

Comparative Effect of Three Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs on Gene Expression of Myeloperoxidase in Lung and Liver Tissues of Septic Rats

Hamideh Salehiyan^{*1}, Reza Hajhosseini², Azadeh Rasooli², Saba Miri³

1. Department of Biotechnology, Faculty of Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran

2. Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran

3. Department of Biotechnology, Faculty of Life Science, Alzahra University, Tehran, Iran

(Received: 2018/12/24

Accept:2019/03/13)

Abstract

Background: Sepsis is the systemic response of the body to severe infection and one of the causes of mortality in ICU. Considering the importance of sepsis, in the present study, the effect of Non-Steroidal Anti-Inflammatory (NSAIDs) drugs (aspirin, indometacin, celecoxib) on inflammatory biomarker of myeloperoxidase (MPO) in liver and lung tissues of rats was investigated.

Materials and Methods: In the current experimental study, animals were divided into six groups: the control group, the lapratomy (LAP) group, the CLP group, treatment groups: CLP surgery and immediate treatment of rats with NSAIDs (2 mg/kg b.w) once daily. Two days after CLP, the rats were killed and the liver and lung tissues were isolated and the Real-Time PCR technique was used to determine the expression of the MPO gene. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by LSD in SPSS (version 19.0). The significance value was considered as $P < 0.05$.

Results: The results indicated that the expression of MPO gene in lung and liver tissue of the LAP group increased significantly as compared with control group. The level of expression of the MPO gene in the CLP lung and liver tissue was significantly increased as compared to the LAP group. However, in the treatment groups, a significant decrease in the expression of MPO gene was observed. Although all three drugs had a positive effect on reducing gene expression (celecoxib>indomethacin>aspirin), in lung tissue, celecoxib had the highest effect and aspirin had the least effect on reducing the expression of MPO gene. In liver tissue, aspirin, and celecoxib, the least effect on reducing gene expression was observed.

Conclusion: It seems that the treatment of animals with selected drugs have the inhibiting effect on the increase of MPO gene expression and results in reducing the damage to the liver and lung tissue caused by sepsis.

Keywords: Sepsis; Myeloperoxidase; Gene expression; Non-Steroidal Anti-Inflammatory drugs

*Corresponding author: Hamideh Salehiyan
Email: hsalehiyan230@gmail.com

مقایسه تاثیر سه داروی ضدالتهاب غیراستروئیدی بر بیان ژن میلوپراکسیداز در دو بافت ریه و کبد رت‌های مبتلا به عفونت خون

حمیده صالحیان^{۱*}، رضا حاجی حسینی^۲، آزاده رسولی^۲، سبا میری^۳

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران
 ۲- گروه بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
 ۳- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۱۰/۰۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۱۲/۲۲

چکیده:

سابقه و هدف: سپسیس پاسخ سیستمیک بدن به عفونت شدید و یکی از عوامل مرگ‌ومیر در بخش‌های مراقبت‌های ویژه است. با توجه به اهمیت سپسیس، در این مطالعه تاثیر سه داروی ضدالتهابی غیراستروئیدی (آسپرین، ایندومتاسین و سلکوکسیب) بر بیومارکر التهابی میلوپراکسیداز (MPO) در بافت کبد و ریه رت‌ها بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق که به روش تجربی انجام شد، حیوانات به شش گروه تقسیم شدند: گروه کنترل، گروه لاپراتومی (LAP)، گروه CLP، گروه‌های تیمار: جراحی CLP و بلافاصله تیمار رت‌ها با داروهای آسپرین، سلکوکسیب و ایندومتاسین (2mg/kg b.w) به صورت خوراکی روزی یک‌بار. ۴۸ ساعت بعد از CLP و تیمار، رت‌ها کشته شدند و بافت‌های کبد و ریه آن‌ها جداسازی و برای بررسی بیان ژن MPO، از تکنیک Real-Time PCR استفاده شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ و تست one-way ANOVA و آزمون تکمیلی LSD تعیین شد. $P < 0.05$ از لحاظ آماری معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: میزان بیان ژن MPO در بافت ریه و کبد گروه LAP نسبت به گروه کنترل به طور معناداری افزایش یافت ($P < 0.05$). میزان بیان ژن MPO در بافت ریه و کبد گروه CLP نسبت به گروه LAP افزایش چشمگیری داشته است. درحالی که در گروه‌های تیمار، به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش میزان بیان ژن مشاهده شد ($P < 0.05$). اگرچه هر سه دارو اثر مثبت روی کاهش بیان ژن داشتند (سلکوکسیب < ایندومتاسین < آسپرین) اما در بافت ریه، سلکوکسیب بیشترین و آسپرین کمترین اثر را روی کاهش بیان ژن MPO و در بافت کبد، آسپرین بیشترین و سلکوکسیب کمترین اثر را روی کاهش بیان ژن داشتند.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تیمار حیوانات با داروهای آسپرین، سلکوکسیب و ایندومتاسین منجر به مهار افزایش بیان ژن میلوپراکسیداز و در نتیجه سبب کاهش آسیب‌های بافت کبد و ریه ناشی از سپسیس شده است.

