مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال هفتم، شماره سوم، پیاپی بیست و هفتم، زمستان ۱۳۹۷ (۱۶۲-۱۵۱)

ارزیابی فعالیت ضد التهابی ترکیب آب فاقد دوتریوم و اسانس گل محمدی علیه آسیب سپتیکی در موش صحرایی

فائزه فاطمی[۱*]، عباس گل بداق[۲]، رضا حاجی حسینی[۳]، کامبیز اکبرزاده[۴]

۱. دانشیار، پژوهشکده مواد و سوخت هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران
۲. دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانگاه پیام نور ، تهران، ایران
۳. استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، تهران، ایران
۴
۴پزشک عمومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۴ – تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱۰/۸)

چکیده

سپسیس، یکی از شایع ترین علل مرگ‌ومیر در میان بیماران تحت مراقبت های ویژه در سرتاسر جهان است. با توجه به عوارض ناشی از مصرف داروهای ضد التهابی، جایگزینی ترکیبات طبیعی در درمان سپسیس پیشنهاد می شود. تأثیر ترکیب آب فاقد دوتریوم (DDW) با اسانس گل محمدی بر روی پارامترهای دخیل در آسیب اکسیداتیو و بیان ژن سیکلواکسیژناز-۲ (*COX-2*) در بافت ریه مورد مطالعه قرار گرفت. ۱۰۰ موش صحرایی به‌طور تصادفی به ۵ گروه شامل گروه کنترل منفی (LAP)، گروه شاهد (CLP)، دو گروه تیمار ترکیب آب فاقد دوتریوم و اسانس گل محمدی (DDW15+EO و DDW30+EO) و گروه کنترل مثبت ایندومتاسین (IND) تقسیم شدند. سپس، سطوح فاکتورهای دخیل در استرس اکسیداتیو و بیان ژن *COX-2* در پلاسما و بافت ریه اندازه‌گیری شدند. سپسیس موجب کاهش سطوح آنتی اکسیدانت کل (FRAP) و گلوتاتیون (GSH) و افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدها (LP) و بیان ژن *COX-2* شده است، اما تیمار موش‌های صحرایی با ترکیب آب فاقد دوتریوم و اسانس گل محمدی به اندازه ایندومتاسین، در تعدیل سطوح این پارامترها مؤثر بوده است، بطوریکه سبب افزایش سطوح FRAP و GSH و کاهش سطوح LP و بیان ژن *COX-2*گردیده است. مطالعات پاتولوژی نیز نتایج بیوشیمیایی را تایید کرد. این مطالعه نشان می‌دهد که سپسیس موجب آسیب اکسیداتیو بافت ریه شده، اما کاربرد ترکیبات طبیعی چون آب فاقد دوتریوم و اسانس گل محمدی با تأثیر بر روی پارامترهای استرس اکسیداتیو و آنتی‌اکسیدانی می‌تواند در جلوگیری از این آسیب‌ها مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: آب فاقد دوتریوم، اسانس گل محمدی، ریه، سپسیس، ضد التهابی.

* نویسندهٔ مسئول: E-mail: ffatemi@aeoi.org.ir

Assessment of the anti-inflammatory activity of the combination of deuterium depleted water and *Rosa damascena* Mill. against septic injury in rats

Faezeh Fatemi[1*], Abbas Golbodagh[2], Reza Hajihosseini[3], , Kambiz Akbarzadeh[47]

1. Associate Professor, Materials and Nuclear Fuel Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran
2. Department of Biology Payame Noor University, Tehran, Iran
3. Professor, Faculty of Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran
4 Doctor, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Science, Mashhad, Iran

(Received: Sep. 26, 2018 - Accepted: Dec. 29, 2018)

Abstract

Sepsis is the most common reason of mortality among patients who are in the intensive care unit. Regarding to the side effects of the anti-inflammatory drug consumption, the replace of natural products are suggested in sepsis treatment. the effects of the combination of the deuterium depleted water (DDW) and *Rosa (R.) damascena* Mill. on the stress oxidative parameters and the gene expression of cyclooxygenase-2 (*COX-2*) in the lung and plasma tissues were investigated. 50 Rats were randomly divided into 5 groups: negative control (LAP), control group (CLP), two treatment groups with the combination of DDW and *R. damascena* Mill. essential oil (DDW15+EO and DDW30+EO) and positive control group with indomethacin (IND). Then, the levels of oxidative stress parameters and the expression of *COX-2* were estimated in plasma and lung tissue. The sepsis resulted in the decrease of ferric reducing antioxidant power (FRAP) and glutathione (GSH) levels along with the increase of lipid peroxidation (LP) and *COX-2* levels. However, the rats treated with the combination of deuterium depleted water and *R. damascena* Mill. essential oils as same as indomethacin were influenced on the regulation of those parameters through the evaluation of FRAP and GSH levels and the reduction of the LP level and *COX-2* gene expression. The pathological studies confirmed the biochemical consequences as well. The results indicated that the oxidative damages were caused by sepsis, but the administration of the natural products such as deuterium depleted water and *R. damascena* Mill. essential oils could improve the injures due to the effectiveness of oxidative stress and antioxidants parameters.

Keywords: Anti-inflammatory, Deuterium depleted water, Lung, *Rosa damascena* Mill. Essential oil, Sepsis.

