مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال نهم، شماره سوم، پیاپی سی و پنجم، زمستان ۱۳۹۹ (۱۷-۱۱)

فعالیت ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی آسپرین در مدل حیوانات سپتیکی با نگاهی بر آنزیم‌های کبدی

فریبا یغموری[۱*]، رضا حاجی حسینی[۲]، سید مهرداد کسایی[۳]، بهرام سیفی زارعی[٤]

۱. دکتری بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲. استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران
۳. استادیار بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشگاه ازاد اسلامی، واحد همدان
٤. پژوهشگر و فوق تخصص بیماری‌های گوارش و کبد، همدان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۹)

چکیده

Sepsis یک واکنش سیستمیک بدن در برابر میکروارگانیسم‌های تهاجمی مانند باکتری‌ها و قارچ‌ها و همچنین به‌عنوان یک پاسخ سیستماتیک به عفونت‌های شدید بوده است و یکی از ده علت اصلی مرگ و میر در بین بیماران بستری در بیمارستان است. چندین داروی احتمالی مورد بررسی قرار گرفته است، اما هنوز هیچ‌یک از داروهای مؤثر شناخته‌شده برای بیماری سپسیس به‌طور جدی منظور نشده است. بنابراین، اثر آسپرین به‌عنوان یک داروی ضدالتهاب غیراستروئیدی (NSAID) در درمان و کاهش سپسیس مؤثر است. برای این منظور از الگوی التهابی تجربی در این مطالعه استفاده شده است، به این منظور موش‌ها به چهار گروه (٤ نفره) تقسیم شدند. گروه اول گروه کنترل، گروه دوم گروه LAP (لاپاراتومی)، گروه سوم گروه CLP و گروه چهارم گروه درمان با آسپرین با دوز ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت خوراکی یک بار در روز به مدت ٤٨ ساعت پس از القای CLP در موش‌ها و سپس نمونه خون از قلب آنها جمع‌آوری شد. در مرحله بعد، حیوانات کشته‌شده و بافت کبد برای مطالعات بافت‌شناسی و بیوشیمیایی از هم جدا می‌شود. بافت کبد، جدا شده و برای آزمایش بیان ژن COX2 از روش Real Time pCR استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آنوا انجام شد. P<۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار تلقی می‌شود. نتایج ما نشان داد که درمان حیوانات مبتلا به آسپرین در تنظیم پارامترهای آنتی‌اکسیدانی و التهابی مؤثر است. همچنین یافته‌ها حاکی از آن است که در بافت کبد، آسپرین بیشترین تأثیر را در کاهش بیان ژن دارد. مطالعات پاتولوژیک همچنین نشان داد که سپسیس باعث آسیب به بافت کبد می‌شود که با این روش‌ها می‌توان این آسیب‌ها را کاهش داد. سرانجام، سپسیس باعث آسیب اکسیداتیو در بافت کبد می‌شود و استفاده از آسپرین در پیشگیری و بهبود این آسیب‌ها مؤثر است.

واژه‌های کلیدی: آسپرین، استرس اکسیداتیو، بیان ژن COX2، سپسیس، CLP.

Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity of Aspirin in Septic Animal Model and with a Look at Liver enzymes Evaluation

Fariba Yaghmori[1*], Reza Hajihosseini[2], Seyed Mehrdad Kassaee[3], Bahram Sefizarei[4]
1. Ph. D. in Biochemistry, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
2. Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Payame Noor University, Tehran, Iran
3. Assistant Professor of Biochemistry, Department of Biology, Islamic Azad University, Hamedan Branch, Hamedan, Iran
4. Researcher, Gastroenterologist and Hepatologist Middle East Liver Disease Center, Hamedan, Iran

(Received: Jan. 21, 2020 - Accepted: Dec. 29, 2020)

