

مطالعه تجربی اثرات محافظتی هسپرتین بر آسیب ایسکمی -

بازخون‌رسانی (I/R) روده در موش صحرایی

شاهین گل‌کار^۱، داریوش مهاجری^{۲*}، رامین کفاشی‌الهی^۳

چکیده

مخاط روده به شدت توسط ایسکمی - بازخون‌رسانی (IR) تحت تاثیر قرار می‌گیرد. نشان داده شده است که هسپرتین در برابر آسیب ایسکمی - بازخون‌رسانی در ارگان‌های مختلف دارای اثرات محافظتی می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر هسپرتین بر آسیب ایسکمی - بازخون‌رسانی روده موش صحرایی می‌باشد. بدین منظور، ۴۰ سر موش صحرایی نر و بیستار به‌طور تصادفی به چهار گروه شاهد (گروه ۱)، شاهد جراحی (گروه ۲)، ایسکمی - بازخون‌رسانی (گروه ۳) و ایسکمی - بازخون‌رسانی به‌علاوه تیمار با هسپرتین (گروه ۴) تقسیم شدند. آسیب ایسکمی - بازخون‌رسانی با ۳۰ دقیقه ایسکمی روده و ۶۰ دقیقه خون‌رسانی مجدد ایجاد شد. موش‌های گروه ۴، هسپرتین (۱۰۰۰ U/kg) را ۱۲۰ دقیقه قبل از القاء ایسکمی از طریق تزریق زیرجلدی دریافت کردند. پس از انجام آزمایشات، قسمت کولون روده خارج و جهت آسیب‌شناسی بافتی آماده گردید. فعالیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم و مقادیر مالون-دی‌آلدئید، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتیون پراکسیداز و گلوکاتیون ردوکتاز در بافت کولون اندازه‌گیری شد. آسیب‌شناسی بافتی ارتشاح شدید سلول‌های آماسی، پرخونی و خونریزی لامینا پروپریا، نکروز سلول‌های بافت پوششی کولون و کاهش ضخامت مخاط را در گروه ایسکمی - بازخون‌رسانی نشان داد. مطالعه آسیب‌شناسی، نشان‌دهنده کاهش آسیب بافتی بدنبال مصرف هسپرتین در بافت کولون موش‌های گروه ۴ بود. فعالیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم و مقادیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتیون پراکسیداز و گلوکاتیون ردوکتاز در گروه ایسکمی - بازخون‌رسانی به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) کاهش، ولی در گروه ایسکمی - بازخون‌رسانی به‌علاوه تیمار با هسپرتین، افزایش نشان داد. هسپرتین مقدار مالون‌دی‌آلدئید را که در اثر ایسکمی - بازخون‌رسانی افزایش یافته بود، به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) کاهش داد. نتایج مطالعه نشان داد، هسپرتین می‌تواند روده بزرگ موش‌های صحرایی را از آسیب ایسکمی - بازخون‌رسانی محافظت نماید.

واژگان کلیدی: روده، ایسکمی - بازخون‌رسانی، هسپرتین، موش صحرایی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۲۳

مقدمه

آسیب ایسکمی - بازخون‌رسانی روده در بیماران تحت اعمال جراحی و آسیب تروماتیک با مرگ و میر بالایی همراه است (۱۵).

این آسیب در شرایطی نظیر جراحی آنوریسم آئورت، بای‌پس قلبی - ریوی، فتق‌های اختناقی، آنتروکولیت نکروزان نوزادان و پیوند روده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۸). آسیب ایسکمی - بازخون‌رسانی روده در شوک‌های سپتیک و هیپوولومیک نیز اتفاق می‌افتد (۲۹).

مخاط روده به افت فشار خون احشایی، که وقوع آن پس از اعمال بزرگ جراحی عروق، بای‌پس قلبی ریوی، تروما، سوختگی، شوک هموراژیک، پانکراتیت حاد، بیماری‌های ایسکمیک روده، انسداد عروق مزاتر و پیوند عضو، بویژه پیوند روده کوچک اجتناب‌ناپذیر است، بسیار حساس می‌باشد (۸).

برقراری مجدد جریان خون (بازخون‌رسانی) پس از یک دوره خون‌رسانی ناقص و یا ایسکمی، طیفی از تغییرات را در گردش خون عروق کوچک روده آغاز می‌کند که در نهایت باعث ایجاد آسیب در یکپارچگی پوشش مخاطی روده می‌شود که تحت عنوان آسیب ایسکمی - بازخون‌رسانی (Ischemia-Reperfusion; I/R) روده شناخته می‌شود. ایسکمی با آغاز رویدادهای پیچیده و مرتبط به هم موجب آسیب و در نهایت مرگ سلول‌ها می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که فرآیندهای چندعاملی در توسعه و پیشرفت آسیب ایسکمی - بازخون‌رسانی دخالت دارند. از جمله مهمترین آنها گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن هستند که منجر به از کار افتادن، آسیب و مرگ سلول‌ها می‌گردند. رادیکال‌های آزاد اکسیژن یکپارچگی بافت‌های بیولوژیک را از طریق پروکسیداسیون لیپیدی و تخریب پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک، از بین می‌برند و

۱- دانشجوی دکتری حرفه ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۲* - استاذ گروه پساتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
(daryoushmohajeri@yahoo.com)

۳- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

هستند که در صورت وجود در غذاها و بدن، حتی در مقادیر ناچیز، می‌توانند بدن را در مقابل انواع مختلف آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن محافظت کنند. با انجام این مطالعه خاصیت دارویی هسپرتین در محافظت از بافت روده در شرایط ایسکمی - بازخون‌رسانی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد که در صورت تأیید می‌تواند به عنوان یک منبع قابل دسترس با خاصیت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گیرد.

فلاونوئیدها ترکیبات پلی‌فنلی با خصوصیات فارماکولوژیک متعدد هستند و به عنوان زاینده رادیکال‌های آزاد با گروه هیدروکسیل در ساختار مولکولی‌شان عمل می‌کنند (۴). بر اساس تفاوت در ساختار مولکولی این ترکیبات، شش گروه عمده از فلاونوئیدها وجود دارد که شامل: فلاونول‌ها (flavonols)، فلاون‌ها (flavones)، فلاونون‌ها (flavanones)، کاتچین‌ها (catechins)، آنتوسیانیدین‌ها (anthocyanidins) و ایزوفلاون‌ها (isoflavones) هستند (۱۴).