واژگان کلیدی: عفونت خون، میلوپراکسیداز، بیان ژن، داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی

Myeloperoxidase	1
Cecal Ligation and Puncture	2

مقدمه:

هم خوردن تعادل سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و سطح استرس اکسیداتیو در بدن است.

سپسیس، سندروم پاسخ التهابی سیستمیک^۱ (SIRS) ناشی از عفونت شدید است. از

Systemic Inflammatory Response Syndrome 1

سپسیس پاسخ سیستمیک بدن به عفونت حاد است و با واسطه سیتوکین‌های تولید شده از ماکروفاژها، بروز و پیشرفت می‌کند و در نهایت به از کار افتادن و مرگ ارگان‌های بدن منجر می‌شود (۱). یکی از عوارض و مشکلات ناشی از سپسیس، به

نویسنده مسئول: حمیده صالحیان
 پست الکترونیک: hsalehiyan230@gmail.com

از کارخانه‌های فرآورده‌های غذایی تهران تهیه شد که به صورت Pellet با فرمول استاندارد بود. حیوانات بالغ نیز از طریق بطری دسترسی آزاد به غذا و آب آشامیدنی داشتند. حیوانات مطالعه شده به شش گروه تقسیم شدند و در هر گروه ۱۰ موش قرار داشت.

گروه کنترل: بدون عمل جراحی و تیمار دارویی

گروه لاپراتومی: انجام جراحی لاپراتومی بدون CLP

گروه CLP: جراحی CLP

گروه‌های تیمار: جراحی CLP و بلافاصله تیمار رت‌ها با داروی ضدالتهای اسپرین، سلکوکسیب و ایندومتاسین (شفادارو) (2mg/kg b.w) به صورت خوراکی و محلول در آب مقطر روزی یک بار.

دلیل انتخاب این داروها، استفاده متداول آن‌ها در درمان سپسیس و میزان دوز داروی مصرفی در رت‌ها براساس میزان مصرف دارو به صورت (قرص‌های ۵۰ و ۷۰ mg) و به میزان سه بار در روز در انسان ۷۰ kg سنجدیده شده است (۱۲).

۴۸ ساعت پس از تیمار، رت‌ها کشته شدند و بافت کبد و ریه آن‌ها برای اندازه‌گیری بیان ژن MPO جدا شد. تمامی مراحل انجام شده روی حیوانات در آزمایشگاه در زمینه اصول اخلاقی کار با حیوانات شامل کدهایی از قبیل بیهوشی حیوان، انواع جراحی روی حیوان، مراقبت‌ها بعد از جراحی و مرگ طبق پروتکل Helsinki, ۱۹۶۴ انجام شد.

ایجاد مدل التهابی CLP:

در این روش، پس از بیهوش کردن رت‌ها توسط مخلوط کتامین ۱۰ درصد (ماده بیهوشی) و زایلوزین دو درصد (ماده بیحسی)، در دیواره شکمی آن‌ها به اندازه ۲ cm برش ایجاد شد. سپس به آرامی با خارج کردن سکوم به وسیله پنبه سواپ و با فشار انگشت، مدفوع درون سکوم به انتها انتقال داده شد. در ادامه، بخش سکوم تا زیر دریچه ایلئوسکال توسط نخ بخیه ۳-۰ بخیه زده شد و در سکوم (بدون آسیب به رگ‌های خونی)، دو سوراخ توسط سرسوزن G۲۰ 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 هوش آمدن، آب و غذا به طور کامل در اختیار حیوانات قرار گرفت. در گروه لاپراتومی نیز، جراحی فوق بدون بستن دریچه ایلئوسکال و سوراخ کردن سکوم انجام شد (۱۳).

استخراج RNA:

برای انجام استخراج RNA بافت‌های مذکور، از کیت GeneAll ساخت کشور کره استفاده و طبق پروتکل استخراج انجام شد. در ادامه برای حذف DNA ژنومی از RNA، تیمار با آنزیم Dnase I (SinaClon Co., Iran) انجام شد که طبق پروتکل شرکت سازنده تمام مواد با هم ترکیب و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه و ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه ترموسایکلر (BIO RAD، آمریکا) آنکوبه شدند. سپس تعیین غلظت RNA با نانودراپ ۲۰۰ (Nanodrop) انجام شد.