Abstract

Sepsis is a systemic body reaction to invasive microorganisms such as bacteria and fungi. It has also been a systemic response to severe infections and is one of the top ten main causes of death among all patients admitted to the hospital. Multiple potential drug therapies have been investigated, but as yet there is no known effective pharmacological treatment for sepsis. Therefore, the effect of aspirin as a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) in the treatment and reduction of sepsis effects on parameters involved in oxidative damage to liver tissue has been investigated. For this purpose, the experimental inflammatory model was used in this study, that the mice were divided into four groups (4 people). The first group - control group, the second group-LAP group (laparotomy), the third group-CLP group; Group 4 - Aspirin treatment group with a dose of 2 mg / kg body weight orally once a day for 48 hours after induction of CLP in rats, then blood samples were collected from their hearts. In the next step, the animals are killed and the liver tissue is separated for histological and biochemical studies. Separated liver tissue, to test for COX2 gene expression; The Real-Time PCR technique was used. Statistical analysis was performed using SPSS software and Anova test. P<0.05 is considered statistically significant. The results showed that the treatment of animals with aspirin is effective in regulating antioxidant and inflammatory parameters. Also, the findings indicate that in liver tissue, aspirin has the greatest effect on reducing gene expression. Pathological studies have also shown that sepsis causes damage to liver tissue that can be reduced by these methods. Finally, sepsis causes oxidative damage to liver tissue and the use of aspirin is effective in preventing and improving these injuries.

Keywords: Aspirin, CLP, COX2 Gene Expression, Oxidative Damage, Sepsis.

* نویسندهٔ مسئول: فریبا یغموری Email: faribayaghmori@yahoo.com

مقدمه

کبد، بزرگترین غده بدن است که وظایف تولید، انبارکردن و دفع مواد را به‌عهده دارد. در طول پروسه سپسیس، کبد نقش مهمی در پاسخ‌های دفاعی به از بین بردن باکتری‌های مهاجم و محصولات آنها و ایجاد واسطه‌های التهابی دارد. این عضو با فعالیت‌های متابولیکی متنوع خود در هنگام بروز سپسیس و عفونت‌های سیستمیک با تنظیم سیستم دفاع ایمنی از طریق تولید سیتوکین و سازگاری متابولیک با التهاب نقش اصلی رادارد (Lee *et al*., 2015; Strand *et al*., 2017).

اختلال در عملکرد کبد، باعث بروز عوامل خطرزا در بیماران مبتلا به سپسیس بستری در بخش مراقبت‌های ویژه می‌شود و در نهایت، منجر به از کارافتادن اندام‌های مختلف و مرگ می‌شود. بنابراین کاهش آسیب کبدی و احیای عملکرد کبد می‌تواند سبب کاهش میزان مرگ و میر ناشی از سپسیس شود.

سپسیس با اختلال در عملکرد اعضای بدن که در اثر پاسخ میزبان به عفونت ایجاد می‌شود، خطرناک است (Lee *et al*., 2015; Strnad *et al*., 2017).

سپسیس یک مشکل مهم پزشکی در سراسر دنیا است و شایعترین علت مرگ در بین بیماران است (Seymour *et al*., 2016).

امروزه مطالعات مختلف روی مدل‌های حیوانی انجام شده است، برای تعمیم به انسان، باید تمام نتایج به‌دست‌آمده در مدل‌های حیوانی در بیماران مبتلا به سپسیس مورد آزمایش قرار گیرند. مدل‌های حیوانی التهابی مختلفی به‌منظور تحقیق در زمینه سپسیس وجود دارند از جمله:

۱- مدل التهابی پرده صفاق تزریق: مواد مدفوعی یا ارگانیسم‌های زنده به حفره صفاق

۲- مدل رقابت آندوتوکسینی: تزریق آندوتوکسین یا ارگانیسم زنده به حیوان

۳- مدل ارگانیسم‌های زنده: تزریق ارگانیسم‌های زنده به حیوان

۴- التهاب در اندام‌های انتهایی، قرار دادن مواد خارجی آلوده در بافت‌های نرم اندام‌های انتهایی

۵- مدل تزریق اندوتوکسین لیپوپلی ساکارید

۶- مدل عفونت چندمیکروبی: تزریق چندین میکروب مختلف (Hubbard *et al*., 2005).