مقدمه

سپسیس[1] یا عفونت، یک سندرم التهابی سیستمیک است که به‌دلیل پاسخ حاد سیستم ایمنی به

1. Sepsis

میکروارگانیسم یا سم آنها، در جریان خون رخ می‌دهد (Kumar & Sharma, 2010). این پاسخ از طریق سلول‌های ایمنی مثل نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها و ماکرو فاژها آغاز می‌شود (Matsuda *et al*., 2012). بی‌نظمی در این پاسخ منجر به آزاد شدن مقدار زیادی سایتوکین‌های پیش التهابی می‌شود که باعث اختلال عملکرد چندگانه اندام‌ها و در نهایت مرگ می‌گردد (Adib-Conquy & Cavaillon, 2007). تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد اکسیژن[1] و کاهش سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی را در پاتولوژی سپسیس بازی می‌کند (Xie *et al*., 2010). رادیکال‌های آزاد اکسیژن به‌وسیله نوتروفیل‌های فعال و ماکروفاژها در طول سپسیس تولیدشده و پاسخ التهابی را القا می‌کند که باعث آسیب ساختار غشای سلولی شد (Berg *et al*., 2011). در نهایت منجر به آسیب اکسیداتیو بسیاری از بافت‌های بدن از جمله قلب، کلیه و در نهایت از کار افتادن بافت‌ها می‌گردد (Basu & Eriksson, 2006). مدل التهابی CLP[2]، یک مدل تجربی برای ایجاد سپسیس می‌باشد که در حیوانات مختلف قابل انجام است، اما در جوندگان از جمله انواع موش بسیار ساده بوده و به فراوانی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. به کمک این مدل، می‌توان جنبه‌های مختلف سپسیس و شوک حاصل از آن را مورد بررسی قرار داد. در این مدل، عفونت در اثر نشت انواع میکروب‌های فلور روده-ای به داخل خون انجام شده که با تغییر تعداد و اندازه سوراخ‌ها، دوز میکروبی متغیر است (Hubbard *et al*., 2005).

امروزه استفاده از داروهای مختلفی از جمله داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی[3] و آنتی‌بیوتیک‌ها، نقش بسیار مهمی را در کاهش عوارض و یا درمان سپسیس ایفا می‌کنند، اما با توجه به عوارض ناشی از مصرف این داروها و نقش مهم استرس اکسیداتیو در عوارض ناشی از سپسیس، استفاده از ترکیبات طبیعی و آنتی‌اکسیدان‌ها در کاهش عوارض آن ها و التهاب، اهمیت ویژه ای پیدا کرده‌اند (Victor *et al*., 2004). آب سبک[4] یا آب فاقد دوتریوم، محصول طبیعی و بدون هیچ‌گونه عوارض جانبی می‌باشد که تاکنون اثرات بیولوژیکی متنوع آن نظیر آنتی‌اکسیدانی شناخته شده است (Olariu *et al*., 2007b; Mirica, 2010). در مطالعه‌ای، جایگزینی آب با آب فاقد دوتریوم در آب آشامیدنی موش‌ها، سرعت رشد تومورها را به‌طور معنی‌داری کاهش داد (Berdea *et al*., 2001). هم‌چنین آب فاقد دوتریوم، موجب ترمیم پوست، کاهش التهاب و کندی روند پیری می شود (Somlyai *et al*., 2010). از سوی دیگر، گل محمدی با نام علمی *Rosa damascena* Mill. متعلق به خانواده گل سرخ[5] می باشد که از اسانس و آب حاصل از تقطیر آن (گلاب)، به عنوان مواد معطر خوشبوکننده در صنایع عطرسازی، آرایشی، غذایی و نیز اثرات درمانی آن در صنایع دارویی استفاده می‌شود (Ghahreman, 1992; Mozaffaian, 1996). اسانس و گلاب گل محمدی از قدیم کاربردهای فراوانی داشته و به‌عنوان یک داروی گیاهی برای بیماری‌های اسهال، دردهای رماتیسمی و به عنوان داروی قابض به‌کار می‌رود. در گزارش اخیر ما، اسانس گل محمدی با ترکیبات اصلی Citronellol، Trans geraniol و Phenyle alcohol فعالیت ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی قابل قبولی را نشان داد (Dadkhah *et al*., 2019). به همین دلیل، در این تحقیق اثر ترکیب اسانس گل محمدی و آب فاقد دوتریوم، برای اولین بار، بر روی بیان ژن التهابی *COX-2*[6] و پارامترهای استرس اکسیداتیو/ آنتی‌اکسیدان در بافت ریه و پلاسما در موش‌های صحرایی[7] سپتیکی القاشده با مدل تجربی CLP مورد بررسی قرار گرفت.

1. Reactive oxygen species
2. Cecal Ligation and Puncture
3. NSAIDs
4. Deuterium depleted water
5. Rosaceae
6. Cyclooxygenase-2
7. Rat

مواد و روش‌ها

تهیه آب فاقد دوتریوم و اسانس گل محمدی

در این مطالعه از آب تهی شده از دوتریوم (تهیه شده از مجتمع آب سنگین اراک، سازمان انرژی اتمی ایران) و اسانس گل محمدی (خریداری شده از شرکت باریج اسانس (Batch No.:714043; Sample Serial No. AE932009) استفاده گردید.

تیمار حیوانات و نمونه‌گیری

در این تحقیق، از ۵۰ سر موش صحرایی نر بالغ با وزن متوسط ۱۵۰ گرم استفاده گردید که از مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی از انستیتوپاستور ایران خریداری شدند. موش‌های صحرایی به ۵ گروه به‌طور تصادفی تقسیم شدند:

۱) گروه شاهد (LAP): تیمار با حلال اسانس گل محمدی (DMSO) و آب معمولی به مدت ۲ هفته به صورت خوراکی و ایجاد لاپاراتومی[1] در روز پانزدهم.

۲) گروه کنترل منفی (CLP): تیمار با حلال اسانس گل محمدی (DMSO) و آب معمولی به مدت ۲ هفته به‌صورت خوراکی و ایجاد مدل CLP در روز پانزدهم.

۳) گروه تیمار ترکیب آب فاقد دوتریوم و اسانس گل محمدی DDW15+EO: تیمار حیوانات با اسانس گل محمدی در دوز ۱۰۰ mg/kg bw به‌صورت خوراکی و همچنین تیمار هم زمان حیوانات با غلظت۱۵ ppm آب فاقد دوتریوم، روزانه به مدت دو هفته و ایجاد مدل CLP در روز پانزدهم.

۴) گروه تیمار ترکیب آب فاقد دوتریوم و اسانس گل محمدی DDW30+EO: تیمار حیوانات با اسانس گل محمدی در دوز ۱۰۰ mg/kg bw به‌صورت خوراکی و همچنین تیمار هم زمان حیوانات با غلظت۳۰ ppm آب فاقد دوتریوم، روزانه به مدت دو هفته و ایجاد مدل CLP در روز پانزدهم.

۵) گروه کنترل مثبت ایندومتاسین (IND): تزریق داروی ضدالتهابی ایندومتاسین (۲mg/kg bw)، به مدت دو هفته و ایجاد مدل CLP.