هسپرتین ترکیبی با سه گروه هیدروکسیل بوده و بنابراین نسبت به سایر فلاونون‌ها توانایی و قدرت آنتی‌اکسیدانی بسیار بالایی داشته و قادر است آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها را تحریک کند. مطالعات نشان داده‌اند که هسپرتین دارای اثرات ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی و حفاظت از سیستم عصبی می‌باشد (۲۵ و ۲۱).

به نظر می‌رسد که مصرف هسپرتین قبل از ایسکمی ممکن است بافت روده را در برابر آسیب ناشی از ایسکمی - بازخون‌رسانی محافظت کند و مطالعه حاضر برای آزمون این فرضیه انجام شد.

مواد و روش کار

این مطالعه در سال ۱۳۹۶ در مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تبریز انجام شد. در این مطالعه کلیه ملاحظات اخلاقی و شیوه نامه کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی مورد تأیید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی، مد نظر قرار گرفت.

موجب آسیب به غشاهای سلولی و آزاد شدن اجزای درون سلولی می‌گردند که باعث آسیب بیشتر بافتی می‌شود. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و سیستم دفاعی غیرآنزیمی اثرات مضر فوق را توسط مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی مختلف به حداقل می‌رسانند. اختلال در عملکرد مخاط روده به دلیل آسیب ایسکمی / بازخون‌رسانی منجر به نفوذپذیری مخاط و عروق آن می‌شود که باعث انتقال باکتری‌ها شده و در نهایت باعث التهاب سیستمیک، نارسایی تنفسی و ناتوانی اندام‌های متعدد می‌شود (۲۴).

مکانیسم‌های درگیر در آسیب ایسکمی / بازخون‌رسانی چند عاملی بوده و به طور گسترده مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته‌اند (۱۷). یکی از این مکانیسم‌ها تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن مانند آنیون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و سایتوکین‌های التهابی است که از مکانیسم‌های دفاعی طبیعی در مخاط پیشی گرفته و به آسیب سلولی منجر می‌گردند (۳۲).

برای محافظت در برابر آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد، سلول‌ها با مکانیسم‌های تدافعی، که شامل آنزیم‌هایی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند، مجهز شده‌اند. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز به عنوان اولین خط دفاعی شناخته شده و ماکرومولکول‌های بیولوژیک مانند دی‌ان‌ای (DNA)، پروتئین‌ها و چربی‌ها را در برابر آسیب رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کنند. سوپراکسید دیسموتاز به سرعت یون سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن کم‌خطر تبدیل می‌کند که بعداً توسط کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز به آب تجزیه می‌شود. بنابراین، سطوح بالای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ممکن است ماکرومولکول‌های سلولی را که به آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو حساس هستند، محافظت کند (۱۷). در کل، شرایط پاتولوژیک نظیر سرطان‌ها، پیری، بیماری‌های قلبی-عروقی، ایسکمی و آماس در تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن دخیل هستند. بنابراین، از بین بردن گونه‌های رادیکال اکسیژن یک راهکار تدافعی موثری در برابر بیماری‌های مختلف قلمداد می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌ها موادی

برش خط وسط (midline incision) ایجاد شد. برای آشکارسازی آئورت بطنی، بخش‌هایی از روده‌ها به خارج از حفره صفاق کنار زده شد. رطوبت و دمای روده‌ها توسط پوشانیدن با گاز استریل خیس شده با نرمال سالین گرم، حفظ شد. در طول آزمایش دمای بدن موش‌ها نیز با استفاده از یک لامپ گرم سربار در حدود 37°C تثبیت شد. برای ایجاد ایسکمی در روده‌ها، آئورت شکمی در قسمت بالاتر از شریان سلیاک به مدت ۳۰ دقیقه به وسیله گیره غیرتروماتیک عروقی مسدود شد. پس از برداشتن گیره‌ها و رفع انسداد، خون‌رسانی مجدد به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد. نمونه‌برداری از خون و روده در تمامی گروه‌ها ۴۵ دقیقه بعد از خون‌رسانی مجدد انجام شد.

جهت ارزیابی و تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم (Total Antioxidant Activity, TAA) ۵ میلی‌لیتر خون از آئورت شکمی موش‌ها اخذ گردید. نمونه‌های خون با سرعت 4000 دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. فعالیت تام آنتی‌اکسیدانی (TAA) توسط تکنیک رنگ سنجی (colorimetric technique) طبق روش Miller و همکاران در سال ۱۹۹۳ با استفاده از کیت تجارتي (Randox Laboratories Ltd, UK) اندازه‌گیری شد (۱۸). $2,2'$ -azinobis-(3-) ABTS (ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) با یک پراکسید (metmyoglobin) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) جهت تولید یک کاتیون رادیکال انکوبه گردید (جذب در 534 nm). این جذب با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ماده تست نسبت معکوس دارد. در نهایت، نتایج به صورت میکرومول در لیتر ($\mu\text{mol/l}$) ارائه شد.

برای تعیین وضعیت آنتی‌اکسیدانی روده، همه موش‌ها هم‌زمان با تزریق دز بالای پنتوباریتال سدیم (sodium pentobarbital) آسان کشتی شدند. حدود ۵ سانتی‌متر از قسمت کولون روده سریعاً خارج و در سالین بسیار سرد شستشو و هموژنات 10% در $1/15\%$ (w/v) کلرور پتاسیم تهیه شد. هموژنات با سرعت 7000 دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 4°C

برای انجام این مطالعه، از ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی 20 ± 20 گرم استفاده شد. شرایط تغذیه و نگهداری برای تمام گروه‌ها یکسان و به صورت ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی و دمای 21 ± 2 درجه سانتی‌گراد بود. هر حیوان در یک قفس جداگانه نگهداری شده و جیره غذایی یکسان و آب نیز به‌طور آزاد در دسترس قرار گرفت و پس از یک هفته عادت به شرایط جدید، آزمایش شروع شد.