۷- مدل CLP.

اما، از بین همه مدل‌ها، الگوی بستن و سوراخ‌کردن سکوم (CLP) یک عمل جراحی و یک مدل استاندارد طلایی برای القای سپسیس است (Ruize *et al*., 2016).

دلیل استفاده گسترده از CLP تطبیق‌پذیری آن با شدت سپسیس در عفونت‌های حاد و مزمن است (Benjamim *et al*., 2004.).

داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی (NSAIDs) معمولاً برای درمان درد و تب مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما نقش آنها در طی عفونت‌های باکتریایی بحث‌برانگیز است. استیل سالیسیلیک اسید (آسپیرین) یک مهارکننده غیرانتخابی آنزیم سیکلواکسیژناز (COX) است که در معرض متابولیسم قابل‌توجهی در فاز اول قرار دارد و بیشتر عملکرد آن در گردش پورتال کبد رخ می‌دهد (Legras *et al*., 2009; Le Turnier *et al*., 2017; Floyd & Ferro, 2014). با توجه به اهمیت کبد به‌عنوان یک اصلاح‌کننده و هدف از سپسیس و در متابولیسم دارو، در این مطالعه سعی شده است تا تأثیر آسپیرین بر آسیب کبدی ناشی از سپسیس گزارش شود.

مواد و روش‌ها

طراحی مطالعه و حیوانات

در این روش تجربی سپسیس با استفاده از مدل تجربی القایی CLP القاشده و تعداد ۶۰ رت ویستار با وزن متوسط ۱۵۰±۳۰ گرم از مراکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی از انستیتو پاستور ایران خریداری و در یک محیط کنترل‌شده (۱۲ ساعت چرخه نور/ تاریک با دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۵۰٪) نگهداری

شدند. غذای حیوانات از کارخانه‌های فراورده‌های غذایی تهران تهیه شد که به‌صورت Pellet با فرمول استاندارد بوده و حیوانات بالغ نیز از طریق بطری، دسترسی آزاد به غذا و آب آشامیدنی داشتند. آزمایش حیوانات مطابق کمیته اخلاقی و مراقبت‌های لازم از حیوانات و رهنمودهای اخلاقی انجام شد.

موش‌ها به چهار گروه زیر تقسیم شدند:

۱. گروه کنترل بدون عمل جراحی و تیمار دارویی

۲. گروه لاپاروتومی LAP، (انجام جراحی لاپاراتومی بدون CLP)

۳. گروه CLP جراحی CLP

۴. گروه CLP با تیمار آسپرین (به‌صورت خوراکی با دوز ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) تقسیم شدند.

برای جراحی CLP، در این روش، پس از بیهوش کردن رت‌ها توسط مخلوط کتامین ۱۰٪) ماده بیهوشی (و زایلوزین ۲٪) ماده بی‌حسی در دیواره شکمی آنها به اندازه ۲cm برش ایجاد شد. سپس به آرامی با خارج‌کردن سکوم به‌وسیله پنبه سواپ و با فشار انگشت، مدفوع درون سکوم به انتها انتقال داده شد و در ادامه به بخش سکوم تا زیر دریچه ایلئوسکال توسط نخ بخیه ۳-۰، بخیه زده شد و در سکوم) بدون آسیب دو سوراخ توسط سرسوزن 20 G ایجاد شد. بعد از این مرحله با برگرداندن روده به داخل محفظه شکمی، پوست و صفاق بخیه زده شد. در پایان، حیوانات به قفس برگردانده شدند و در محیط گرم با شرایط مناسب به هوش آمدند.

بعد از به هوش‌آمدن، آب و غذا به‌طور کامل در اختیار حیوانات قرار گرفت (Rasooli *et al*., 2018).

در گروه لاپاراتومی، سکوم از محفظه شکمی خارج و بدون جراحی، در محل قرار داده شد.