القا سپسیس توسط مدل CLP

در این روش، پس از بی‌هوش‌کردن موش‌های صحرایی، در دیواره شکمی آنها به اندازه ۲ سانتی‌متر برش ایجاد می‌گردد. سپس، سکوم خارج شده و بخش سکوم تا زیر دریچه ایلئوسکال بخیه زده شده و در سکوم آن‌ها سوراخی ایجاد می‌گردد. بعد از این مرحله، روده به داخل محفظه شکمی برگردانده شده و پوست و صفاق بخیه زده می‌شود (Hubbard *et al*., 2005). موش‌های صحرایی، ۲۴ ساعت پس از جراحی CLP بیهوش شدند و از قلب آنها خونگیری شد. در مرحله بعدی، حیوانات کشته شده و بافت کبد و ریه آنها به منظور بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی و بیوشیمی جدا گردید.

تهیه هموژن بافت ریه

برای تهیه هموژن ۲۰ درصد (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 شد و محتویات لوله با حدود ۷ـ۵ بار بالا و پایین کردن هموژن می‌گردد.

اندازه‌گیری پراکسیداسیون چربی‌ها (LP)[2] در بافت ریه

میزان TBARS[3] به‌عنوان شاخص اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدها، با استفاده از معرف تیوباربیتوریک اسید (TBA) و جذب آن در مقابل

1. Laparotomy
2. Lipid peroxidation
3. Thiobarbitoric acid reactive substances

بلانک در ۵۳۵nm توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد (Buege *et al*., 1978).

اندازه‌گیری گلوتاتیون احیاء (GSH)[1] در بافت ریه

گلوتاتیون با استفاده از معرف Ellman's که با ترکیبی به نام دیتیونیتروبنزوئیک(DTNB) کمپلکسی را تشکیل داده که در طول موج ۴۱۲ nm توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد (Seldak & Lindsay, 1968).

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پلاسما (آزمون FRAP)[2]

این روش یک تکنیک حساس، تکرارپذیر و دقیق است. در این روش، غلظت‌های مختلف از محلول استاندارد یون آهن Fe^{2+} تهیه شد. سپس، محلول کار FRAP (محلول TPTZ و محلول استاندارد $FeCl_3$) به پلاسما و هم چنین محلول‌های استاندارد اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، میزان جذب نوری کلیه نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۳ nm در مقابل بلانک (غلظت صفر استاندارد) قرائت شده و میزان FRAP در نمونه‌های مجهول براساس منحنی استاندارد محاسبه گردید (Benzie *et al*., 1996).

اندازه‌گیری بیان ژن *COX-2* در بافت ریه

به منظور بررسی بیان ژن *COX-2* در بافت ریه، استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA (BioBasic Inc, Canada) انجام شد. سپس، به منظور حذف DNA از RNA استخراج شده، از آنزیم DNase شرکت Thermo Scientific استفاده گردید. 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. در نهایت، 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 به عنوان مسترمیکس مورد استفاده قرار می‌گیرد. هر واکنش Real time PCR (حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر) حاوی ۵ µL مسترمیکس، ۰/۴ µL پرایمرهای Forward و Reverse، ۰/۵ µL cDNA و ۳/۹ µL آب عاری از Nuclease می‌باشد. منظور اطمینان از صحت انجام واکنش، نمونه‌های حاوی ژن مورد آزمایش (*COX-2*) و نمونه حاوی ژن کنترل داخلی (*GAPDH*) در پلیت‌ها به‌صورت سه تایی ریخته شد. در نهایت، از چرخه حرارتی شامل ۳ مرحله، دناتوراسیون اولیه با دمای **C**° ۹۵ به مدت ۲ دقیقه، ۴۰ سیکل دمایی شامل **C**° ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰°C و ۷۲ °C هر کدام به مدت ۲۰ ثانیه، طویل سازی نهایی با دمای °C ۹۵–۵۷ به مدت ۱۵ ثانیه، جهت انجام واکنش Real-Time PCR استفاده شد. به منظور محاسبه میزان تغییرات بیان ژن *COX-2* از روش ΔΔ CT استفاده گردید (Kenneth *et al*., 2001).

مطالعه هیستوپاتولوژی

نمونه‌های بافتی ریه پس از جداسازی در محلول فرمالین بافر خنثی ۱۰ درصد تثبیت گردیده و در ادامه به‌روش متداول، از آنها قالب‌های پارافینی تهیه گردیده و با دستگاه میکروتوم به ضخامت ۴ میکرون برش داده شدند. نهایتاً برش‌های بافتی با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی‌شده و با میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی هیستوپاتولوژی قرار گرفتند.

همچنین، برای پی بردن به میزان تأثیر تیمارها، نمونه‌های آسیب شناسی به روش زیر مورد تحلیل کمی

1. Glutathione

2. Ferric reducing antioxidant power

قرار گرفتند. نمونه‌های هیستوپاتولوژی از لحاظ شاخص‌های پرخونی، ادم التهابی بافت‌های بینابینی و شدت ارتشاح نوتروفیل در بافت‌های بینابینی ریه مورد ارزیابی قرار گرفته و به‌روش زیر امتیازدهی شدند. آنالیز کمی برای محاسبه شاخص هیستولوژیکی شدت آسیب بافتی مورد استفاده قرار گرفت. شاخص شدت آسیب بافتی و میانگین تعداد نوتروفیل‌های نفوذ[1] یافته و حاشیه‌نشین[2] شده، از طریق شمارش تعداد سلول‌های التهابی چندهسته‌ای (پلی مورفونوکلیر) (نوتروفیل) در ده فیلد (میدان) میکروسکوپیک و محاسبه میانگین آنها برآورد گردید. شاخص هیستولوژیکی بر اساس شدت آسیب بافتی از ۰ تا ۴ درجه‌بندی شد، بدین صورت که عدد (درجه) صفر نشانگر تعداد ۰ تا ۹ نوتروفیل، عدد (درجه) ۱ نشان‌دهنده تعداد ۱۰ تا ۱۹ نوتروفیل، عدد (درجه) ۲ نشانه تعداد ۲۰ تا ۲۹ نوتروفیل، عدد (درجه) ۳ نشان‌دهنده تعداد ۳۰ تا ۳۹ نوتروفیل و نهایتاً عدد (درجه) ۴ نشانگر ۴۰ تا ۴۹ نوتروفیل نفوذیافته یا حاشیه‌نشین شده در هر میدان میکروسکوپیک بود. برای امتیازدهی به شاخص پرخونی و ادم بافت بینابینی مقیاس درجه‌بندی نیمه‌کمی مورد بهره گرفته شد، به‌طوری‌که 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 نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۱ و تست ANOVA تعیین گردید. با استفاده از این نرم‌افزار P-value داده‌ها، محاسبه گردید و P<۰/۰۵ به‌عنوان تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