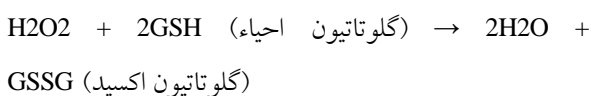
موش‌ها به‌طور تصادفی به ۴ گروه مساوی شامل گروه شاهد سالم، گروه شاهد جراحی، گروه ایسکمی - بازخون‌رسانی و گروه ایسکمی - بازخون‌رسانی و تیمار با هسپریتین تقسیم شدند. در مورد موش‌های گروه شاهد سالم هیچگونه مداخله جراحی و دستکاری روده‌ها انجام نشد. موش‌های گروه شاهد جراحی (Sham) مشابه با گروه ایسکمی - بازخون‌رسانی (I/R) تحت عمل جراحی قرار گرفته ولی متحمل ایسکمی - بازخون‌رسانی روده نشدند. این موش‌ها به مدت برابر با گروه I/R (۳۰ دقیقه ایسکمی و ۶۰ دقیقه بازخون‌رسانی) تحت بیهوشی قرار گرفته و نرمال سالین را به‌طور زیرجلدی دریافت کردند. ۳- موش‌های گروه ایسکمی - بازخون‌رسانی (I/R) تحت عمل جراحی قرار گرفته و به مدت ۳۰ دقیقه تحت ایسکمی، سپس ۶۰ دقیقه دیگر تحت خون‌رسانی مجدد روده قرار گرفتند. موش‌های گروه ایسکمی - بازخون‌رسانی و تیمار با هسپریتین (I/R-) (Hesperetin, Sigma Aldrich, Chemical Co., United Kingdom) را با غلظت 400 U/ml نرمال سالین که قبلاً از طریق حل کردن پودر هسپریتین در دی متیل سولفوکساید (DMSO) آماده شده بود، به میزان 1000 U/kg از راه تزریق داخل صفاقی، ۱۲۰ دقیقه قبل از القاء ایسکمی دریافت کردند. میزان و روش مصرف هسپریتین بر اساس مطالعات Kara و همکاران در سال ۲۰۱۴ انتخاب شد (۱۳).

برای انجام جراحی، موش‌ها با تزریق داخل صفاقی کتامین هیدرو کلراید (100 mg/kg) و زایلازین (20 mg/kg) بیهوش شدند. بعد از تراش موها و ضدعفونی پوست ناحیه شکم،

بافر پیروفسفات سدیم، فننازین متوسولفات (PMTphenazinemethosulfate;) و نیترو-بلو تترازولیوم (Nitro-blue Tertazolium; NBT) مخلوط گردید. واکنش با افزودن نیکوتین آمید-آدنین دی نوکلئوتید (-Nicotinamide) آغاز شد. مخلوط واکنش در دمای ۳۰°C به مدت ۹۰ ثانیه گرمخانه گذاری و با افزودن ۱ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال متوقف گردید. شدت جذب مخلوط رنگزای تشکیل شده در ۵۶۰nm اندازه گیری شد. هر واحد از فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به صورت غلظت آنزیم مورد نیاز برای ممانعت از تولید رنگ تا ۵۰ درصد در ۱ دقیقه، تحت شرایط مطالعه، تعیین گردید.

فعالیت کاتالاز توسط روش Claiborne در سال ۱۹۸۵ و بر اساس تجزیه پراکسید هیدروژن در ۲۴۰nm، مورد سنجش قرار گرفت (۷). به طور خلاصه، مخلوط مورد سنجش متشکل از ۱/۹۵ میلی لیتر بافر فسفات (۷ pH، ۰/۰۵ M)، ۱ میلی لیتر پرکسید هیدروژن (۰/۱۹ M) و ۰/۰۵ میلی لیتر PMS (۱۰٪) در حجم نهایی ۳ میلی لیتر بود. تغییرات در جذب، در ۲۴۰nm اندازه گیری شد. در نهایت نتیجه به شکل «فعالیت کاتالاز در دقیقه» محاسبه گردید.

فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز با استفاده از روش Rotruck و همکاران در سال ۱۹۷۳ و بر اساس واکنش ذیل مورد سنجش قرار گرفت (۲۷).



گلوکاتایون پراکسیداز، در هموزنات بافتی، گلوکاتایون را اکسیده کرده که به طور هم زمان پراکسید هیدروژن به آب احیاء می گردد. این واکنش پس از ۱۰ دقیقه توسط تری کلرواستیک اسید متوقف و گلوکاتایون باقیمانده توسط محلول دی تیوبیس نیتروبنزوئیک اسید (Dithiobisnitrobenzoic acid; DTNB) مجدداً فعال گردیده و منجر به تشکیل ترکیب رنگی می گردد که با اسپکتروفتومتر در ۴۲۰nm اندازه گیری می شود. مخلوط

سانتریفیوژ شده و محلول رویی جهت سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی از طریق اندازه گیری مقدار مالون دی آلدئید (MDA malondialdehyde;) و همچنین برای اندازه گیری فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD superoxide dismutase;)، کاتالاز (CAT catalase;)، گلوکاتایون پراکسیداز (GPX glutathione peroxidase;) و گلوکاتایون ردوکتاز (GR glutathione reductase) مورد استفاده قرار گرفت.

فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی مورد مطالعه و میزان مالون دی آلدئید (MDA) با استفاده از کیت های تجاری موجود (Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, Nanjing, China) و طبق دستورالعمل شرکت تولید کننده کیت انجام شد. مقدار مالون دی آلدئید (MDA) بافتی به صورت نانومول مالون دی آلدئید (nmol) در میلی گرم پروتئین و فعالیت آنتی اکسیدانی به صورت واحدهای قراردادی در میلی گرم پروتئین عنوان گردید.

پراکسیداسیون چربی در بافت روده با روش رنگ سنجی (colorimetrically) بوسیله اندازه گیری TBARS (thiobarbituric acid reacting substances) طبق روش Fraga و همکاران در سال ۱۹۸۸ انجام شد (۱۰). به طور خلاصه: ۰/۱ میلی لیتر هموزنات بافتی با ۲ میلی لیتر معرف Thiobarbituric acid; TBA - trichloroacetic acid; TCA - HCl ۰/۲۵ مول HCL و ۱۵٪ TCA، به نسبت ۱:۱:۱) مخلوط و پس از ۱۵ دقیقه قرارگیری در بن ماری جوش، خنک گردید و در ۳۵۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. شدت جذب محلول رویی شفاف در ۵۳۵nm در مقابل بلانک اندازه گیری گردید. مقادیر به صورت نانومول بر ۱۰۰ گرم بافت بیان شدند.