پس از ۴۸ ساعت، نمونه خون از طریق سوراخ قلب جمع‌آوری و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ گرم سانتریفیوژ شده و در بافر فسفات (۱۰۰ میلی‌متر، pH=۷) همگن شدند نمونه‌های کبد به سردکن منتقل شدند. سپس از نمونه‌ها برای اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی استفاده شد.

سطح MDA براساس روش Buege (1978) و Aust به روش اسپکتروفتومتری و مقدار GSH براساس روش Lindsay و Seldak اندازه‌گیری شد.

فعالیت MPO بافت با استفاده از روش Bradley *et al*. (1982) اندازه‌گیری شد. فعالیت‌های ALT، AST، ALP و بیلی‌روبین بر اساس پروتکل کیت‌های پارس آزمون در سرم مشخص و برای تعیین بیان ژن COX2، RNA کل از بافت کبد با استفاده از کیت GeneAll (ساخت کشور کره) جدا شد.

سنتز cDNA با استفاده از Prime Script TMRT طبق پروتکل کیت معرف Takara Bio Inc و آغازگرهای oligo dt پرایمر طبق پروتکل Takara Bio، Inc ژاپن) انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای PCR

به منظور بررسی کیفیت cDNA از واکنش‌های زنجیره‌ای PCR براساس (پروتکل کیت شرکت Amplicon Master Mix (SYBR® Green با استفاده از سیستم Real-PCR (Rotor Gene Q QIAGEN) هماتوکسیتین و ائوزین برای رنگ‌آمیزی بخش‌های کبدی به منظور بررسی بافت کبد استفاده شد و با میکروسکوپ Olympus CX31RBSF مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

چرخه آستانه (Ct) محاسبه شد و مقدار بیان mRNA برابر ژن خانه‌دار GAPDH به‌عنوان ژن کنترل مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه و تحلیل به‌صورت میانگین و خطای استاندارد میانگین و سطح معنی‌دار آماری (P>۰/۰۵) در نظر گرفته شد.

نتایج

در جدول‌های ۲ و ۳، سطح آنزیم اکسیداتیو MDA و MPO فعالیت، آنزیم‌های کبدی AST و ALT به‌طور قابل‌توجهی در گروه‌های CLP و LAP با گروه کنترل افزایش یافته است (P<۰/۰۵). همچنین، سطح GSH در گروه‌های CLP و LAP در مقایسه با گروه کنترل

کاهش یافته است (P<۰/۰۵). آسپرین با دوز ۲ میلی‌گرم / کیلوگرم باعث مهار سطح MDA، MPO و GSH و همچنین آنزیم‌های کبدی AST و ALT در مقایسه با گروه CLP شد. از طرف دیگر، سطح ALP و بیلی‌روبین حتی بعد از درمان، هیچ تغییر قابل‌توجهی در همه گروه‌ها نشان نداده‌اند (P>۰/۰۵، جدول ۱).

علاوه بر این، در مطالعه ما، بیان ژن COX2 در مقایسه با گروه کنترل و LAP در گروه CLP (شکل۱) افزایش یافته است. تجویز آسپرین بر موش‌ها نشان داد که بیان ژن COX2 به‌طور قابل‌توجهی کاهش می‌یابد (P<۰/۰۵، جدول ۱).

یافته‌های هیستوپاتولوژیک نشان داد که در گروه LAP میزان نفوذ خفیف نوتروفیل‌ها در پارانشیم کبد و مجاری پورتال وجود دارد (شکل B-۲)، در حالی‌که، در گروه CLP، احتقان شدید، نفوذ نوتروفیل‌ها در پارانشیم کبد و نکروز سلول‌های کبدی و آسیب هپاتوسلولار مشاهده می‌شود.