واکنش نسخه‌برداری معکوس (سنتز cDNA):

به منظور سنتز cDNA، طبق پروتکل کیت GeneAll ساخت کشور کره، RNA کل

ویژگی‌های اساسی SIRS فعالسازی التهاب غیرطبیعی و اختلال پاسخ ایمنی ناشی از آزادسازی بیش از حد واسطه‌های التهابی در بدن است. براساس فعالسازی مداوم واکنش التهابی، ریسک سندروم اختلال عملکرد چندگانه² (MODS) تا حد زیادی افزایش و میزان مرگ‌ومیر بالا می‌رود (۲، ۳). با بررسی عوامل تاثیرگذار در ایجاد سپسیس، میتوان راهکارهای درمانی را تعیین کرد که یکی از بهترین آن‌ها کاهش سطح بار میکروبی و کاهش عوامل استرس اکسیداتیو و التهابی است.

داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی (NSAID) با کاهش واکنش‌های التهابی ناشی از سپسیس می‌توانند باعث تعویق یا شاید درمان بیماری شوند. اسپرین (استیل سالیسیلیک اسید) اولین عضو از خانواده NSAID به عنوان یکی از موثرترین داروها در درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌شود (۴، ۵). مکانیسم عمل اصلی اسپرین همانند سایر داروهای NSAID مهار سنتز پروستاگلاندینها (پروستاگلاندین‌ها و ترومبوکسان‌ها) است که این عمل خود را از طریق مهار آنزیم‌های سیکلواکسیژناز (COX-1 و COX-2) اعمال می‌کند (۶).

سلکوکسیب یک مهارکننده اختصاصی آنزیم COX-2 برای درمان آرتريت روماتوئید است. COX-2 توسط محرک‌های التهابی القا شده و سبب تولید پروستاگلاندین‌ها (PGE2) در محل التهاب است (۷). در طول عفونت، عملکردهایی مانند فاگوسیتوز و کشتار باکتریایی به وسیله تولید بیش از اندازه پروستاگلاندین E2 مهار می‌شود. بنابراین، به کارگیری مهارکننده اختصاصی COX-2 مثل سلکوکسیب ممکن است تولید پروستاگلاندین E2 و التهاب را کاهش دهد و فاگوسیتوز را تحریک کند (۸).

ایندومتاسین با مهار مسیرهای التهابی به صورت غیرمستقیم از سنتز پروستاگلاندین‌های E2 جلوگیری می‌کند و از طریق مهار سنتز برادیکینین که پیش ماده سنتز IL8، IL1، TNF- α و نوروپپتیدهای ایجادکننده درد است، سبب مهار درد می‌شود (۹). مطالعه‌های پیشین نیز حاکی از آن است که فاکتورهایی که سبب تجمع نوتروفیل‌ها در بافت می‌شوند، تخریب بیشتر بافت ریه را سبب می‌شوند، بنابراین این طور می‌توان نتیجه گرفت که داروهای ضدالتهابی مانند ایندومتاسین با مهار فاکتورهایی که باعث تجمع نوتروفیل می‌شوند، می‌توانند در جلوگیری از آسیب بافت ریه مؤثر واقع شوند (۱۰).

آنزیم میلوپراکسیداز، آنزیمی آهن‌دار در گرانول‌های آزوروفیلیک نوتروفیل‌هاست که نقش بسیار مهمی در فرایندهای التهابی و استرس اکسیداتیو دارد. هرگونه بیان و رها شدن غیرمعمول MPO از نوتروفیل‌های فعال شده، التهاب و آسیب بافتی را تشدید میکند و ممکن است به چندین بیماری دیگر منجر شود (۱۱).

تاکنون مطالعه‌ای روی بیان ژن MPO دخیل در بیماری سپسیس در استفاده از دوزهای درمانی با داروهای مذکور انجام نشده است. با توجه به مطالعه‌های پیشین انجام شده، کاهش آسیب‌های کبدی و ریوی در سپسیس ضروری به نظر می‌رسد، بنابراین بررسی مکانیسم عمل این ژن در سپسیس با اهمیت بالایی برخوردار است.