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز توسط روش Nishikimi و همکاران در سال ۱۹۷۲ تعیین گردید (۲۲). در حدود ۵ میکروگرم از پروتئین های تام هر یک از هموزنات های روده با

شده و برای پایدارسازی بافت روده، فرمالین بافر ۱۰٪ با استفاده از یک سرنگ ۲۰ میلی‌لیتری از یک انتهای روده به داخل آن تزریق شد. برای پایدارسازی بیشتر، نمونه‌ها به داخل محلول فرمالین بافر ۱۰٪ منتقل شدند. از نمونه‌های پایدارشده در فرمالین، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون و با روش رنگ‌آمیزی معمول هماتوکسیلین - ائوزین تهیه شد (۱۶). شدت آسیب روده با یک مقیاس نیمه‌کمی و دوسو بی‌خبر بر اساس روش ارائه شده توسط Gulgun و همکاران در سال ۲۰۱۰ ارزیابی شد که در جدول ۱ آورده شده است. کوتاه شدن ضخامت روده در هر حیوان به صورت: صفر، طبیعی؛ ۱، کوتاه شدن ملایم؛ ۲، کوتاه شدن متوسط، ۳، کوتاه شدن شدید؛ و ۴، مشاهده نشدن پرز درجه‌بندی شد. زخم شدن مخاط روده به صورت: صفر، طبیعی؛ ۱، جدا شدن اپیتلیوم مخاط؛ ۲، از بین رفتن کامل اپیتلیوم مخاط، ۳، از بین رفتن کامل پرز؛ و ۴، تخریب لایه عضلانی درجه‌بندی شد. میزان آماس نیز به صورت: صفر، طبیعی؛ ۱، ارتشاح کانونی سلول‌های آماسی؛ ۲، ارتشاح جزعی سلول‌های آماسی فقط در لامینا پروپریا، ۳، آماس روده در لامینا پروپریا؛ و ۴، آماس شدید روده که به لایه عضلانی نیز گسترش یافته است، درجه‌بندی شد (۱۱). آسیب‌شناسی بافتی با میکروسکوپ نوری مدل نیکون (ECLIPSE E200، ساخت کشور ژاپن) و عدسی چشمی ۱۰× انجام شد.

واکنش‌گر متشکل از ۰/۲ میلی‌لیتر اتیلن دی‌آمین تترآ - استیک اسید (ethylenediamine tetra-acetic acid; EDTA) ۰/۸mM، ۰/۱ میلی‌لیتر آزید سدیم (sodium azide) ۱۰mM، ۰/۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۲/۵mM و ۰/۲ میلی‌لیتر هموزنات بود که در ۳۷°C به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. واکنش با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد متوقف و لوله‌ها با ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. ۳ میلی‌لیتر دی‌سدیم هیدروژن ۰/۸ mM و ۰/۱ میلی‌لیتر DTNB ۰/۰۴ درصد به محلول شناور افزوده شد و بلافاصله رنگ حاصله در ۴۲۰nm اندازه‌گیری شد. فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز به صورت میلی گرم پروتئین/ دقیقه/ میکرومول گلوکاتایون اکسید بیان گردید. فعالیت گلوکاتایون ردوکتاز با استفاده از روش Mohandas و همکاران در سال ۱۹۸۴ بر اساس واکنش ذیل مورد سنجش قرار گرفت (۱۹).



در حضور گلوکاتایون ردوکتاز، گلوکاتایون اکسیده، احیاء گردیده و هم زمان، NADPH به NADP⁺ اکسیده می‌شود. فعالیت آنزیم در دمای اتاق و با ناپدید شدن میزان NADPH در دقیقه با اندازه‌گیری اسپکتروفتومتری کاهش جذب نوری در ۳۴۰nm، تعیین گردید.

برای آسیب‌شناسی بافتی، حدود ۵ سانتی‌متر از کولون برداشته شد. لومن کولون بلافاصله با استفاده از فسفات بافر سالین پاک

جدول ۱- درجه‌بندی آسیب روده بر اساس میزان تخریب مخاط و شدت آماس

درجه آسیب	کوتاه شدن ضخامت روده	میزان تخریب مخاط	میزان آماس
۰	طبیعی	طبیعی	طبیعی
۱	کوتاه شدن ملایم	جدا شدن اپیتلیوم مخاط	ارتشاح کانونی سلول‌های آماسی
۲	کوتاه شدن متوسط	از بین رفتن کامل اپیتلیوم مخاط	ارتشاح جزئی سلول‌های آماسی فقط در لامینا پروپریا
۳	کوتاه شدن شدید	از بین رفتن کامل مخاط	آماس روده در لامینا پروپریا
۴	مشاهده نشدن پرز	تخریب لایه عضلانی	گسترش آماس تا لایه عضلانی

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به دست آمده کمی، به صورت $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$ ارائه و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها توسط آزمون ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey در سطح معنی‌داری $p < 0/05$ توسط نرم‌افزار آماری SPSS مورد تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج

در موش‌های صحرایی گروه شاهد جراحی، هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در پارامترهای مورد آزمایش در مقایسه با گروه شاهد ایجاد نشد. در موش‌های صحرایی گروه تحت ایسکمی - بازخونسازی، فعالیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم و

آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز بافت کولون در مقایسه با گروه شاهد، به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$) کاهش و میزان مالون‌دی‌آلدئید به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$) افزایش یافت. در گروه ایسکمی - بازخونسازی و تیمار با هسپرتین، تیمار با هسپرتین به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$) مانع از افزایش مالون‌دی‌آلدئید و هم‌چنین مانع از کاهش فعالیت تام آنتی-اکسیدانی سرم و آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز در اثر ایسکمی و خونرسازی مجدد شد، به این صورت که تفاوت معنی‌داری بین این گروه و گروه شاهد مشاهده نشد (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه پارامترهای بیوشیمیایی مورد آزمایش بین گروه‌های تحت مطالعه

پارامترهای بیوشیمیایی						گروه‌ها
گلوکاتایون ردوکتاز (U/mg protein)	گلوکاتایون پراکسیداز (U/mg protein)	کاتالاز (U/mg protein)	سوپراکسید دیسموتاز (mU/mg protein)	مالون‌دی‌آلدئید (nmol/g tissue)	فعالیت تام آنتی‌اکسیدانی (micromol/l)	
$2/0 \pm 79/15^a$	$5/0 \pm 37/65^a$	$0/0 \pm 31/08^a$	$4/1 \pm 31/27^a$	$44/5 \pm 25/73^a$	$2/0 \pm 84/35^a$	شاهد
$2/0 \pm 89/13^a$	$5/0 \pm 41/48^a$	$0/0 \pm 33/09^a$	$4/1 \pm 58/15^a$	$46/4 \pm 33/82^a$	$2/0 \pm 94/28^a$	شاهد جراحی
$1/0 \pm 11/06^b$	$3/0 \pm 17/22^b$	$0/0 \pm 16/05^b$	$2/1 \pm 29/18^b$	$78/8 \pm 59/44^b$	$1/0 \pm 11/20^b$	ایسکمی - بازخونسازی
$2/0 \pm 64/12^a$	$5/0 \pm 50/67^a$	$0/0 \pm 32/06^a$	$4/2 \pm 86/11^a$	$47/5 \pm 16/68^a$	$3/0 \pm 12/51^a$	ایسکمی - بازخونسازی و تیمار با هسپرتین

مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار برای ۱۰ سر موش صحرایی در هر گروه ارائه شده است.

a, b: حروف غیرمشابه در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار است ($p < 0/05$).