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده در سنجش

Primers	Sequence (5' ⟶ 3')	Product Length
COX2 forward	ACCTCTGCGATGCTCTTC	188 bp
COX2 reverse	AGGAATCTCGGCGTAGTAC	
GAPDH forward	TGCCAGCCTCGTCTCATAG	197 bp
GAPDH reverse	ACTGTGCCGTTGAACTTGC	

جدول ۲. نشانگرهای بیوشیمیایی در بافت کبد

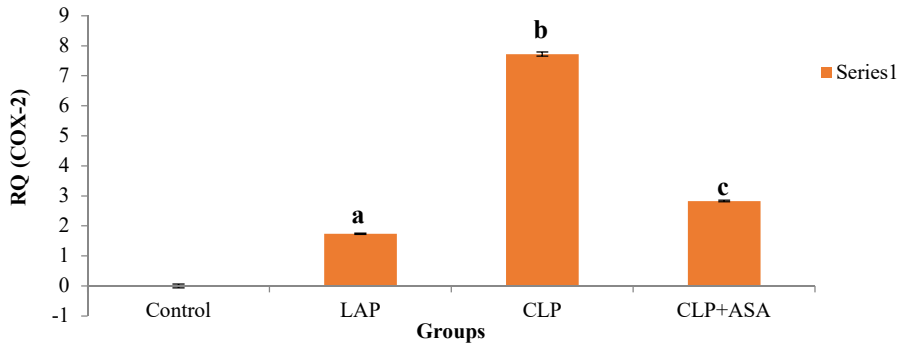
Groups	MDA	GSH	MPO
Control	7.23±0.78	14.33±0.75	6.32±0.3
LAP	10.48±1[a]	11.42±0.58[a]	9.43±0.6[a]
CLP	17.51±1.28[b]	7.21±0.67[b]	21.14±0.7[b]
CLP+ASA	11.23±0.45[c]	11.23±0.8[c]	8.25±0.3[c]

a) P<۰/۰۵ بین گروه کنترل و LAP در نظر گرفته می‌شود؛ b) P<۰/۰۵ بین گروه‌های LAP و CLP در نظر گرفته می‌شود؛ c) P<۰/۰۵ بین گروه‌های CLP و CLP آسپرین در نظر گرفته می‌شود؛ داده‌ها به‌صورت میانگین SD± ارائه می‌شوند.

جدول ۳. آنزیم کبدی

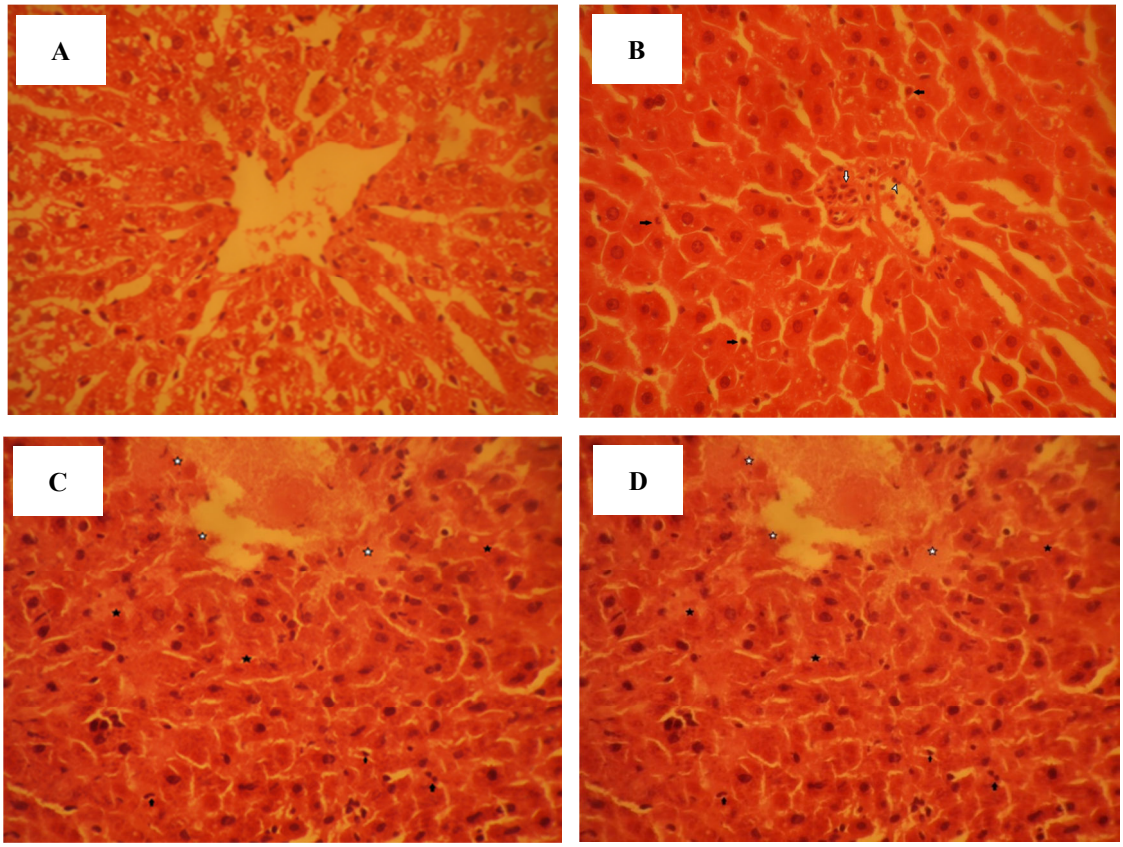
Groups	AST	ALT	ALP	Bilirubin
Control	94±8.6	53±6.17	32±0.2	0.51±0.02
LAP	120±9.58[a]	76±5.35[a]	37±0.3	0.54±0.03
CLP	217±13.58[b]	136±8.76[b]	39±0.3	0.6±0.02
CLP+ASA	131±8.76[c]	70±4.58[c]	38±0.3	0.58±0.03