تأثیر ترکیب آب فاقد دوتریوم و اسانس گل محمدی بر روی پارامترهای استرس اکسیداتیو/ آنتی اکسیدانت در مدل CLP

همان‌طورکه جدول ۱ نشان می‌دهد، سطح LP، شاخص اندازه گیری پراکسیداسیون لیپیدها، در بافت ریه موش‌های صحرایی مبتلا به سپسیس (گروه CLP) در مقایسه با گروه کنترل (لاپاراتومی) افزایش معنی‌داری داشته است (P<۰/۰۵).

ولی، تیمار موش‌های صحرایی در گروه‌های ترکیب آب فاقد دوتریوم و اسانس گل محمدی (DDW15+EO و DDW30+EO) باعث کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۵) میزان LP شده است. همچنین تیمار موش‌های صحرایی با ایندومتاسین نیز در دز ۲ mg/kg b.w منجر به کاهش معنی‌دار فعالیت این آنزیم‌ها در مقایسه با گروه CLP شده است (P<۰/۰۵) (جدول ۱).

بر اساس جدول ۱، میزان گلوتاتیون موش‌های صحرایی سپتیکی (گروه CLP)، ۲۴ ساعت بعد از القای سپسیس، نسبت به گروه کنترل (LAP) کاهش قابل توجه (P<۰/۰۵) داشته است. در حالی‌که، ترکیب آب فاقد دوتریوم و اسانس گل محمدی (DDW15+EO وDDW30+EO) سبب افزایش چشمگیر (P<۰/۰۵) غلظت گلوتاتیون گردید (P<۰/۰۵) که این نتیجه در گروه تیمار شده با داروی ایندومتاسین (گروه کنترل مثبت) نیز دیده شد (P<۰/۰۵).

جدول ۱. تأثیرآب فاقد دوتریوم و اسانس گل محمدی بر فاکتورهای استرس اکسیداتیو و آنتی‌اکسیدانت

گروه‌ها	FRAP (µmol/L)	GSH (n mol/mg protein)	LP (n mol/ mg protein)
LAP	۴۰۷±۲۱/۷۶	۳/۶۳±۰/۳۶	۸/۵۲±۰/۶۵
CLP	۲۵۷±۱۰/۹۸*	۲±۰/۱۸*	۱۴/۴۱±۰/۹۳*
DDW15+EO	۳۷۴±۷/۳۳**	۴/۴±۰/۲۲**	۸/۲۱±۰/۵۷**

1. Infiltration

2. Margination

DDW30+EO	۳۸۳±۶/۲**	۴/۲۲±۰/۳۳**	۸/۴۸±۰/۵۸**
IND	۲۸۰ ± ۱۸/۲	۳/۵ ± ۰/۲۴**	۹/۶۸ ± ۰/۳۵**

* نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه CLP بوده که با گروه لاپاراتومی معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

** نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه‌های مختلف تیمار بوده که با گروه CLP معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار (mean ± SEM) بیان شده است.

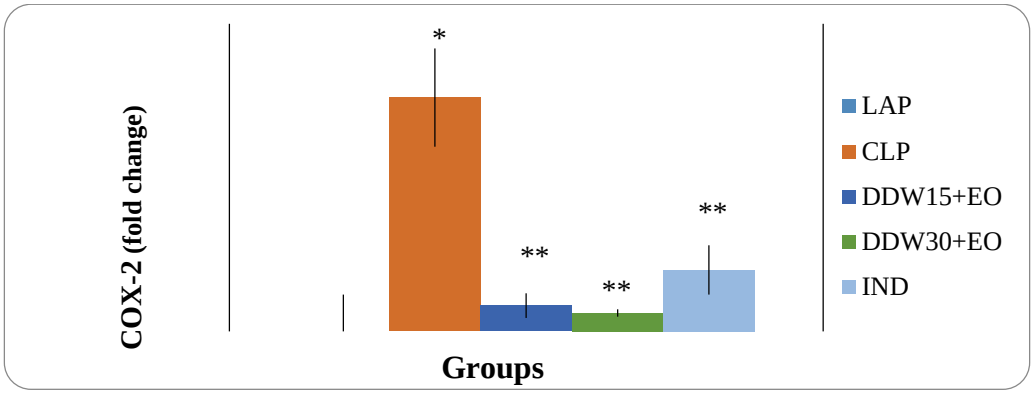
میزان آنتی‌اکسیدان کل در نمونه پلاسمای موش‌های سپتیکی، ۲۴ ساعت پس از ایجاد CLP کاهش یافت، اما تیمار موش‌های صحرایی همزمان با آب فاقد دوتریوم و اسانس گل محمدی (DDW15+EO و DDW30+EO)، سبب افزایش سطح آنتی اکسیدان کل و بازگشت آن‌ها به سطح گروه کنترل منفی گردیده است (P<۰/۰۵) که این نتیجه در گروه تیمار شده با داروی ایندومتاسین (گروه کنترل مثبت) نیز دیده شد (P<۰/۰۵).

تأثیر ترکیب آب فاقد دوتریوم و اسانس گل محمدی بر روی بیان ژن بیان ژن *COX-2* در مدل CLP

نتایج نشان‌دهنده (شکل ۱) افزایش میزان بیان ژن *COX-2* در بافت ریه پس از القا سپسیس بود که گروه‌های ترکیب آب فاقد دوتریوم و اسانس گل محمدی (DDW15+EO و DDW30+EO) و گروه کنترل مثبت نیز نتایج مشابهی را در تعدیل بیان این ژن نشان دادند و میزان بیان این ژن را به صورت معنی داری به سطح کنترل منفی رساندند (P<۰/۰۵)، که این نتیجه در گروه تیمارشده با داروی ایندومتاسین (گروه کنترل مثبت) نیز دیده شد (P<۰/۰۵).

