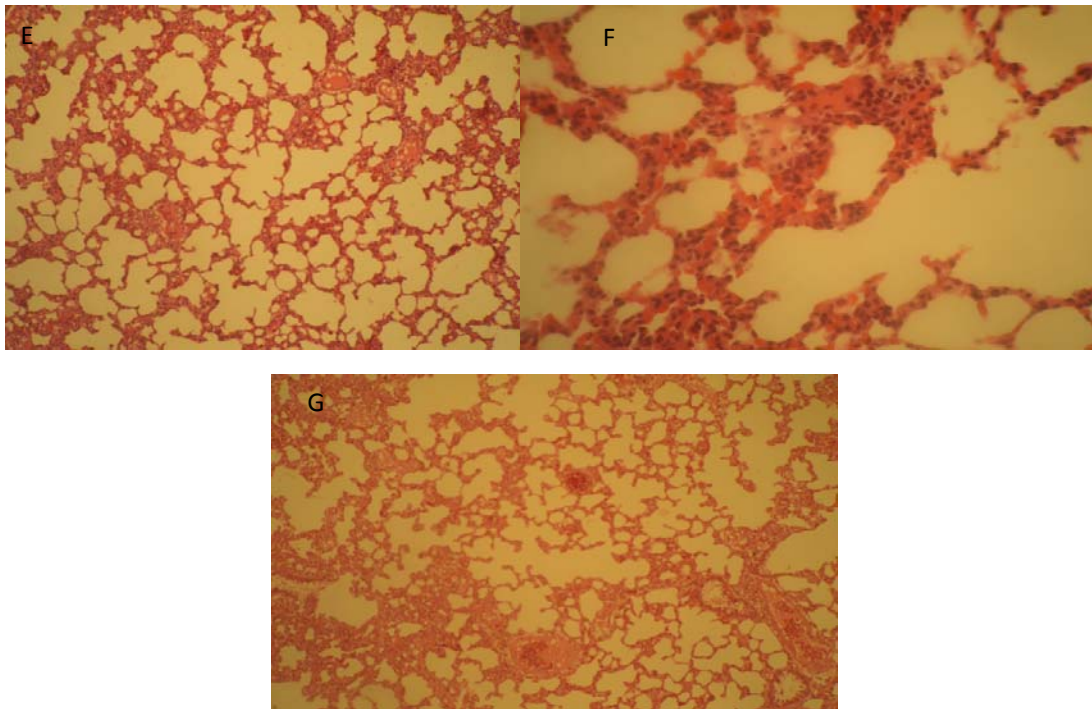
گروه‌های تیمار با اسانس نعنا همراه با آب تھی شده از دوتریوم در هر دو دوز (شکل ۱- E, F) می‌توانند بطور معنادار باعث کاهش ادم، شدت ذات‌الریه بینابینی، ارتشاح نوتروفیل‌ها و پرخونی گردند (شکل ۱ C, E) (جدول ۳). در گروه تیمار شده با ایندومتاسین، هیچ‌گونه پرخونی و ادم با بزرگنمایی ۱۰۰ مشاهده نشد (شکل G۱).

جدول ۳- میانگین و خطای استاندارد مقادیر عددی شاخص‌های آسیب‌شناسی در گروه‌های مختلف مطالعه

گروه‌ها	ادم التهابی	ارتشاح نوتروفیل	پرخونی	شدت ذات‌الریه بینابینی
لاپاراتومی	۱/۶ ± ۰/۴	۰/۸ ± ۰/۳	۱ ± ۰	۱/۱ ± ۰/۲
CLP	۳/۱ ± ۰/۱ ^a	۳/۵ ± ۰/۳ ^a	۳/۵ ± ۰/۲ ^a	۳/۲ ± ۰/۱ ^a
DDW15	۱/۵ ± ۰/۱ ^b	۱ ± ۰ ^b	۱/۴ ± ۰/۲ ^b	۲/۲ ± ۰/۳
DDW30	۳/۱ ± ۰	۳ ± ۰	۳ ± ۰	۳/۴ ± ۰/۲
اسانس+DDW15	۱/۷ ± ۰/۱ ^b	۱/۸ ± ۰/۳ ^b	۲ ± ۰ ^b	۱/۶ ± ۰/۲ ^b
اسانس+DDW30	۲/۲ ± ۰/۱	۲/۴ ± ۰/۲ ^b	۲/۸ ± ۰/۲	۱/۶ ± ۰/۲ ^b
ایندومتاسین	۲/۳ ± ۰/۴	۲/۵ ± ۰/۳	۲/۸ ± ۰/۴	۲/۶ ± ۰/۴