هسپرتین، به‌طور معنی‌دار ($p < 0/05$) مانع از بروز تغییرات پاتولوژیک در بافت کولون موش‌های صحرایی شد و تنها آسیب قابل مشاهده، کاهش بسیار خفیف مخاط روده، نکروز تعداد معدودی از سلول‌های پوششی مخاط و حضور کانونی و اندک سلول‌های آماسی در بافت مخاط روده تعدادی از موش‌ها بود (نگاره‌های ۵ و ۶) که از این لحاظ اختلاف معنی‌داری بین این گروه و گروه شاهد برآورد نگردید. مقایسه آسیب‌شناسی بافتی کولون موش‌های صحرایی گروه‌های مورد مطالعه به‌طور کمی در جدول ۳ آورده شده است.

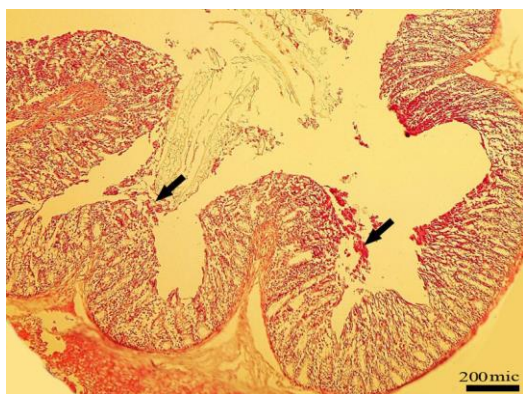
در آسیب‌شناسی بافتی همان‌طوری‌که در نگاره ۱ نشان داده شده است، ساختار بافتی کولون در موش‌های صحرایی گروه ۱ (شاهد) طبیعی و سالم بود. تغییر پاتولوژی خاصی نیز در کولون موش‌های صحرایی گروه ۲ مشاهده نشد. به‌طوری‌که، ساختار بافت کولون، شبیه گروه تیمار کاملاً طبیعی به نظر می‌رسید (نگاره ۲). در کولون موش‌های صحرایی گروه ۳ کاهش ضخامت مخاط، ارتشاح فراوان سلول‌های آماسی و زخم در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌دار ($p < 0/05$) مشاهده گردید (نگاره‌های ۳ و ۴). در گروه ۴ تیمار با

جدول ۳- مقایسه شدت آسیب بافت کولون بین گروه‌های مورد مطالعه

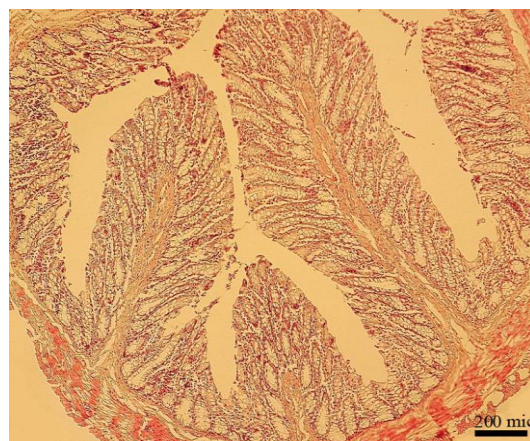
شدت آسیب در بافت کولون	گروه‌ها		
	کاهش ضخامت مخاط	آماس	زخم
	۰/۰±۰/۰ ^a	۰/۰±۰/۰ ^a	۰/۰±۰/۰ ^a
	۰/۰±۰/۰ ^a	۰/۰±۰/۰ ^a	۰/۰±۰/۰ ^a
	۲/۰±۷۹/۶۸ ^b	۲/۰±۳۰/۵۴ ^b	۲/۰±۱۱/۴۷ ^b
	۰/۰±۴۴/۰۷ ^a	۰/۰±۲۸/۰۵ ^a	۰/۰±۲۵/۰۴ ^a

مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار برای ۱۰ سر موش صحرایی در هر گروه ارائه شده است.

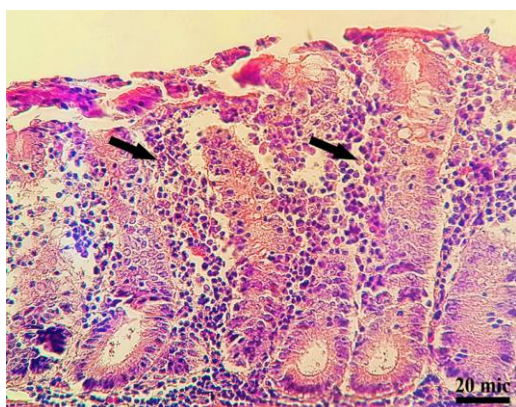
a,b: حروف غیرمشابه در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار است ($p < 0.05$).



نگاره ۳- نمای میکروسکوپی از بافت کولون یک موش صحرایی از گروه ایسکمی - بازخون‌رسانی: نکروز و خونریزی و جدا شدن بافت پوششی مخاط روده (پیکان‌ها) و کاهش ضخامت مخاط مشاهده می‌شود (H&E, 40×).



نگاره ۱- نمای میکروسکوپی از بافت کولون یک موش صحرایی از گروه شاهد: بافت روده کاملاً سالم و طبیعی است (H&E, 40×).



نگاره ۴- نمای میکروسکوپی دیگر با بزرگنمایی بیشتر از بافت کولون یک موش صحرایی از گروه ایسکمی - بازخون‌رسانی: نکروز و جدا شدن بافت پوششی مخاط روده و ارتشاح زیاد سلول‌های آماسی در ضخامت مخاط (پیکان‌ها) مشاهده می‌شود (H&E, 250×).