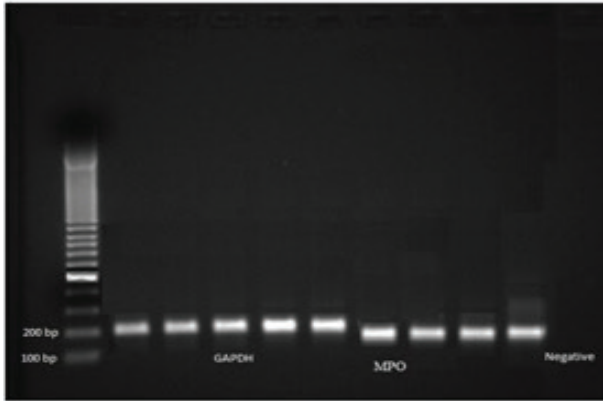
مواد و روش‌ها:

در این تحقیق تجربی، سپسیس با استفاده از مدل تجربی القایی سپسیس (CLP) القا شد. تعداد ۶۰ رت نر بالغ نژاد ویستار با وزن متوسط ۱۵۰±۳۰ گرم از مراکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. غذای حیوانات

Primers	Sequence (5' → 3')	Annealing Temperature	GC%	Product Length
GAPDH forward	5'-TGC CAG CCT CGT CTC ATA G-3'	58.88	57.89	197 bp
GAPDH reverse	5'-ACT GTG CCG TTG AAC TTG C-3'	59.27	52.63	
MPO forward	5'-GCG ATA GGT TTT GGT GGG AG-3'	58.62	55.00	165 bp
MPO reverse	5'-AGC TCA CAA AGT CTC GGG G-3'	59.33	57.89	

یافته‌ها:**نتایج حاصل از واکنش PCR محصول رونوشت برداری معکوس**

برای اطمینان از صحت روند استخراج RNA و رونوشت برداری معکوس (ساخت cDNA)، واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن GAPDH و MPO انجام شد. نتایج حاصل از آن روی ژل آگارز در شکل یک قابل مشاهده است.

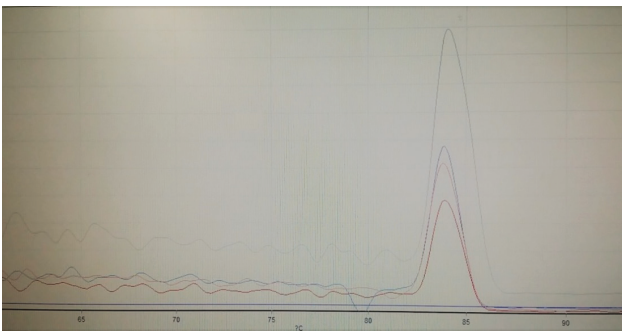


شکل ۱- طرح الکتروفورزی محصول PCR ژن MPO و GAPDH در بافت کبد و ریه روی ژل آگارز

دو باند، مربوط به ژن GAPDH با ۱۹۷ جفت باز و ژن MPO با ۱۶۵ جفت باز است. با توجه به تصویر فوق، هیچگونه باند غیراختصاصی مشاهده نشد که نشانه عملکرد دقیق پرایمرهاست و می‌توان به این نتیجه دست یافت که روند استخراج RNA و ساخت cDNA به درستی انجام شده است.

بررسی منحنی ذوب برای اطمینان از کیفیت واکنش Real-Time PCR:

پس از انجام هر واکنش Real-Time PCR، برای اطمینان از تکثیر نشدن غیراختصاصی، منحنی ذوب با دستگاه رسم و ثبت می‌شود. منحنی دارای تک قله در T_m اختصاصی مربوط به هر ژن، نشان‌دهنده تکثیر کامل اختصاصی همان ژن است. همچنین، قابل ذکر است که در تمامی نمونه‌ها پس از انجام هر واکنش از نظر منحنی ذوب بررسی شدند (شکل ۲).



شکل ۲- منحنی ذوب ژن MPO برای اطمینان از کیفیت Real-Time PCR

بیان ژن MPO در بافت ریه:

نتایج نشان‌دهنده افزایش میزان بیان ژن MPO در بافت ریه پس از القای سپسیس در گروه‌های LAP و CLP نسبت به گروه کنترل بود که گروه‌های تیمار با داروهای اسپرین، سلوکسیب و ایندومتاسین نتایج مشابهی را در تعدیل بیان این ژن نشان دادند و میزان بیان این ژن را به گونه معناداری به سطح کنترل منفی رساندند ($P < 0.05$) (جدول یک). از سوی دیگر سلوکسیب باعث کاهش بیشتری در بیان ژن MPO در بافت ریه به نسبت دو داروی دیگر شده است.