نتایج هیستوپاتولوژیکی بافت ریه

مطالعه هیستوپاتولوژیک بافت ریه نشان داد که در گروه کنترل (LAP) خفیف‌ترین ضایعات به صورت پرخونی، ارتشاح نوتروفیل‌ها در بافت بینابینی و ادم التهابی بافت بینابینی مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۱. تأثیرترکیب آب فاقد دوتریوم و اسانس گل محمدی بر بیان ژن *COX-2*

* نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه CLP بوده که با گروه لاپاراتومی معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

** نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه‌های مختلف تیمار بوده که با گروه CLP معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار (mean ± SEM) بیان شده است.

بیشترین آسیب بافت ریه در گروه رت‌های مبتلا به سپسیس (گروه CLP) مشاهده می‌گردد. در این گروه، بافت ریه در بازرسی ظاهری (ماکروسکوپیک) دچار پرخونی است. در بررسی پاتولوژی نیز پرخونی شدید دیده می‌شود. ادم شدید بافت بینابینی باعث گسترش

دیواره همبندی بین لوبولی[1] می‌گردد. همچنین، ادم بینابینی و پیرامون عروقی[2] و خونریزی‌های کانونی در این گروه دیده می‌شود. دیواره آلوئول‌های ریوی ضخیم شده و به‌دلیل هایپرتروفی ماکروفاژهای درون عروقی و بینابینی ریوی[3] و نیز بدلیل نفوذ و حاشیه‌نشینی نوتروفیل‌ها در دیواره سیاهرگ‌ها، بافت ریه هیپرسلولار به نظر می‌رسد. تمام این تغییرات نشان دهنده وقوع ذات‌الریه بینابینی حاد در بافت‌های ریه نمونه‌های این مطالعه بود (شکل ۲). همچنین، این تغییرات بافتی با شدت‌های مختلف در گروه‌های تیمار شده با ترکیب اسانس گل محمدی و آب فاقد دوتریوم (DDW15+EO و DDW30+EO) نیز دیده شد (شکل ۲).

همان‌طورکه در جدول ۲ مشاهده می شود، در گروه کنترل منفی به‌طور معنادار نسبت به گروه شاهد، ادم التهابی و ارتشاح نوتروفیل در بافت‌های بینابینی ایجاد شد، اما در گروه تیمارشده همزمان با اسانس گل محمدی و آب فاقد دوتروم (DDW15+EO) همانند گروه کنترل مثبت، کاهش پرخونی و شدت ذات‌الریه بینابینی مشاهده شد (جدول ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعات انجام شده، اسانس حاصله از گیاهان دارویی مختلف نظیر دانه‌های زیره سیاه و گل محمدی از آسیب بافت کبد ناشی از سپسیس در مدل تجربی التهابی CLP، از طریق تعدیل فاکتورهای دخیل در سیستم استرس اکسیداتیو/ آنتی‌اکسیدانی محافظت کرده است (Fatemi *et al*., 2010; Dadkhah *et al*., 2019). همچنین، اثرات حفاظت کبدی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی آب فاقد دوتریوم به تنهایی و همراه با اسانس مرزه[4] در برابر مسمومیت کبدی ناشی از استامینوفن در سیستم *in vivo* به اثبات رسیده است (Rasooli *et al*., 2015). در این راستا، در این مطالعه به‌منظور بررسی اثرات ضدالتهابی آب فاقد دوتریوم به تنهایی و ترکیب با اسانس گل محمدی بر روی بافت کبد در سیستم *in vivo*، از یک مدل تجربی التهابی CLP که نسبت به سایر مدل‌های التهابی برتری دارد، استفاده گردید.

سپسیس، یکی از مشکلات شایع در آسیب تروماتیک بوده که بروز حاد و زودهنگام آن، عوارض طولانی مدتی از جمله توقف عملکرد سیستم ایمنی و مشکلات تنفسی را ایجاد می‌کند و در نهایت منجر به مرگ بیماران می‌شود (Benjamin *et al*., 2004). سپسیس، به کمک مدل تجربی CLP که مقرون به صرفه و سریع می‌باشد و استاندارد کردن آن نیز آسان است، صورت می‌گیرد. به‌طورکلی در این مدل، با عمل جراحی (بستن دریچه سکوم و سوراخ کردن آن) میکروارگانیسم‌های روده‌ای به داخل جریان خون نشت پیدا کرده و سپسیس ایجاد می‌شود. از طرف دیگر در این مدل، سپسیس از طریق شیفت میکروارگانیسم‌ها و باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی از لومن روده‌ای به جریان خون ایجاد می‌شود. سپس، افزایش بار میکروبی از طریق فعال‌سازی مسیرهای دخیل در استرس اکسیداتیو در سپسیس، منجر به القای استرس اکسیداتیو گردیده که نهایتاً آسیب اندام‌های بدن را منجر می‌شود (Hubbard *et al*., 2005). اولین مشاهدات در آسیب اکسیداتیو بافتی حاصل از سپسیس افزایش معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) پراکسیداسیون لیپیدها (LP) در بافت ریه در گروه CLP نسبت به گروه شاهد می‌باشد (جدول ۱). افزایش LP در بافت‌های مذکور همراه با کاهش قابل توجه ($P<۰/۰۵$) غلظت گلوتاتیون در ۲۴ ساعت پس از القاء سپسیس رخ داده است (جدول ۱). همچنین، سطح FRAP که به‌عنوان شاخص اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان کل است، به‌میزان قابل‌توجهی ($P<۰/۰۵$) در گروه کنترل منفی کاهش پیدا کرده که نشان‌دهنده بر هم خوردن تعادل استرس اکسیداتیو و آنتی‌اکسیدان ناشی ار سپسیس می‌باشد (جدول ۱). اندازه‌گیری‌های انجام گرفته در بیماران مبتلا به شوک سپتیک نشان می‌دهد

1. Interlobular septa
2. Per vascular
3. Pulmonary intravascular and interstitial macrophages
4. *Satureja rechingeri*

که میزان FRAP و فاکتورهای دخیل در آن مثل اسید اوریک و بیلی روبین متناسب با شدت سپسیس افزایش می‌یابد (Andresen *et al*., 2008). این داده‌ها همراه با نتایج هیستوپاتولوژیکی (شکل ۲ و جدول ۲) نشان می‌دهند که آسیب اکسیداتیو بافت ریه حاصل از سپسیس، تخریب بافتی شدیدی را پس از CLP موجب شده است.