a) P<۰/۰۵ بین گروه کنترل و LAP در نظر گرفته می‌شود؛ b) P<۰/۰۵ بین گروه‌های LAP و CLP به‌طور قابل‌توجهی در نظر گرفته می‌شود؛ c) P<۰/۰۵ بین گروه‌های CLP و CLP آسپرین در نظر گرفته می‌شود؛ داده‌ها به‌صورت میانگین SD± ارائه می‌شوند.



شکل ۱. بیان ژن COX2

(a) P<۰/۰۵ بین گروه کنترل و LAP در نظر گرفته می‌شود؛ b) P<۰/۰۵ بین گروه‌های LAP و CLP در نظر گرفته می‌شود؛ c) P<۰/۰۵ بین گروه‌های CLP و CLP آسپرین در نظر گرفته می‌شود؛ داده‌ها به‌صورت میانگین SD± ارائه می‌شوند.



شکل ۲. یافته هیستوپاتولوژیک
(گروه A) گروه کنترل؛ گروه B) LAP؛ گروه C) CLP؛ گروه D) تیمار با آسپرین CLP)

بحث و نتیجه‌گیری

استرس اکسیداتیو با تأثیر بر یکپارچگی سلولی با مکانیسم واکنش ROS و اسید چرب غیراشباع غشاهای سلولی و خارج سلولی نقش مهمی در سپسیس دارد (Crimi *et al.*, 2006)، که این امر منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی شده و باعث آزادشدن محصولات بسیار سمی از جمله MDA می‌شود. این مکانیسم به‌عنوان یکی از ساز و کارهای اساسی آسیب بافت ناشی از رادیکال‌های آزاد در نظر گرفته شده است (Wheeler, 2011). روند پراکسیداسیون لیپیدها با تولید بیش از حد MDA به‌طور کامل در سپسیس ثبت شده است که می‌تواند منجر به مرگ و میر افراد مبتلا شود (Gelaim *et al.*, 2011). از طرف دیگر، بر اثر فعال‌سازی استرس اکسیداتیو، نوتروفیل ROSهای مختلفی را از طریق میلوپراکسیداز (MPO) تولید می‌کنند که کاتالیزور تشکیل وابسته H2O2 اسید هیپوکلروز (HClO) است. H2O2 رادیکال هیدروکسیل را تشکیل می‌دهد که می‌تواند به‌طور مستقیم باعث پراکسیداسیون لیپیدها (LP) شود (El-Benna *et al.*, 2016; Jaganjac *et al.*, 2016). همچنین، آنزیم‌های کبدی AST و ALT به‌عنوان نشانگر آسیب‌های کبدی در نظر گرفته شده‌اند (Alonso *et al.*, 2014). نتایج آزمایش در جدول ۳ به روشنی نشان داد که سپسیس باعث افزایش آنزیم‌های کبدی در اثر آسیب کبدی می‌شود. این داده‌ها به‌همراه یافته‌های بافت‌شناسی (شکل ۲) تغییرات پاتوفیزیولوژیکی در بافت کبد را تأیید کردند. همچنین نشان داده شد که شرایط استرس اکسیداتیو در سپسیس رابطه مستقیمی با آسیب اندام و آسیب‌دیدگی در مدل CLP دارد. علاوه بر این، کار حاضر نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو و پاسخ پیش‌التهابی با هم در آسیب کبدی