a: دارای اختلاف معنادار با گروه لاپاراتومی، b: دارای اختلاف معنادار با گروه CLP. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (mean ± SEM) بیان‌شده است.





شکل ۱- A) گروه لاپاراتومی LAP: پرخونی و ادم ملایم بافت بینابینی و عدم مشاهده نوتروفیل در بافت ریه با بزرگنمایی $400\times$ (B) گروه CLP: پرخونی شدید، ادم و التهاب وسیع بافت بینابینی ریه (تجمع آستین‌دار نوتروفیل‌ها در اطراف سیاهرگ (سر پیکان)، مرز نشینی نوتروفیل‌ها در مجاور آندوتلیوم سیاهرگ (پیکان‌ها)) با بزرگنمایی $400\times$ (C, D) گروه DDW در دوزهای ۱۵ و ۳۰ ppm: عدم مشاهده پرخونی و ادم در دوز ۱۵ و تجمع آستین‌دار نوتروفیل‌ها در اطراف رگ خونی (پیکان‌ها) با بزرگنمایی $400\times$ (E, F) گروه اسانس نعنا در دوز 100 mg/kg b.w هم‌زمان با آب تھی شده از دوتریوم در دوز ۳۰ و ۱۵ ppm: عدم مشاهده پرخونی، ادم و ارتشاح نوتروفیل در بافت بینابینی و اطراف عروق خونی با بزرگنمایی $100\times$ (E $100\times$ G F 400* گروه ایندومتاسین: عدم مشاهده پرخونی و ادم با بزرگنمایی $100\times$ *)

بحث و نتیجه‌گیری

التهاب حاد ریوی یکی از عوارض مزمن سپسیس است که در نهایت منجر به مرگ بیماران مبتلا به سپسیس می‌شود (۱۱). به همین دلیل جلوگیری از سپسیس و عوارض ناشی از آن به خصوص آسیب ریوی حاصل از سپسیس از اهمیت زیادی برخوردار است.

در این مطالعه به منظور بررسی اثرات حفاظتی، آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی آب تھی شده از دوتریوم و اسانس نعنا به صورت تنها و ترکیبی بر روی بیماری سپسیس در سیستم *in vitro* از یک مدل تجربی التهابی در رت (CLP) که نسبت به سایر مدل‌های التهابی برتری دارد، استفاده گردید. این مدل در حیوانات مختلف قابل انجام

است، اما در جوندگان از جمله رت و موش بسیار ساده بوده و به فراوانی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. ایجاد مدل سپسیس توسط جراحی CLP بسیار کم‌هزینه و سریع می‌باشد و استاندارد کردن آن نیز آسان است (۱۶). از طرف دیگر در مدل CLP، سپسیس از طریق شیفت میکروارگانیزم‌ها و باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی از لومن روده‌ای به جریان خون ایجاد می‌شود. افزایش بار میکروبی از طریق فعال‌سازی مسیرهای دخیل در استرس اکسیداتیو در سپسیس منجر به القاء استرس اکسیداتیو گردیده که در نهایت منجر به آسیب ارگان‌های بدن می‌گردد (۱۶).