علاوه بر این، در موش‌های صحرایی سپتیکی افزایش بیان ژن *COX-2* مشاهده شد که در نهایت منجر به آسیب بافتی در بافت ریه گردید (شکل ۱). در سپسیس و التهاب حاد، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و میانکنش بین انواع سایتوکین‌های پیش التهابی و ضدالتهابی باعث از کار افتادن بسیاری از اندام ها و در نهایت مرگ می‌گردد (Rackow & Astiz, 1991; Esmaeili *et al*., 2011). در این بیماری، اجزای 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 القای ژن *COX-2* با تشدید استرس اکسیداتیو در گسترش آسیب‌های بافتی ناشی از التهاب نقش مهمی دارند (Esmaeili *et al*., 2011).

از سوی دیگر، سال‌هاست که گیاهان در پزشکی کاربردهای فراوانی دارند. ترکیبات طبیعی که خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجهی دارند، می‌توانند نقش موثری در سایتوکین‌های التهابی و نرمال کردن بیان ژن *COX-2* داشته و در نتیجه باعث کاهش آسیب بافت کبد و ریه ناشی از سپسیس گردند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که دو گروه تیمار شده با ترکیب اسانس گل محمدی و آب فاقد دوتریوم (DDW15+EO و DDW30+EO)، با جبران کاهش گلوتاتیون 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 ارائه‌شده توسط Villa *et al*. (2002) مبنی بر نقش محافظتی گلوتاتیون در سپسیس مطابقت دارد. از سوی دیگر تیمار موش‌های صحرایی با اسانس گل محمدی و آب فاقد دوتریوم (DDW15+EO و DDW30+EO) باعث افزایش و بازگشت سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پلاسما به حالت طبیعی گردید (جدول ۱).

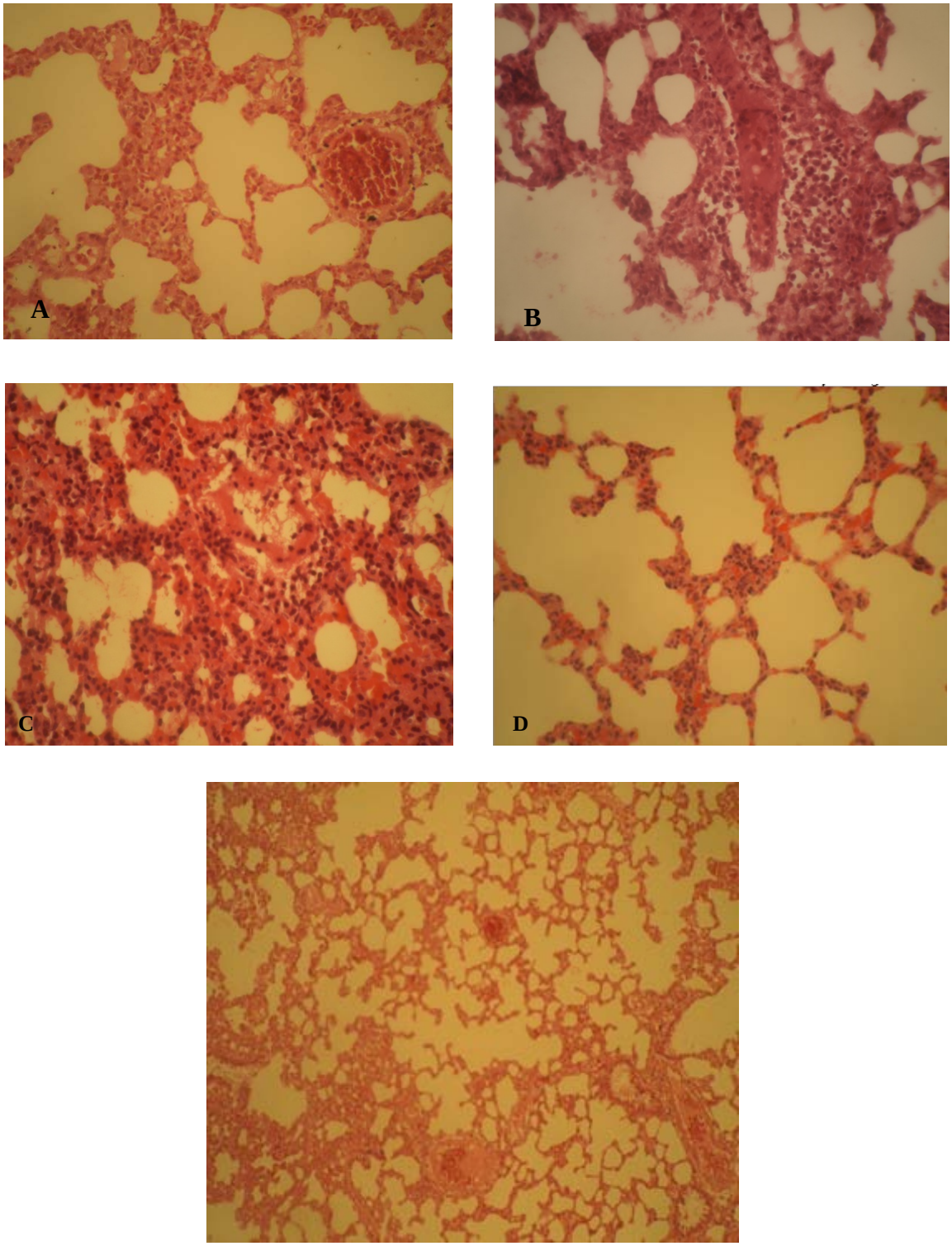
جدول ۲. تأثیرآب فاقد دوتریوم و اسانس گل محمدی بر شاخص های هیستوپاتولوژی