که در سپسیس رخ می‌دهد نقش دارند (Toscano *et al*., 2011). مطالعه نشان داد که سپسیس می‌تواند رادیکال‌های بدون اکسیژن ایجاد کند. رادیکال‌ها منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو و نارسایی چند اندام مانند کبد و ریه شدند (Dadkhah *et al*., 2018a, b). یک مطالعه نشان داد، که CLP می‌تواند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را تغییر داده و PGE2 و COX2 را به‌عنوان یک عامل التهابی ۲۴ ساعت پس از CLP افزایش دهد. COX2 در پاسخ‌های التهابی نقش دارد و می‌تواند آسیب اکسیداتیو روی بافت ایجاد کند (Zhao *et al*., 2014). این مطالعه نشان داد که CLP می‌تواند بیان ژن CD177 و MPO را به‌عنوان یک عامل التهابی تغییر دهد. علاوه بر این، آسپرین در دوز ۲ میلی‌گرم/ کیلوگرم b.w می‌تواند با بازیابی غلظت ایده‌آل فاکتور التهابی و آنتی‌اکسیدان از کبد محافظت کند. فلوید و فرو (۲۰۱۴) اظهار داشتند که آسپرین با مهار COX2 می‌تواند فرایندهای سپسیس را دستکاری کند. مطالعه نشان داد که آسپرین در مدل‌های موش سپسیس با سالمونلا انتریتیدیس آندوتوکسین قبل از درمان، نتایج ما با یافته‌های بافت‌شناسی تأیید شد (شکل ۲) (Halushka *et al*., 1983).

آسپرین بیشترین اثر را در بافت کبد دارد. آسپرین با برگرداندن پراکسیداسیون لیپیدها، سطح MPO و GSH و بیان ژن COX2 به‌عنوان یک عامل التهابی، استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد.

REFERENCES

Alonso, A.; Misialek, J.R.; Amiini, Chen, L.Y.; Agarwal, S.K.; Loehr, L.R.; Soliman, E.Z.; Selvin, E.; (2014). Circulating levels of liver enzymes and incidence of atrial fibrillation: the Atherosclerosis Risk in Communities cohort. Heart; 100(19): 1511-1516.

Benjamim, C.F.; Hogaboam, C.M.; Kunkel, S.L.; (2004). The chronic consequences of severe sepsis. J Leukoc Biol.; 75: 408-412.

Crimi, E.; Sica, V.; Slutsky, A.S.; Zhang, H.; Williams-Ignarro, S.; Ignarro, L.J.; Napoli, C.; (2006). Role of oxidative stress in experimental sepsis and multisystem organ dysfunction. Free Radic Res.; 40: 665-672.

Dadkhah, A.; Fatemi, F.; Mohammadi Malayeri, M.R.; Rasooli, A.; Karvin Ashtiani, M.H.; (2018b). The effects of Mentha Spicata on oxidative stress and COX-2 gene expression in prevention of sepsis. J Mol Cell Res.; 31(4): 567-581.