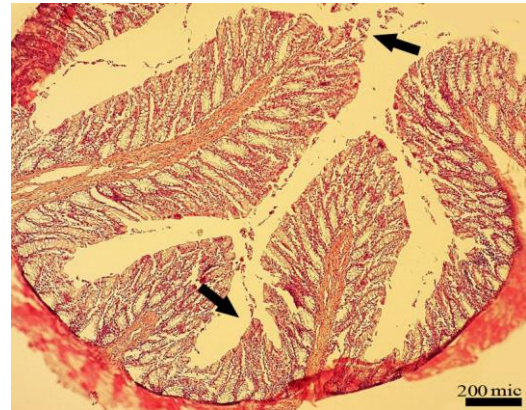


نگاره ۲- نمای میکروسکوپی از بافت کولون یک موش صحرایی از گروه شاهد جراحی: آسیب بافتی قابل ملاحظه‌ای در بافت روده مشاهده نمی‌شود (H&E, 40×).

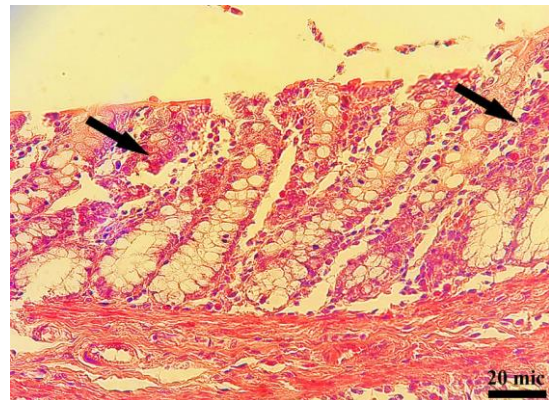
فعالیت آنتی‌اکسیدانی در بافت کولون، نشان داد که استرس-اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد، یکی از مکانیسم‌های احتمالی در پاتوفیزیولوژی آسیب ایسکمی - بازخون‌رسانی روده‌ای می‌باشد. اثرات آسیب‌رسان خون‌رسانی مجدد بر مخاط روده پس از یک دوره کاهش خون‌رسانی، به دلیل اثرات متقابل پیچیده فاکتورهای متعددی در گردش خون مخاطی است که در نهایت منجر به درجات متفاوتی از آسیب مخاط خواهد شد. یکی از مکانیسم‌های اصلی موثر در این روند آسیب، تولید موضعی گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد. مطالعات انجام شده توسط Okudan و همکاران در سال ۲۰۱۳ نیز نقش استرس اکسیداتیو در آسیب ناشی از ایسکمی - بازخون‌رسانی در روده را مورد تأیید قرار می‌دهد (۲۳).

وجود التهاب در بافت مخاطی روده نیز حاکی از وقوع استرس اکسیداتیو در این بافت می‌باشد که با افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش محتوای گلوتاتیون احیا اثبات می‌گردد (۳۱). افزایش تجمع نوتروفیل و تولید گونه‌های فعال اکسیژن باعث اختلال در گردش خون مویرگی مخاط روده شده و نقشی اساسی را در ایجاد زخم در این بافت برعهده دارد. گونه‌های فعال اکسیژن تجمع لکوسیت‌ها را در بافت‌ها سبب می‌شود. لکوسیت‌های فعال آنزیم‌هایی مانند میلوپراکسیداز، الاستاز و پروتئازها را ترشح کرده و رادیکال‌های آزاد بیشتری را تولید می‌کنند (۲۸).

همچنین گونه‌های فعال اکسیژن باعث افزایش نفوذپذیری در سلول‌های آندوتلیال عروق و بافت پوششی می‌شود. افزایش در نفوذپذیری روده باعث می‌شود که باکتری‌ها و آندوتوکسین‌ها از سد روده‌ای نفوذ کرده و سبب ایجاد آماس و تولید بیشتر گونه‌های فعال اکسیژن در آن گردند. گونه‌های فعال اکسیژن از طریق واکنش با اسیدهای چرب غیر اشباع غشاهای سلولی، اسیدهای نوکلئیک و باندهای سولفیدریل پروتئین‌ها، باعث آسیب روده در اثر استرس اکسیداتیو ناشی از آسیب ایسکمی - بازخون‌رسانی می‌شوند (۱۷). بدین ترتیب، پراکسیداسیون



نگاره ۵- نمای میکروسکوپی از بافت کولون یک موش صحرایی از گروه ایسکمی - بازخون‌رسانی به‌علاوه تیمار با هسپرتین: کاهش خفیف ضخامت مخاط، نکروز تعداد اندکی از سلول‌های بافت پوششی مخاط کولون (پیکان‌ها) قابل مشاهده است (H&E, 40×).



نگاره ۶- نمای میکروسکوپی دیگر با بزرگنمایی بیشتر از بافت کولون یک موش صحرایی از گروه ایسکمی - بازخون‌رسانی به‌علاوه تیمار با هسپرتین: نکروز تعداد اندکی از سلول‌های بافت پوششی مخاط کولون و ارتشاح کم سلول‌های آماسی (پیکان‌ها) قابل مشاهده است (H&E, 250×)

بحث

در بررسی حاضر، مطالعه ریزینی بافت کولون، تغییرات آماسی، کاهش ضخامت مخاط، نکروز و زخم‌های مخاطی روده را در اثر آسیب ایسکمی - بازخون‌رسانی نشان داد که این یافته با نتایج مطالعه Abdeen و همکاران در سال ۲۰۱۱ هم‌خوانی دارد (۱). در این مطالعه افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش

این آنزیم ممکن است دلیلی برای کاهش پاک‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن توسط گلووتاتیون احیا باشد که به آسیب اکسیداتیو بافت روده منجر می‌شود. گلووتاتیون ردوکتاز یک آنزیم سیتوزولی است که در کاهش گلووتاتیون اکسید، به عنوان محصول نهایی فعالیت گلووتاتیون پراکسیداز روی گلووتاتیون احیا، دخالت دارد (۲۰).

اغلب گزارش‌ها نشان داده‌اند که استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها باعث کاهش اثرات مخرب خون‌رسانی مجدد در مخاط روده می‌شود (۲۴ و ۵).