بنابراین، باتوجه به عوامل تأثیرگذار در ایجاد سپسیس می‌توان راهکارهای درمانی را تعیین کرد که یکی از بهترین

بالای رادیکال‌های آزاد مخصوصاً پراکسیدها نقش کلیدی در بیماری‌زایی تعدادی از بیماری‌ها مانند دیابت، بیماری‌های قلبی عروقی، سرطان، پیری و انواع بیماری‌های دیگر دارد (۳). مطالعات متعددی ثابت کرده‌اند که میزان محصولات پراکسیداسیون لیپیدها در بیماران مبتلا به سپسیس افزایش می‌یابد (۳۰). این گزارشات تأییدی بر نتایج به‌دست‌آمده در تحقیق حاضر می‌باشند و همچنین نشان‌دهنده‌ی نزدیک بودن شرایط بالینی بیماران به مدل به‌کاررفته در این تحقیق است. از طرفی، گلوتاتیون، یک آنتی‌اکسیدان آمینواسیدی است که عامل فعال آن گروه HS (تیول) می‌باشد. این ترکیب هم در خون و هم در بافت‌ها یافت می‌شود و یکی از نقش‌های آن، جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها در غشاء‌های بیولوژیکی می‌باشد. گلوتاتیون می‌تواند به طور مستقیم یا به‌عنوان سوبسترای آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون S- ترانسفراز در سم‌زدایی پراکسید هیدروژن، لیپید هیدروپراکسیدها و ترکیبات الکتروفیلیک شرکت نماید (۲۸).

این داده‌ها (MPO, GSH, LP) 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، ۱، ۳۶).

علاوه‌براین، نتایج حاصل از تیمار رت‌ها در بررسی مارکرهای آسیب اکسیداتیو در بافت ریه نشان می‌دهد که آب تهی شده از دوتریوم در دو دوز ۱۵ ppm و ۳۰ و ترکیب آن با اسانس نعنا در دوز ۱۰۰ mg/kg bw باعث مهار تغییر پارامترهای فوق در رت‌های مبتلا به سپسیس در ۲۴ ساعت پس از CLP می‌گردد (جدول ۱). به‌علاوه، نتایج حاصل از داروی شناخته شده ضدالتهابی ایندومتاسین - که

آن‌ها کاهش سطح بار میکروبی و کاهش عوامل استرس اکسیداتیو و التهابی است. درمان‌های رایج سپسیس شامل استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای کاهش بار میکروبی، همچنین تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی توسط داروهای مختلف می‌باشد. به‌علاوه داروهای ضدالتهابی با کاهش واکنش‌های التهابی ناشی از سپسیس می‌تواند باعث تعویق یا درمان بیماری گردد. گیاهان دارویی و محصولات طبیعی منبع ارزشمندی از عوامل درمانی بوده و امروزه هنوز هم یک موضوع مهم برای شناسایی داروهای جدید هستند (۲۲ و ۲۷).

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 گلوتاتیون) از شاخص‌های وضعیت سیستم استرس اکسیداتیو می‌باشند که در سپسیس به دلیل نقص در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی دچار اختلال می‌شوند (۸). اولین مشاهدات در آسیب اکسیداتیو بافتی حاصل از سپسیس افزایش سطح LP در بافت ریه همراه با افزایش فعالیت آنزیم MPO و کاهش سطح GSH در گروه CLP نسبت به گروه کنترل می‌باشد ($P < 0.05$) (جدول ۱). در سپسیس، آنزیم میلوپراکسیداز با استفاده از H_2O_2 باعث تولید واسطه‌های فعالی می‌گردد که این واسطه‌ها پراکسیداسیون لیپیدها را افزایش می‌دهند (۳۱). آنزیم MPO نقش بسیار مهمی را در شروع پراکسیداسیون لیپیدها در سیستم *in vivo* ایفاء می‌کند. علاوه بر آن، شروع پراکسیداسیون لیپیدها و تشکیل ایکوزانوئیدهای فعال فرایندهای مهمی در التهاب هستند (۴۸). در مطالعه‌ای، اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی MPO به‌عنوان بیومارکر در پاسخ التهابی در بیماران با SIRS و سپسیس گزارش شده است (۲۳). همچنین، MDA به‌عنوان مارکر استرس اکسیداتیو، آخرین محصول تجزیه لیپیدها است. حضور

بازگشت سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پلاسما (FRAP) به حالت نرمال می‌شود (جدول ۱) ولی تیمار با آب تهي شده از دوتریوم به تنهایی در هر دو دوز تغییری بر میزان این فاکتور ایجاد نکرد (جدول ۱). همانطور که اشاره شد یکی از روش‌های رایج اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های بیولوژیک، استفاده از روش FRAP است که در سال ۱۹۹۶ توسط بنزی و همکارانش معرفی شد (۷). مطالعه‌ای نشان داده است که در بیماران مبتلا به شوک سپتیک، میزان FRAP و فاکتورهای دخیل در آن مثل اسید اوریک و بیلی‌روبین متناسب با شدت سپسیس افزایش می‌یابد (۵).