با آب عاری از نوکلئاز ترکیب گردید. سپس به مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد. در ادامه مخلوط واکنش همراه با پرایمر Oligo dT به آن اضافه و به آرامی مخلوط شد. سپس در دستگاه ترموسایکلر (BIO RAD، آمریکا)، در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت پنج دقیقه، ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه و ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت پنج دقیقه گذاشته شد.

طراحی پرایمر:

طراحی پرایمر با استفاده از نرم‌افزار Primer 3 انجام شد و اختصاصیت آن با استفاده از سایت NCBI BLAST و ساختار ثانویه آن توسط نرم‌افزار Gene Runner بررسی و در نهایت سنتز آن توسط شرکت ژن فن‌آوران انجام شد. پرایمرهای استفاده شده طبق جدول یک است (۱۴).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز PCR:

برای بررسی کیفیت cDNA، بهینه‌سازی دقیق تمامی اجزا و شرایط واکنش از PCR استفاده شد. طبق پروتکل کیت Amplicon (آلمان)، تمام مواد با هم ترکیب شد. حجم مخلوط واکنش برای هر نمونه، ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط واکنش، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی پیشرو و پسرو، ۱۰/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۴۰۰ نانوگرم از cDNA ساخته شده بود. سپس در دستگاه ترموسایکلر (BIO RAD، آمریکا) طبق برنامه، واسرشت‌سازی اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه تکرار شونده شامل واسرشت‌سازی با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر با دمای ۵۰ تا ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، طول‌سازی با دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و در پایان برای تکمیل سنتز قطعه‌های نیمه کامل به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد گذاشته شد. ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل استفاده شد. الکتروفورز محصول‌های PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد (۱۵).

واکنش Real-Time PCR:

برای انجام Real-Time PCR از دستگاه Rotor-Gene-Q از شرکت Qiagen (آلمان) استفاده شد. ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده و به طور موازی با ژن هدف تکثیر و برای نرمال کردن و کمیت سنجی بیان ژن استفاده شد. کیت مخصوص Quanti Nova SYBER Green PCR Kit خریداری شد. کیت دارای مخلوط واکنش حاوی اجزای مورد نیاز برای انجام واکنش PCR مانند آنزیم Taq، بافر حاوی MgCl₂ و مخلوط dNTP و همچنین رنگ سایبرگرین بود. برای هر ژن حداقل سه بار باید واکنش Real-Time PCR انجام شود. به ازای هر نمونه cDNA سه بار واکنش Real-Time PCR انجام شد. همچنین، برای اطمینان حاصل کردن از نبود آلودگی و خطاهای حاصل از آن، برای هر ژن سه کنترل منفی در نظر گرفته شد که میزان الگوی مورد نظر (cDNA) با آب مقطر جایگزین شد. پرایمرهای استفاده شده طبق جدول یک است. حجم مخلوط واکنش برای هر نمونه، ۱۰ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر مخلوط واکنش، ۰/۴ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی پیشرو و پسرو، ۶/۲ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۲۰۰ نانوگرم از cDNA ساخته شده بود. طبق پروتکل کیت، تمام مواد با هم ترکیب و در دستگاه Rotor-Gene-Q قرار داده شدند. برنامه Real Time به شرح زیر برای دستگاه تعریف شد: مرحله اول واسرشت‌سازی اولیه با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه، مرحله دوم ۴۰ چرخه تکرار شونده شامل واسرشت‌سازی با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و اتصال آغازگر با دمای ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و طول‌سازی با دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله سوم ۵۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه. کمیت سنجی بیان نیز به روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و با تعیین نسبت بیان ژن هدف به ژن کنترل داخلی (GAPDH) انجام شد (۱۶).

تجزیه و تحلیل آماری:

اختلاف‌ها و تفاوت‌های بین داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ و تست Aone-way ANOVA و آزمون تکمیلی LSD تعیین شد. با استفاده از این نرم افزار، P-value و SEM داده‌ها، مشخص شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel ترسیم شده‌اند. $P < 0.05$ از لحاظ آماری معنادار در نظر گرفته شد.

جدول ۱- میزان سطح بیان ژن MPO در بافت ریه ۴۸ ساعت پس از تیمار

میزان سطح بیان ژن MPO در بافت ریه	گروه ها
۰±۰/۰۳	گروه کنترل
۰/۴±۰/۰۶ ^a	گروه لاپراتومی
۳/۰۶ ±۰/۳۷ ^b	گروه CLP
۰/۰۵±۰/۰۳ ^c	گروه تیمار با اسپرین
۰/۰۰۵±۰/۰۰۵ ^c	گروه تیمار با سلوکوکسیب
۰/۰۳±۰ ^c	گروه تیمار با ایندومتاسین

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار (mean±SD) بیان شده است. علامت a نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج در گروه LAP با گروه کنترل است ($P < 0/05$).