در این مطالعه، موش‌های گروه ایسکمی - بازخون‌رسانی به‌علاوه تیمار با هسپرتین، هسپرتین را به طور تازه با حل کردن پودر در حلال دی‌متیل سولفوکسید، به میزان ۲۰ mg/kg از راه تزریق داخل صفاقی، ۱۲۰ دقیقه قبل از القا ایسکمی دریافت کردند. نتایج نشان داد که مخاط روده موش‌های این گروه ساختار خود را در حدی نزدیک به حالت طبیعی حفظ کرده است. این یافته با گزارشات سایر محققین که انواع مختلف آنتی‌اکسیدان‌ها را مورد استفاده قرار داده بودند، در توافق می‌باشد (۳۳).

در این مطالعه مصرف هسپرتین مانع از کاهش فعالیت تام آنتی-اکسیدانی سرم و آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلووتاتیون پراکسیداز و گلووتاتیون ردوکتاز در اثر آسیب ایسکمی - بازخون‌رسانی شد. این اتفاق ممکن است در اثر زدایش رادیکال‌های آزاد توسط هسپرتین باشد که باعث حفظ این آنزیم‌ها شده است. در هر صورت، نتایج بیوشیمیایی، در توافق با نشانه‌ها و شواهد، با یافته‌های مشاهدات ریزینی به‌دست آمده از این بررسی نیز هم‌راستا بود.

نتایج بررسی حاضر، گزارش سایر محققین در خصوص اثرات آنتی‌اکسیدانی و زدایش رادیکال‌های آزاد توسط هسپرتین را مورد تأیید قرار می‌دهد (۱۲). تحقیقاتی که توسط Testai و همکاران در سال ۲۰۱۳ به انجام رسیده است اثرات مفید آنتی‌اکسیدانی هسپرتین بر آسیب ایسکمی - بازخون‌رسانی میوکارد قلب را به اثبات رسانده است (۳۰).

لیپیدی، که در آسیب غشاهای سلولی میزان آن افزایش پیدا می‌کند، اتفاق می‌افتد. افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید در موش‌های دچار آسیب ایسکمی - بازخون‌رسانی اهمیت پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن را در این نوع آسیب روده‌ای مشخص می‌کند.

در بررسی حاضر کاهش معنی‌دار فعالیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم و آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلووتاتیون پراکسیداز و گلووتاتیون ردوکتاز مشاهده شد که این یافته با نتایج مطالعه Abdeen و همکاران در سال ۲۰۱۱ و Okudan و همکاران در سال ۲۰۱۳ همخوانی دارد (۲۳ و ۱). ایشان این تغییرات را به پاسخ بافت به استرس اکسیداتیو ناشی از بازخون‌رسانی بافت نسبت داده‌اند.

کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز شاخصی دقیق برای آسیب سلول‌ها است. این آنزیم یکی از مهم‌ترین عوامل در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی به شمار می‌رود. سوپراکسید دیسموتاز، آنیون سوپراکسید را با تبدیل آن به پراکسید هیدروژن از محل زدوده و بدین ترتیب اثرات سمی آن را کاهش می‌دهد (۹). در مطالعه ما، میزان سوپراکسید دیسموتاز در بافت روده موش‌های صحرایی دچار آسیب ایسکمی - بازخون‌رسانی به دلیل تشکیل فراوان آنیون‌های سوپراکسید، به طور معنی‌داری کاهش یافت که به دنبال آن فعالیت آنزیم‌های زداینده پراکسید هیدروژن یعنی کاتالاز و گلووتاتیون پراکسیداز نیز به طور معنی‌داری کاهش یافت. غیرفعال شدن سوپراکسید دیسموتاز توسط آنیون‌های افزایش یافته سوپراکسید، منجر به غیرفعال شدن آنزیم‌های کاتالاز و گلووتاتیون پراکسیداز می‌شود. کاتالاز با تجزیه پراکسید هیدروژن بافت‌ها را در برابر رادیکال‌های بسیار فعال هیدروکسیل محافظت می‌کند. بنابراین، کاهش فعالیت کاتالاز ممکن است به بروز اثرات مخرب ناشی از رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن منجر شود (۶).

در مطالعه ما فعالیت آنزیم گلووتاتیون ردوکتاز که برای تولید مجدد گلووتاتیون احیا ضروری است، متعاقب آسیب ایسکمی - بازخون‌رسانی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. کاهش فعالیت

3. Aranganathan S1, Nalini N. (2009): Efficacy of the potential chemopreventive agent, hesperetin (citrus flavanone), on 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. *Food Chem. Toxicol.* 47(10): 2594-600.
 4. Arul, D., Subramanian, P. (2013): Inhibitory effect of naringenin (citrus flavonone) on N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434: 203-209.
 5. Berber, I., Aydin, C., Cevahir, N., Yenisey, C., Gumrukcu, G., Kocbil, G. (2009): Tempol reduces bacterial translocation after ischemia/reperfusion injury in a rat model of superior mesenteric artery occlusion. *Surg. Today.* 39: 407-413.
 6. Chance, B., Greenstein, D.S., Roughton, R.J.W. (1952): The mechanism of catalase action. I. Steady-state analysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 37(2): 301-321.
 7. Claiborne, A. (1985): Catalase activity. In: *CRC Handbook of methods for oxygen radical research*, 3rd Edition (ed. Robert A.). CRC Press: Florida; ۲۷
 - 3-284.
 8. Collard, C.D., Gelman, S. (2001): Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology.* 94(6): 1133-1138.
 9. Curtis, S.J., Mortiz, M., Sondgrass, P.J. (1972): Serum enzymes derived from liver cell fractions. I. The response to carbon tetrachloride intoxication in rats. *Gastroenterology.* 62(1): 84-92.
 10. Fraga, C.G., Leibovitz, B.E., Tappel, A.L. (1988): Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free. Radic. Biol. Med. and Med.* 4(3): 155-161.
 11. Gulgun, M., Erdem, O., Ozta, E., Kesik, V., Balamtekin, N., Vurucu, S. (2010): Proanthocyanidin prevents methotrexate-induced intestinal damage and oxidative stress. *Exp. Toxicol. Pathol.* 62(2): 109-115.
- در مطالعات پیشین اثرات مفید هسپرتین بر آسیب ایسکمی - بازخون‌رسانی میوکارد قلب، کلیه و پانکراس به اثبات رسیده است (۲). تحقیقات نشان داده است که هسپرتین در پیشگیری از سرطان قولون القا شده توسط ۲-دی‌متیل هیدرازین در موش صحرایی موثر بوده است (۳). مطالعات انجام شده توسط Raza و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داده است که هسپرتین ساختار و عملکرد مغز را در برابر آسیب ایسکمی تجربی مغز در موش‌های صحرایی محافظت می‌کند (۲۶). بررسی‌های انجام شده توسط Kara و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان داده است که هسپرتین بافت شبکه موش صحرایی را در برابر آسیب ایسکمی - بازخون‌رسانی به خوبی محافظت می‌کند (۱۳).
- با توجه به اینکه در موش‌هایی که هسپرتین را دریافت نمودند، مخاط روده تا حد زیادی از اثرات مخرب استرس اکسیداتیو در امان ماند و هسپرتین فعالیت آنتی‌اکسیدانی روده و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را حتی تحت شرایط ایسکمیک، به طور مطلوبی حفظ نمود، بنابراین حد قابل قبولی می‌تواند در محافظت از بافت کولون موش‌های صحرایی در برابر آسیب ایسکمی - بازخون‌رسانی موثر واقع شود. بنابراین، هسپرتین می‌تواند پس از انجام کارآزمایی‌های بالینی و کسب نتایج مفید، در موارد انسداد اختناقی روده، جراحی‌های قلبی - عروقی، جراحی‌های آنورت بطنی و پیوند روده که آسیب ایسکمی - بازخون‌رسانی روده مشکلات جدی را برای بیمار فراهم می‌کند، مورد استفاده قرار گیرد.