همچنین، نتایج حاصل از تحقیق نشان می‌دهد که ایجاد سپسیس تأثیری بر آنزیم GST ندارد (جدول ۱). GST مسئول سم‌زدایی ترکیبات کارسینوژنیک و سایتوتوکسیک از طریق کونژوگه کردن آنها با گلوکوتایون می‌باشد. به دلیل آنکه بسیاری از مواد سمی و مضر از طریق کونژوگه شدن با گلوکوتایون غیرفعال می‌شوند، گاهی نقص در عملکرد GST می‌تواند باعث حساس شدن بافت‌های بدن به مواد سمی و کارسینوژن‌های شیمیایی شود. در واقع نقش ایزوآنزیم‌های مختلف GST، محافظت از سلول در مقابل صدمات اکسیداتیو از طریق ترکیب متابولیت‌های فعال سموم و داروها با گلوکوتایون می‌باشد (۱۷).

از طرفی مهار ژن COX-2 به‌عنوان یک راهکار درمانی مؤثر برای پیشگیری از التهاب و آسیب‌های بافتی حاصل از آن معرفی شده است (۴۱). COX-2 نقش مهمی در پاتوژنز التهاب بازی می‌کند و به‌طور قابل‌توجهی توسط محرک‌های التهابی که منجر به افزایش سنتز پروستاگلندین‌ها (واسطه‌های التهابی قوی) در بافت‌های التهابی می‌شود، تشدید می‌گردد. PGE2 فراوان‌ترین پروستاگلندین در بافت‌های التهابی است که از آراشیدونیک اسید طی فعالیت COX-2 ایجاد می‌شود (۱۴). بررسی این پارامتر دخیل در فرایند التهاب در گروه CLP نشان داد که افزایش بیان ژن

در این تحقیق به‌عنوان گروه کنترل مثبت استفاده شده است- همانند گروه‌های تیمار می‌باشد. نتایج بررسی‌های هیستوپاتولوژیک نیز تأثیر تیمارهای مختلف در تعدیل آسیب‌های بافتی را تأیید می‌کنند (شکل ۱). 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 پر اکسیداسیون لیپیدها گردیده که در نتیجه سلول را در مقابل آسیب اکسیداتیو بافتی محافظت می‌کند. بنابراین کاهش معنی‌دار در میزان مالون دی‌آلدهید بافت ریه ($P < 0.05$) در رت‌های تیمار شده همزمان با کاهش قابل‌ملاحظه در میزان فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز نشان‌دهنده نقش محافظتی این ترکیبات در جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها است. به‌عبارت‌دیگر، جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها در بافت ریه به‌واسطه مهار فعالیت آنزیم MPO توسط اسانس نعنا و DDW می‌تواند یکی از مکانیسم‌های دخیل در اثر محافظتی این ترکیبات در جلوگیری از آسیب بافتی باشد. این نتیجه با گزارش ارائه‌شده توسط ویلا مبنی بر نقش محافظتی گلوکوتایون در سپسیس مطابقت دارد (۴۳). همچنین، فاطمی و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که اسانس زیره دارای اثر محافظتی در مدل تجربی سپسیس بر روی MPO، GSH و LP می‌باشد (۱۱). مطالعه‌ی دیگری نشان داد اسانس گلپر می‌تواند کبد را در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از سمیت داروها محافظت نماید (۲). در مطالعات قبلی نیز رسولی و همکاران اثر آنتی‌اکسیدانی DDW را در محافظت از کبد در برابر سمیت مواد نشان دادند (۳۲). همچنین بررسی دیگری حاکی از آن است که در رت‌های مبتلا به سپسیس، ۱۶ ساعت پس از CLP در دو بافت کبد و ریه محصول پر اکسیداسیون لیپیدها افزایش می‌یابد (۳۶).