گروه ها	ادم التهابی	ارتشاح نوتروفیل	پرخونی	شدت ذات الریه بینابینی
LAP	1.6± 0.4	0.8± 0.3	1± 0	1.1 ± 0.2
CLP	3.1± 0.1*	3.5± 0.2*	3.5± 0.2*	3.2± 0.1*
DDW15+EO	1.8 ± 0.2	2.2±0.2	2 ± 0**	1.9±0.1**
DDW30+EO	2.4±0.4	3 ±0.3	2.6±0.2	2.6± 0.2
IND	0.2 ± 0.2 **	0.8 ± 0.2**	0.8± 0.37**	0.56 ± 0.12**

* نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه CLP بوده که با گروه لاپاراتومی معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

** نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه‌های مختلف تیمار بوده که با گروه CLP معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار (mean ± SEM) بیان شده است.



شکل ۲. A) گروه لاپاراتومی LAP: پرخونی و ادم ملایم بافت بینابینی و عدم مشاهده نوتروفیل در بافت ریه با بزرگنمایی ۴۰۰×
B) گروه CLP: مشاهده ادم التهابی در اطراف سیاهرگ در بافت بینابینی ریه تجمع آستین‌وار نوتروفیل‌ها در اطراف سیاهرگ (سرپیکان).
مرزنشینی نوتروفیل‌ها در مجاور آندوتلیوم سیاهرگ (پیکان‌ها) ۴۰۰×
C) گروه DDW15+EO: پرخونی خفیف، ادم و ارتشاح نوتروفیل در بافت بینابینی و اطراف عروق خونی ۴۰۰×
D) گروه DDW30+EO: پرخونی و ارتشاح نوتروفیل‌ها در بافت بینابینی ۴۰۰×
E) گروه کنترل مثبت (IND): عدم مشاهده نوتروفیل، ادم و پرخونی در بافت ریه ۴۰۰×

مطالعات دیگر نیز نشان داده‌اند که آنتی‌اکسیدان‌هایی از قبیل سیلیمارین و N- استیل سیستئین با تعدیل پارامترهای دخیل در استرس اکسیداتیو از جمله گلوتاتیون، پراکسیداسیون لیپیدها و آنزیم میلوپراکسیداز، از آسیب اکسیداتیو بافتی به‌خصوص کبد و ریه در سپسیس جلوگیری می‌کنند (Gürer *et al*., 2009; Toklu *et al*., 2008). این نکته حائز اهمیت است که نتایج حاصل از تیمار موش‌های صحرایی مبتلا به سپسیس با آب فاقد دوتریوم به همراه اسانس گل محمدی، همانند نتایج حاصل از داروی شناخته‌شده ضدالتهابی ایندومتاسین، به‌عنوان گروه کنترل مثبت در نظرگرفته شد، باعث تعدیل سیستم استرس اکسیداتیو/ آنتی‌اکسیدانی می‌گردد (جدول ۱ و شکل ۱).

علاوه براین، نتایج حاصل از بررسی بیان ژن *COX-2* در بافت ریه نشان می‌دهد که ترکیب آب فاقد دوتریوم و اسانس گل محمدی باعث تعدیل بیان این ژن در رت‌های مبتلا به سپسیس در ۲۴ ساعت پس از CLP گردید (شکل ۱). 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 (Crofford *et al*., 2007). Wang *et al*. (2015) نشان دادند که اثرات ضد التهابی گیاه شیرین بیان، ارتباط قابل توجهی با تعدیل بیان *COX-2* و سایتوکین‌های پیش التهابی در موش دارد. Fatemi *et al*. (2010a, b) نیز نشان دادند که اسانس زیره سیاه باعث تعدیل پارامترهای دخیل در استرس اکسیداتیو در مدل CLP می شود و قادر است عوارض ناشی از التهاب حاد ریوی را کاهش دهد. گروهی محقق در سال ۲۰۱۰ نیز نشان دادند که تعدیل فاکتورهای دخیل در سیستم استرس اکسیداتیو/ آنتی‌اکسیدانی به‌کمک آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، از آسیب بافت کبد و ریه ناشی از سپسیس جلوگیری می‌کند (Fatemi *et al*., 2010a, b).

آب فاقد دوتریوم که با کاهش غلظت دوتریوم آب معمولی به‌دست می‌آید، اثرات بیولوژیکی متفاوتی از خود بروز می‌دهد. در گزارشی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آب فاقد دوتریوم با کمک تست‌های بیوشیمیایی GSH و SOD[1] به اثبات رسیده است (Olariu *et al*., 2007b). در مطالعه‌ای دیگر، آب فاقد دوتریوم از بافت کبد در برابر تخریب ناشی از مسمومیت با کلرید کادمیوم در موش صحرایی محافظت کرده است (Olariu *et al*., 2007c). در مطالعه‌ای دیگر نیز نشان داده شد که آب تهی شده از دوتریوم و اسانس مرزه، در جلوگیری از آسیب کبدی ناشی از استامینوفن نقش دارند (Fatemi *et al*., 2015). به‌طورکلی، درمان و یا کاهش عوارض عفونت و التهاب توسط گیاهان دارویی ارتباط معناداری با ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجود در آنها دارد. اسانس گل محمدی حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی چون Citronellol، Trans Geraniol و Phenyle alcohol می‌باشد که پتانسیل قابل قبولی در دفع رادیکال‌های آزاد داشت (Dadkhah *et al*., 2019). بنابراین می‌تواند از بافت ریه در مقابل آسیب‌های ریوی ناشی از عفونت با تعدیل پارامترهای استرس اکسیداتیو محافظت کند.

به‌طور کلی، نتایج این تحقیق نشان داد که اسانس گل محمدی همراه با آب فاقد دوتریوم با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی، دارای نقش محافظتی در برابر عوارض و آسیب‌های بافتی ناشی از سپسیس ایفا می‌کند. بخش عمده‌ای از این اثرات را می‌توان به کاهش سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن از طریق کاهش بیان ژن *COX-2* ارتباط داد، که در نهایت منجر به کاهش آسیب‌های ناشی از سپسیس در بافت ریه شود. این نتایج با مشاهدات هیستوپاتولوژی نیز تأیید شده است.