Dadkhah, A.; Fatemi, F.; Rasooli, A.; Mohammadi Malayeri, M.R.; Torabi, F.; (2018a). Assessing the effect of Mentha longifolia essential oils on COX-2 expression in animal model of sepsis induced by caecal ligation and puncture. Pharm Biol.; 56(1): 495-504.

El-Benna, J.; Hurtado-Nedelec, M.; Marzaioli, V.; Marie, J.C.; Gougerot-Pocidalo, M.A.; Dang, P.M.; (2016). Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. Immunol Rev.; 273: 180-193.

Floyd, C.N.; Ferro, A. (2014). Mechanisms of Aspirin resistance. Pharmacol Ther, 141: 69-78.

Gelaim, D.P.; de Bittencourt Pasqual, M.A.; Comim, C.M.; Grunwald, M.S.; Ritter, C.; Damiani Tomasi, C.; Cascaes Alves, S.; Quevedo, J.; Dal-Pizzol, F.; Donsace Moreira, J.C.; (2011). Serum heat-shock protein 70 levels, oxidant status, and mortality in sepsis. Shock; 35: 466-470.

Hubbard, W.J.; Choudhry, M.; Schwacha, M.G.; Kerby, J.D.; (2005). Cecal ligation and puncture. Shock; 24(1): 52-57.

Jaganjac, M.; Cipak, A.; Schaur, R.J.; Zarkovic, N.; (2016). Pathophysiology of neutrophil-mediated extracellular redox reactions. Front Biosci (Landmark edition); 21: 839-855.

Le Turnier, P.; Boutoille, D.; Joyau, C.; Veyrac, G.; Asseray, N.; (2017). Bacterial infections and NSAIDs exposure? Seek septic complications. Eur J Case Rep Intern Med.; 41:e33-e34.

Lee, K.H.; Lee, J.; Lee, S.H.; (2015). 3D liver models on a microplatform: well-defined culture, engineering of liver tissue and liver-on-a-chip. Lab Chip; 15(19):3822-37.

Legras, A.; Giraudeau, B.; Jonville-Bera, A-P.; Camus, C.; François, B.; Runge, I. *et al*.; (2009). A multicentre case-control study of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as a risk factor for severe sepsis and septic shock. Crit Care; 13: R43.

Rasooli, A; Ghafari, E.; Saeidi, H.; Miri, S.; (2018). Expression changes of CD177 and MPO as novel biomarkers in lung tissue of CLP model rats. Turk J Med Sci.; 48(6): 1321-7.

Ruiz, S.; Vardon-Bounes, F.; Merlet-Dupuy, V.; Conil, J.M.; Buléon, M.; Fourcade, O.; Tack, I.; Minville, V.; (2016). Sepsis modeling in mice: ligation length is a major severity factor in cecal ligation and puncture. Intensive Care Med Exp.; 4(1): 22.

Seymour, C.W.; Liu, V.X.; Iwashyna, T.J.; Brunkhorst, F.M.; Rea, T.D.; Scherag, A.; Rubenfeld, G.; Kahn, J.M.; Shankar-Hari, M.; Singer, M. *et al*.; (2016). Assessment of clinical criteria for sepsis: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). Jama; 315(8): 762-774.

Strnad, P.; Tacke, F.; Koch, A.; Trautwein, C.; (2017). Liver-guardian, modifier and target of sepsis. Nat Rev Gastroenterol Hepatol; 14(1): 55.

Toscano, M.G.; Ganea, D.; Gamero, A.M.; (2011). Cecal ligation puncture procedure. J Vis Exp.; 7(51): e2860.

Wheeler, D.S.; (2011). Oxidative stress in critically Ill children with sepsis. Open Inflamm; J 4: 74-81.

Zhao, H.; Luo, F.; Li, H.; Zhang, L.; Yi, Y.; Wan, J.; (2014). Antinociceptive effect of tetrandrine on LPS-induced hyperalgesia via the inhibition of IKKβ phosphorylation and the COX-2/PGE2 pathway in mice. PloSOne; 9: e94586.