از سوی دیگر، نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه نشان داد که میزان FRAP در نمونه‌ی پلاسماي موش‌های سپتیکي، ۲۴ ساعت پس از ایجاد CLP کاهش می‌یابد و تیمار رت‌ها با اسانس هم‌زمان با DDW در هر دو دوز باعث افزایش و

استرس اکسیداتیو در گسترش آسیب‌های بافتی ناشی از التهاب نقش مهمی دارند (۱۰). همچنین نتایج حاصل از بررسی بیان ژن COX-2 و PGE2 در بافت ریه نشان می‌دهد که تیمار آب فاقد دوتریوم در دوز ۱۵ ppm و ۳۰ و ترکیب اسانس و DDW باعث تعدیل بیان این ژن و محصول آن (PGE2) در رت‌های مبتلا به سپسیس در ۲۴ ساعت پس از CLP می‌گردد. شایان 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 (۹).

COX-2 در رت‌های سپتیکی، منجر به افزایش تولید PGE2 و در نتیجه افزایش سطح آن در پلاسما می‌شود که در نهایت منجر به آسیب بافتی در ریه می‌گردد (جدول ۲، نمودار ۱ و ۲). در سپسیس و التهاب حاد، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و واکنش بین انواع سایتوکین‌های پیش التهابی و ضدالتهابی باعث ازکارافتادن بسیاری از ارگان‌ها و در نهایت مرگ می‌گردد (۱۰). در این بیماری، اجزاء مهمی از فرایندهای پاتولوژیکی دست‌به‌دست هم می‌دهند تا نوتروفیل‌ها را برای آزادسازی یک سری از واسطه‌هایی که در تخریب سلول‌های نرمال نقش دارند، تحریک کنند. مطالعات نشان می‌دهند که القاء ژن COX-2 با تشدید

منابع

- دادخواه، ا.، فاطمی، ف.، محمدی ملایری، م. ر.، رسولی، آ.، کاروین آشتیانی، م. ح.، موسوی، ز.، و نایب ص.، ۱۳۹۷. تأثیر اسانس نعنا بر روی استرس اکسیداتیو و بیان ژن COX-2 در پیشگیری از سپسیس، مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. جلد ۳۱، شماره ۴، صفحه ۵۶۷-۵۸۱.
- دادخواه، الف.، خلج، ق.، فاطمی، ف.، دینی، س.، نایب، ص.، و فدایی منفرد، م.، ۱۳۹۵. بررسی اثر محافظتی اسانس گلپر (*Persicum Heracleum*) در مسمومیت حاد کبدی ناشی از استامینوفن در موشهای نژاد ویستار، مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۲۹، شماره ۳، صفحه ۲۹۲-۳۰۶.
- Ahmadvand, H., Amiri, H., Dalvand, H., and Bagheri, S., 2014. Various antioxidant properties of essential oil and hydroalcoholic extract of *Artemisa persica*, Journal of Birjand University of Medical Sciences, 20 (4), PP: 416-424.
- Aksoy, A. N., Toker, A., Celik, M., Aksoy, M., Halici, Z., and Aksoy, H., 2014. The effect of progesterone on systemic inflammation and oxidative stress in the rat model of sepsis, Indian Journal of Pharmacology, 46, PP: 622-626.
- Andresen, M., Regueira, T., Bruhn, A., Perez, D., Strobel, P., Dougnac, A., and et al., 2008. Lipoperoxidation and protein oxidative damage exhibit different kinetics during septic shock. Mediators Inflamm 16 p.
- Barishev, M. G., Dzhimak, S. S., Frolov, V. U., Bolotin, S. N., and Dolgov, M. A., 2013. Technologies for obtaining deuterium depleted water. International Journal of Engineering Research and Applications, 3, PP: 523-526.
- Benzie, I. F., and Strain, J. J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay, Analytical Biochemistry, 239(1), PP: 70-6.
- Cherian, S., Jameson, S., Rajarajeswari, C., Helena, V., Latha, L., Anu Rekha, M. R., and et al., 2007. Oxidative stress in sepsis in children. Indian Journal of Medical Research, 125(2), PP: 143-8.
- Crofford, L. J., Lipsky, P. E., Brooks, P., Abramson, S. B., Simon, L. S., and Van de Putte, L. B., 2000. Basic biology and clinical application of specific cyclooxygenase-2 inhibitors, Arthritis & Rheumatology, 43(1), PP: 4-13.
- Esmaili, B., Rezaee, S. A. R., Layegh, P., Tavakkol Afshari, J., Dye, P. h., Ghayoor Karimiani, E., and et al., 2011. Expression of IL-17 and COX2 Gene in Peripheral Blood Leukocytes of Vitiligo Patients. Iran Journal Allergy Asthma Immunology, 10(2), PP: 81-89.
- Fatemi, F., Allameh, A., Khalafi, H., and Ashrafihelan, J., 2010. Hepatoprotective effects of g-irradiated caraway essential oils in experimental sepsis. Applied Radiation and Isotopes, 68, PP: 280-285.
- Ghaderi, P., Ahmadi, R., Balkanyian, F., Moridikyia, A., Mahdavi, E., and Tavakoli, P., 2014. In-vitro antibacterial activity of buniun persicumand *Mentha longifolia* against *Bacillus*