1. Superoxide Dismutase

REFERENCES

Adib-Conquy, M.; Cavaillon, JM.; (2007). Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. FEBS Letters; 581(19): 3723-33.

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.

Basu, S.; Eriksson, M.; Vitamin, E.; (2006). in relation to lipidperoxidation in experimental septic shock. Eur J Pharmacol; 534: 202-209.

Benjamim, CF.; Hogaboam, CM.; Kunkel, SL.; (2004). The chronic consequences of severe sepsis. Journal of leukocyte biology; 75(3):408-12.

Benzie, IF.; Strain, JJ.; (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical biochemistry; 239(1): 70-6.

Berdea, P.; Stela Cuna, Cazacu M.; Tudose, M.; (2001). Deuterium variation of human blood serum. Studia Universitatis Babes-Bolyai, Physica, Special Issues.

Berg, RM.; Møller, K.; Bailey, DM.; (2011). Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism; 31(7): 1532-44.

Buege, J.A.; Aust, S.D.; (1978). Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol; 52: 302-311

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.

Dadkhah, A.; Fatemi, F.; Mohammadi Malayeri, MR.; Karvin Ashtiyani, MH.; Kazemi Noureini, S,; Rasooli, A.; (2019). Considering the effect of *Rosa Damascena* essential oil on oxidative stress and *COX-2* gene expression in liver of septic rats. Turkish journal of pharmaceutical science. (in Press)

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.

Fatemi, F.; Allameh, A.; Khalafi, H.; Rezaei, M. B.; 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.

Fatemi, F.; Dadkhah, A.; Akbarzadeh, K.; Dini, S.; Hatami, Sh.; Rasooli, A.; (2015). Hepatoprotective Effects of Deuterium Depleted Water (DDW) Adjuvant with Satureja rechingeri Essential Oil. Elec J Biol; 11(2): 23-32.

Fatemi, F.; Allameh, A.; Khalafi, H.; Ashrafihelan, J.; (2010a). Hepatoprotective Effects of G-Irradiated Caraway Essential Oils in Experimental Sepsis. Appl Radiat Isot; 68: 280-285.

Ghahreman, A.; Cromophytes of Iran (Plant Systematic). Nashere-daneshgahi press. Tehran. 1992, pp: 518-32.

Gürer, A.; Ozdoğan, M.; Gökakin, AK.; Gömceli, I.; Gülbaha, RO.; Arikök, AT.; Kulaçoğlu, H.; Aydin, 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. Ulusal Travma Ve Acil Cerrahi Dergisi; 15(1): 1-6.

Hubbard, WJ.; Choudhry, M.; Schwacha, MG.; Kerby, JD.; Rue III, LW.; Bland, KI.; Chaudry, IH.; (2005). Cecal ligation and puncture. Shock; 1-24: 52-7.

Kenneth, J.L.; Thomas, D.S.; (2001).

Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the $2^{-\delta\delta c}{}_{t}$ method. Methods; 25 (4): 402-408.

Kumar, V.; Sharma, A.; (2010). Is neuroimmunomodulation a future therapeutic approach for sepsis?. International immunopharmacology; 31; 10(1):9-17.

Matsuda, A.; Jacob, A.; Wu, R.; Aziz, M.; Yang, WL.; Matsutani, T.; Suzuki, H.; Furukawa, K.; Uchida, E.; Wang, P.; (2012). Novel therapeutic targets for sepsis: regulation of exaggerated inflammatory responses. Journal of Nippon Medical School; 79(1):4-18.

Mozaffarian, V. A.; (1996). Dictionery of Iranian Plants Names. Farhang-e-moaser. Tehran; 461-3.

Olariu, L.; Petcu, M.; Pup, M.; Chis-Buiga, I.; Tulcan, C.; Muselin, F.; Brudiu, I.; (2007c). The influence of the deuterium depleted water in the experimental cadmium chloride intoxication on liver function in rats. Lucrari Stiintifice Medicina Veterinara; 270-274.

Olariu, L.; Petcu, M.; Tulcan, C.; Chis-Buiga, I.; Pup, M.; Florin, M.; Brudiu, I.; (2007b). Deuterium depleted water-antioxidant or prooxidant? Lucrari stiinłifice medicina veterinara, xl, timisoara.

Rasooli, A.; Fatemi, F.; Akbarzadeh, K.; Dini, S.; Bahremand, S.H.; (2016). Synergistic protective activity of deuterium depleted water (DDW) and satureja rechingeri essential oil on hepatic oxidative injuries induced by acetaminophen in rats. TEOP; 19(5): 1086-1101.

Sedlak, J.; Lindsay, R.H.; (1968). Estimation of total protein with bound and non-protein sulfhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. Analitical Biochemistry; 25: 192-205.

Somlyai, G.; Molnár, M.; Laskay, G.; Szabó, M.; Berkényi, T.; *et al*. (2010). Biological significance of naturally occurring deuterium: the antitumor effect of deuterium depletion. Orv Hetil; 151: 1455-1460.

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.

Ulva sp on pathogenic microorganisms. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research; 4(11): 4875-4878.

Victor, VM.; Rocha, M.; Fuente, MD.; (2004). Immune Cells: Free Radicals and Antioxidants in Sepsis. Int Immunopharmacol; 4: 327-347.

Villa, P.; Saccani, A.; Sica, A.; (2002). Glutathione protects mice from lethal sepsis by limiting inflammation and potentiating host defense. J Infect Dis; 185: 1115-20.

Wang, H. L.; Li, Y. X.; Niu, Y. T.; Zheng, J.; Wu, J.; Shi, G. J.; Ma, L.; Niu, Y.; Sun, T.; Yu, J. Q.; (2015). Observing anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of glycyrrhizin through regulating COX-2 and pro-inflammatory cytokines expressions in mice. Inflammation; 38, 2269-2278.

Xie, K.; Yu, Y.; Pei, Y.; Hou, L.; Chen, S.; Xiong, L.; Wang, G.; (2010). Protective effects of hydrogen gas on murine polymicrobial sepsis via reducing oxidative stress and HMGB1 release. Shock; 34(1):90-7.