علامت b نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج در گروه CLP با گروه LAP است ($P < 0/05$). علامت c نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج در گروه‌های دارویی با گروه CLP است ($P < 0/05$).

بیان ژن MPO در بافت کبد:

میزان بیان ژن MPO در بافت کبد رت‌های سپتیک (گروه CLP) - ۴۸ ساعت پس از القای سپسیس نسبت به گروه کنترل و لاپراتومی افزایش معناداری داشت ($P < 0/05$). گروه‌های تیمار باعث کاهش بیان ژن MPO ۴۸ ساعت بعد از القاء سپسیس در بافت کبد گردیدند ($P < 0/05$) (جدول دو). در این بافت اسپرین سبب کاهش بیشتری در بیان ژن MPO به نسبت دو داروی دیگر شده است و بر عکس بافت ریه سلوکوکسیب کم‌ترین اثر را روی کاهش بیان ژن داشت.

جدول ۲- میزان سطح بیان ژن MPO در بافت کبد ۴۸ ساعت پس از تیمار

میزان سطح بیان ژن MPO در بافت کبد	گروه ها
۰±۰/۴	گروه کنترل
۰/۴۷±۰/۴ ^a	گروه لاپراتومی
۴/۵۹±۰/۷ ^b	گروه CLP
۰/۱۳±۰/۰۱ ^c	گروه تیمار با اسپرین
۱/۷۳±۰/۷۸ ^c	گروه تیمار با سلوکوکسیب
۱/۳۴±۰/۰۶ ^c	گروه تیمار با ایندومتاسین

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار (mean±SD) بیان شده است. علامت a نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج در گروه LAP با گروه کنترل است ($P < 0/05$).

علامت b نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج در گروه CLP با گروه LAP است ($P < 0/05$). علامت c نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج در گروه‌های دارویی با گروه CLP است ($P < 0/05$).

بحث:

نتایج این مطالعه نشان داد تیمار رت‌های سپتیک با داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی از جمله اسپرین، سلوکوکسیب و ایندومتاسین می‌تواند در درمان سپسیس تاثیر داشته باشد. نتایج حاکی از آن بود که میزان بیان ژن MPO در گروه لاپراتومی به گونه معناداری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت و بیان ژن MPO در گروه CLP در مقایسه با گروه لاپراتومی به شکل قابل ملاحظه‌ای افزایش بیشتری نشان داد. مطالعه Schrijver و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان داد که در بیماران مبتلا

به سپسیس و شوک سپتیک در مقایسه با بیماران سالم، به شکل معناداری سطح MPO بالاتر و سطح میلوپراکسیداز با مرگ و میر ۳۰ روزه مرتبط است. آن‌ها نشان دادند که میلوپراکسیداز به طور بالقوه بیومارکر جدید برای سپسیس در ICU است. میلوپراکسیداز می‌تواند در نهایت در تشخیص سپسیس و پیش‌بینی مرگ و میر کمک کند (۱۷).

امروزه استفاده از داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی (NSAIDs) نقش بسیار مهمی در درمان سپسیس و التهاب ایفا می‌کنند. با توجه به مطالعه‌های انجام شده، استفاده از راهکارهای درمانی برای کاهش آسیب‌های کبدی و ریوی ناشی از سپسیس ضروری به نظر می‌رسد. برخی ترکیب‌های ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌هیستامینیک دارای فعالیت‌های مهارکننده آنزیم میلوپراکسیداز هستند. این ترکیب‌ها شامل داروهای NSAIDs، دیکلوفناک، فلوفنامیک اسید، گالیک اسید هستند (۱۸). داروهای NSAID با مهار سنتز پروستاگلندینها (پروستاگلاندین‌ها و ترومبوکسان‌ها) از طریق مهار آنزیم‌های سیکلواکسیژناز یک و سیکلواکسیژناز دو عمل می‌کنند (۶). نتایج مطالعه Annamenedi و همکاران در سال ۲۰۱۷ به وضوح نشان داد که آنتی‌بیوتیک ایمینیم نمی‌تواند به طور موثر پاسخ التهابی را تنظیم کند اما وقتی در ترکیب با داروهای NSAID نظیر سلوکوکسیب استفاده می‌شود، می‌تواند در مهار عفونت باکتریایی حتی در دوزهای پایین موثر باشد (۱۹).