- subtilis and *Staphylococcus aureus*. International Conference on Chemical, Agricultural and Medical Sciences (CAMS-2014) May 2-3, 2014 Antalya (Turkey).
13. Habig, W. H., Pabst, M. J., and Jakoby, W. B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), PP: 7130-9.
 14. Harirforoosh, S., Asghar, W., and Jamali, F., 2013. Adverse Effects of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs: An Update of Gastrointestinal, Cardiovascular and Renal Complications. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 16(5), PP: 821-847.
 15. Hillegass, L. M., Griswold, D. E., Brickson, B., and Albrightson- Winslow, C., 1990. Assessment of myeloperoxidase activity in whole rat kidney, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 24, PP: 285-95.
 16. Hubbard, W. J., Choudhry, M., Schwacha, M. G., and Kerby, J. D., 2005. Cecal ligation and puncture. *Shock* 24, PP: 52-57.
 17. Jaitovitch-Groisman, I., Fotohi, N., Schecter, R. L., and Woo, A., 2000. Modulation of glutathion-s-transferase alpha by hepatitis Bvirus and the chemopreventive drug Oltipraz, *Journal of Biological Chemistry*, 275(43), PP: 33395-403.
 18. Juncal, V. R., Neto, L. A. D., Camelier, A. A., Messeder, O. H. C., and Farias, A. M. D. C., 2011. Clinical impact of sepsis at admission to the ICU of a private hospital in Salvador, *Brazilian Journal of Pulmonology*, 37(1), PP: 85-92.
 19. Kamatou, G. P. P., Viljoen, A. M., Gono-Bwalya, A. B., Van Zyl, R. L., Van Vuuren, S. F., Lourens, A. C. U., and et al., 2005. The in vitro pharmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species, *Journal of Ethnopharmacology*, 102, PP: 382-90.
 20. Keller, S. A., Paxian, M., Lee, S. M., Clemens, M. G., and Huynh, T., 2005. Kupffer Cell Ablation Attenuates Cyclooxygenase-2 Expression after Trauma and Sepsis, *Journal of Surgical Research*, 124, PP: 126-133.
 21. Krempels, K., Somlyai, I., Somlyai, G. 2008. A retrospective evaluation of the effects of deuterium depleted water consumption on 4 patients with brain metastases from lung cancer. *Integrative Cancer Therapies* 7: 172-81.
 22. Kinghorn, A. D., Pan, L., Fletcher, J. N., and Chai, H., 2011. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs, *Journal of Natural Products*, 74, PP: 1539-1555.
 23. Kothari, N., Keshari, R. S., Bogra, J., Kohli, M., Abbas, H., Malik, A., and et al., 2011. Increased myeloperoxidase enzyme activity in plasma is an indicator of inflammation and onset of sepsis, *Journal of Critical Care*, 26(4), 435 p.e1-7.
 24. Kovacs, A., Guller, I., Krempels, K., Somlyai, I., Janosi, I., Gyongyi, Z., and et al., 2011. Deuterium Depletion May Delay the Progression of Prostate Cancer, *Journal of Cancer Therapy*, 2, PP: 548-556.
 25. Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S., and Moss, M., 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000, *The New England Journal of Medicine*, 348(16), PP: 1546-54.
 26. Nelson, S. D., 1995. Mechanisms of the formation and disposition of reactive metabolites that can cause acute liver injury, *Drug Metabolism Reviews*, 27, PP: 147-177.
 27. Newman, D. J., and Cragg, G. M., 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010, *Journal of Natural Products*, 75, PP: 311-335.
 28. Nordberg, J., and Arner, E., 2001. Reactive oxygen species, antioxidant, and the mammalian thioredoxin system, *Free Radical Biology & Medicine*, 31(11), PP: 1287-312.
 29. Olariu, L., Petcu, M., Cuna, S., Tulcan, C., Gravila, C., Petrovici, S., and et al., 2010. Deuterium Depleted Water Behavior in Chromium (VI) Intoxicated Female rats, *Journal of Biotechnology*, 1, 72 p.
 30. Ortolani, O., Conti, A., De Gaudio, A. R., Moraldi, E., Cantini, Q., and Novelli, G., 2000. The effect of glutathione and N-acetylcysteine on lipoperoxidative damage in patients with early septic shock. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161(6), 1907 p.
 31. Podrez, E. A., Abu-Soud, H. M., Stanley, L., and Hazen, S. L., 2000. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(12), PP: 1717-1725.
 32. Rasooli, A., Fatemi, F., Akbarzadeh, K., Dini, S., Bahreman, S. H., 2016. Synergistic protective activity of deuterium depleted water (DDW) and satreja rechingeri essential oil on hepatic oxidative injuries induced by acetaminophen in rats, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(5), PP: 1086-1101.

33. Razavi, S. M., Zarrini, G., and Molavi, G., 2012. The evaluation of some biological activity of *Mentha longifolia* (L.) Huds growing wild in Iran, *Pharmacologia* 3(10), PP: 535-538.
34. Saeidi, S., Hassanpour, K., Ghamgosha, M., Heiat, M., Taheri, R. A., Mirhosseini, A., and et al., 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 Journal Trop Biomed* 4(12), PP: 972-975.
35. Seldak, J., and Lindsay, 1986. Estimation of total protein bound and non-protein sulfidryl groups in tissue with Elman, s reagent. *Analytical Biochemistry*, 25, PP: 192-205.
36. Şener, G., Toklu, H., Ercan, F., and Erkanli, G., 2005. Protective effect of b-glucan against oxidative organ injury in a rat model of sepsis, *International Immunopharmacology*, (2005) 5, PP: 1387-96.
37. Sharma, R. A., Dalglish, A. G., Steward, W. P., and O'byrne, K. J., 2003. Angiogenesis and the immune response as targets for the prevention and treatment of colorectal cancer (Review), *Oncology Reports*, 10, PP: 1625-1631.
38. Stanisavljević, D. M., Stojičević, S. S., Dorđević, S. M., Zlatković, B. P., Veličković, D. T., Karabegović, I. T., and et al., 2012. Antioxidant activity, the content of total phenols and flavonoids in the ethanol extracts of *Mentha longifolia* (L.) Hudson dried by the use of different techniques, *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 18(3), PP: 411-420.
39. Stearns-Kurosawa, D. J., Osuchowski, M. F., Valentine, C., Kurosawa, S., and Remick, D. G., 2011. The pathogenesis of sepsis, *Annual Review Of Pathology-Mechanisms Of Disease*, 6, PP: 19-48.
40. Strong, V. E. M., and Mackrell, P. J., 2000. Concannon E. M, Naama H. A, Schaefer P. A, Shaftan G. W, Stapleton P. P, Daly J. M, Blocking prostaglandin E2 after trauma attenuates pro-inflammatory cytokines and improves survival, *Shock* 14, PP: 374-9.
41. Surh, Y. J., Chun, K. S., Cha, H. H., Han, S. S., Keum, Y. S., Park, K. K., and et al., 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation, *Mutation Research*, 480(481), PP: 243-68.
42. Unnithan, C. R., Gebreselassie, H., Sushen, U., Reddy, D. N., Woldu, A., and Muuz, M., 2013. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Mentha longifolia* L of Mekole, Ethiopia, *Journal of Biological and Scientific Opinion*, 1(3), PP: 151-153.
43. Villa, P., Saccani, A., and Sica, A., 2002. Glutathione protects mice from lethal sepsis by limiting inflammation and potentiating host defense, *Journal of Infectious Diseases*, 185, PP: 1115-20.
44. Wang, H., Liu, C., Fang, W., and Yang, H., 2012. Research progress of the inhibitory effect of deuterium-depleted water on cancers, *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 32(10), PP: 1454-6.
45. Wang, H. L., Li, Y. X., Niu, Y. T., Zheng, J., Wu, J., Shi, G. J., and et al., 2015. Observing anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of glycyrrhizin through regulating COX-2 and pro-inflammatory cytokines expressions in mice, *Inflammation* 38, PP: 2269-2278.
46. Wills, E. D., 1969. Lipid peroxide formation in microsomes: General consideration, *Biochemical journal*, 113, PP: 315-324.
47. Zargari, A., 1990. *Medicinal Plants*, (4nd edn), Tehran University Publications, PP: 14-18.
48. Zhang, R., Brennan, M. L., Shen, Z., MacPherson, J. C., Schmitt, D., Molenda, C. E., and et al., 2002. Myeloperoxidase Functions as a Major Enzymatic Catalyst for initiation of Lipid Peroxidation at Sites of Inflammation, *Journal of Biochemistry*, 277(48), PP: 46116-22.