آسیب حاد کبدی ناشی از سپسیس مربوط به فعال شدن پاسخ التهابی و ترشح فاکتورهای التهابی است و همچنین آزادسازی زیاد گونه‌های اکسیژن فعال و فعال شدن واکنش استرس اکسیداتیو بعد از نفوذ فاکتور التهابی در بافت کبد در آغاز و پیشرفت آسیب کبدی دخیل است (۸، ۲۰).

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن MPO در بافت کبد نشان داد که اسپرین در مقایسه با دو داروی دیگر، تأثیر بیشتری داشته و میزان بیان ژن MPO را به شکل معناداری کاهش داده است. آشکارترین مکانیسم اسپرین مهار برگشت ناپذیر هر دو آنزیم سیکلواکسیژناز یک و سیکلواکسیژناز دو است (۱۰). مهار از طریق استیل‌اسیون مستقیم و انسداد پروتئین فعال آنزیم ناشی می‌شود. این مهار از تبدیل فسفولیپید مشتق شده غشا آراشیدونیک اسید به ترومبوکسان (TXA2) و پروستاگلاندین‌ها از قبیل پروستاگلاندین پیش التهابی E2 جلوگیری میکند (۲۱). اسپرین به شکل قابل توجهی در مهار COX-1، به خصوص در دوز پایینتر از ۷۵ mg موثر است. COX-1 سبب پروسه‌های هموستاتیک نرمال شامل فعال سازی پلاکت و تجمع از طریق تولید ترومبوکسان A2 است که ویژگی سپسیس و ARDS است. پروستاگلاندین‌ها از مهم‌ترین واسطه‌های التهاب هستند و ایندومتاسین با مهار ساخت آنها سبب کاهش التهاب می‌شود (۲۲، ۲۳). دادخواه و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که سپسیس به ایجاد آسیب‌های ریوی و کبدی ناشی از استرس اکسیداتیو منجر می‌شود و ایندومتاسین در جلوگیری و کاهش این آسیب‌ها از طریق کاهش بیان ژن COX-2 موثر است (۲۴). از آنجا که مطالعه‌ها در مورد مکانیسم‌های عملکردی داروها بر سایر آنزیم‌های دخیل در التهاب محدود است، به نظر می‌رسد که داروی اسپرین با مهار فاکتورهای التهابی بر سایر آنزیم‌های دخیل در این فرآیند نیز تاثیر گذار است. به طوری که Aratani (۲۰۱۸) نشان داد که در مدل‌های حیوانی که فاقد ژن MPO بودند، پاسخ‌های ایمنی به صورت اغراق یافته و بیشتر از حد معمول ظهور می‌کند و این امر روی عملکرد نوتروفیل‌ها و تولید سایتوکاین‌ها تاثیر می‌گذارد (۲۵).

نتیجه‌گیری:

به نظر می‌رسد تیمار حیوانات با داروهای اسپرین، ایندومتاسین و سلوکوکسیب به مهار افزایش میلوپراکسیداز منجر شده و در نتیجه سبب کاهش واکنش‌های زنجیره‌های التهابی بافت کبد و ریه ناشی از سپسیس می‌شود. از بین این سه دارو، سلوکوکسیب دارای تاثیر بیشتری نسبت به دو داروی اسپرین و ایندومتاسین در بافت ریه است در حالی که در بافت کبد اسپرین بیشترین اثر را داشته است. اگرچه مطالعه‌های بیشتر آسیب‌شناسی و مکانیسم‌های بیشتری برای استفاده از این داروها در سپسیس مورد نیاز است.

منابع:

1. Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, Kurosawa S, Remick DG. The pathogenesis of sepsis. Annual review of pathology: mechanisms of disease. 2011 Feb 28;6:19-48.
2. Fitrolaki MD, Dimitriou H, Venihaki M, Katrinaki M, Ilia S, Briassoulis G. Increased extracellular heat shock protein 90 α in severe sepsis and SIRS associated with multiple organ failure and related to acute inflammatory-metabolic stress response in children. *Medicine*. 2016 Aug;95(35).
3. Kaukonen KM, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *New England Journal of Medicine*. 2015 Apr 23;372(17):1629-38.
4. Martin-Loeches I, Levy MM, Artigas A. Management of severe sepsis: advances, challenges, and current status. *Drug design, development and therapy*. 2015;9:2079.
5. Semalty A, Semalty M, Singh D, Rawat MS. Development and characterization of aspirin-phospholipid complex for improved drug delivery. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. 2010;3(2):940-7.
6. Dovizio M, Tacconelli S, Sostres C, Ricciotti E, Patrignani P. Mechanistic and pharmacological issues of aspirin as an anticancer agent. *Pharmaceuticals*. 2012;5(12):1346-71.
7. Ricciotti E, and FitzGerald, G. A. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol*.2011. 31, 986–1000.
8. Aydın S, Şahin TT, Bacanlı M, Taner G, Başaran AA, Aydın M, Başaran N. Resveratrol protects sepsis-induced oxidative DNA damage in liver and kidney of rats. *Balkan medical journal*. 2016 Nov;33(6):594.
9. Jscckson, R. I, Janson, D. Analgesic-antipyretic and anti-inflammatory agents. In: Hardman JE, Limbird LE, (eds). Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Philadelphia: Mc-Graw Hill, 2009.687-751.
10. Haegens A, Van Der Vliet A, Butnor KJ, Heintz N, Taatjes D, Hemenway D, Vacek P, Freeman BA, Hazen SL, Brennan ML, Mossman BT. Asbestos-induced lung inflammation and epithelial cell proliferation are altered in myeloperoxidase-null mice. *Cancer research*. 2005 Nov 1;65(21):9670-7.
11. Panasenko OM, Gorudko IV, Sokolov AV. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems. *Biochemistry (Moscow)*. 2013 Dec 1;78(13):1466-89.
12. Rubin BR, Burton R, Navarra S, Antigua J, Londono J, Pryhuber KG, Lund M, Chen E, Najarian DK, Petruschke RA, Ozturk ZE. Efficacy and safety profile of treatment with etoricoxib 120 mg once daily compared with indomethacin 50 mg three times daily in acute gout: a randomized controlled trial. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*. 2004 Feb;50(2):598-606.
13. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue III LW, Bland KI, Chaudry IH. Cecal ligation and puncture. *Shock*. 2005 Dec 1;24:52-7.
14. Rasooli A, Ghafari E, SAEIDI H, Miri S. Expression changes of CD177 and MPO as novel biomarkers in lung tissue of CLP model rats. *Turkish journal of medical sciences*. 2018 Dec 12;48(6):1321-7.
15. Bej AK, Mahubani MH, Atlas RM. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 1991 Jan 1;26(3-4):301-34.
16. Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*. 2010 Apr 1;50(4):227-30.
17. Schrijver IT, Kemperman H, Roest M, Kesecioglu J, de Lange DW. Myeloperoxidase can differentiate between sepsis and non-infectious SIRS and predicts mortality in intensive care patients with SIRS. *Intensive care medicine experimental*. 2017 Dec 1;5(1):43.
18. Zeraik ML, Ximenes VF, Regasini LO, Dutra LA, Silva DH, Fonseca LM, Coelho D, Machado SA, Bolzani VD. 4'-Aminochalcones as novel inhibitors of the chlorinating activity of myeloperoxidase. *Current medicinal chemistry*. 2012 Nov 1;19(31):5405-13.
19. Annamanedi M, Varma GY, Anuradha K, Kalle AM. Celecoxib enhances the efficacy of low-dose antibiotic treatment against Polymicrobial sepsis in mice and clinical isolates of ESKAPE pathogens. *Frontiers in microbiology*. 2017 May 8;8:805.
20. Balabanlı B, Balaban T. Investigation into the effects of boron on liver tissue protein carbonyl, MDA, and glutathione levels in endotoxemia. *Biological trace element research*. 2015 Oct 1;167(2):259-63.
21. Eliopoulos AG, Dumitru CD, Wang CC, Cho J, Tschlis PN. Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals. *The EMBO journal*. 2002 Sep 16;21(18):4831-40.
22. Meamarbashi A, Rajabi A. Preventive effects of 10-day supplementation with saffron and indomethacin on the delayed-onset muscle soreness. *Clinical Journal of Sport Medicine*. 2015 Mar 1;25(2):105-12.
23. Tartibian, B., Derafshi, B. "The effect of Indomethacin on the biochemical, functional and visual appearance of delayed muscular tachycardia due to eccentric contractions in non-athlete men." 2009. 3: 110-93. (In Persian)
24. Dadkhah, Fatemi, Faezeh, Mohammadi Malayeri, Rasooli, Azadeh, Karvin Ashtiani "The effect of peppermint oil on oxidative stress and COX-2 gene expression in prevention of sepsis ", *Journal of Cellular and Molecular Research*, Dec 22;31(4):567-81.
25. Aratani Y. Myeloperoxidase: its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2018 Jan 11.