Considering the anti-inflammatory and antioxidant activities of DDW and *Mentha longifolia* E.O on pulmonary damage induced by CLP

Rasooli A.¹, Fatemi F.², Mohammadi Malayeri M.R.³, Hajhosseini R.¹, Vaziri A.¹, Mosavi Z.⁴, Foroutanrad M.¹ and Otadi S.¹

¹ Dept. of Biochemistry, Faculty of Sciences, Payame-e-Noor University, Tehran, I.R. of Iran

² Materials 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 Physiology, Faculty of Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, I.R. of Iran

Abstract

Sepsis is a major cause of morbidity and mortality in patients in the intensive care unit. Despite new supportive treatments and administration of high potent antibiotics, sepsis is overwhelmingly one of the risky factors in patient's life. So, the purpose of this study is to investigate the effects of Deuterium Depleted Water (DDW) and *M. longifolia* essential oils (E.Os) on septic rats induced by CLP (Cecal Ligation and Puncture). Therefore, rats were divided into 7 groups: negative control (Laparotomy), CLP, treatment groups with DDW (15 and 30 ppm), adjuvant with *M. longifolia* E.O (100 mg/kg b.w) and positive control group (indomethacin). Then, 24h after CLP induction, oxidative injury parameters and the expression of COX-2 gene in lung tissue were measured. The data indicated that sepsis induction reduced GSH, FRAP and increased LP, MPO, PGE2 and COX-2 gene but didn't affected GST. Treatments of rats with DDW and E.Os alone and together as well as indomethacin have been effective in increasing the GSH, FRAP and decreasing the LP, MPO, PGE2 and COX-2. Histopathological examinations indicated that sepsis caused lung tissue damage and this damage decreased by DDW and E.O treatment. So sepsis causes oxidative lung tissue damage and the using of deuterium depleted water and *Mentha longifolia* can prevent injuries through modulation the oxidative stress/antioxidant parameters.

Keywords: Sepsis, *Mentha longifolia* essential oil, Deuterium Depleted Water, Anti-inflammatory activity, oxidative Stress