فهرست منابع

1. Abdeen, S.M., Mathew, T.C., Dashti, H.M., and Asfar, S. (2011): Protective effects of green tea on intestinal ischemia-reperfusion injury. *Nutrition.* 27(5): 598-603.
2. Ahlenstiel, T., Burkhardt, G., Köhler, H., Kuhlmann, M.K. (2006): Improved cold preservation of kidney tubular cells by means of adding bioflavonoids to organ preservation solutions. *Transplantation.* 81(2): 231-239.

12. Haidari, F., Keshavarz, S.A., Rashidi, M.R., Shahi, M.M. (2009): Orange juice and hesperetin supplementation to hyperuricemic rats alter oxidative stress markers and xanthine oxidoreductase activity. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 45(3): 285-291.
13. Kara, S., Gencer, B., Karaca, T., Tufan, H.A., Arikan, S., Ersan, I. (2014): Protective Effect of Hesperetin and Naringenin against Apoptosis in Ischemia/Reperfusion-Induced Retinal Injury in Rats. *Sci. World. J.* 14: 797-804.
14. Kinoshita, T., Lepp, Z., Kawai, Y., Terao, J., Chuman H. (2006): An integrated database of flavonoids. *Biofactors.* 26(3): 179-188.
15. Koike, K., Moore, F.A., Moore, E.E., Read, R.A., Carl, V.S., Banerjee, A. (1993): Gut ischemia mediates lung injury by a xanthine oxidase-dependent neutrophil mechanism. *J. Surg. Res.* 54(5): 469-473.
16. Lee, G., Luna, H.T. (1988): Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology 3rd Edition. The Blakiston Division, Michigan. P: 32-107.
17. Mallick, J.H., Yang, W.X., Winslet, M.C., Seifalian, A.M. (2004): Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig. Dis. Sci.* 49: 1359-1377.
18. Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A. (1993): A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84: 407-412.
19. Mohandas, J., Marshall, J.J., Duggin, G.G., Horvath, J.S., Tiller, D.J. (1984): Low activities of glutathione-related enzymes as factors in the genesis of urinary bladder cancer. *Cancer Res.* 44(11): 5086-5091.
20. Naik, S.R., Panda, V.S. (2008): Hepatoprotective effect of Ginkgoselectphytosome® in rifampicin induced liver injury in rats: Evidence of antioxidant activity. *Fitoterapia.* 79(6): 439-45.
21. Nalini, N., Aranganathan, S., Kabalimurthy, J. (2012): Chemopreventive efficacy of hesperetin (citrus flavonone) against 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Toxicol. Mech. Methods.* 22: 397-408.
22. Nishikimi, M., Appaji, N., Yagi, K. (1972): The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazinemethosulfate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46(2): 849-854.
23. Okudan, N., Belviranlı, M., Gökbel, H., Oz M., Kumak A. (2013): Protective effects of curcumin supplementation on intestinal ischemia reperfusion injury. *Phytomedicine.* 20(10): 844-848.
24. Ozkan, O.V., Yuzbasioglu, M.F., Ciralik, H., Kurutas, E.B., Yonden Z., Aydin, M. (2009): Resveratrol, a natural antioxidant, attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Tohoku J. Exp. Med.* 218: 251-258.
25. Pollard, S.E., Whiteman, M., Spencer, J.P.E. (2006): Modulation of peroxynitrite-induced fibroblast injury by hesperetin: a role for intracellular scavenging and modulation of ERK signalling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347(4): 916-923.
26. Raza SS, Khan MM, Ahmad A, Ashafaq M, Khuwaja G, Tabassum R, Javed H, Siddiqui MS, Safhi MM, Islam F. (2011): Hesperidin ameliorates functional and histological outcome and reduces neuroinflammation in experimental stroke. *Brain Res.* 1420: 93-105.
27. Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G., Hoekstra, W.G. (1973): Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 179(73): 588-590.
28. Sener, G., Eksioğlu-Demiralp, E., Cetiner, M., Ercan, F., Yegen, B.C. (2006): β glucan ameliorates methotrexate induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *Eur. J. Pharmacol.* 542: 170-178.
29. Swank, G.M., Deitch, E.A. (1996): Role of the gut in multiple organ failure: Bacterial translocation and permeability changes. *World J. Surg.* 20(4): 411-417.
30. Testai, L., Martelli, A., Cristofaro, M., Breschi, M.C., Calderone V. (2013): Cardioprotective effects of different flavonoids against myocardial

- ischaemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts. *J. Pharm. Pharmacol.* 65: 750-756.
31. Viswa, K.K., Premila, A., Bina, I. (2007): Alteration in antioxidant defense mechanisms in the small intestines of methotrexate treated rat may contribute to its gastrointestinal toxicity. *J. Cancer Ther.* 5: 501-510.
32. Yamamoto, S., Tanabe, M., Wakabayashi, G., Shimazu, M., Matsumoto, K., Kitajima, M. (2001): The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in ischemia-reperfusion injury of the rat small intestine. *J. Surg. Res.* 99: 134-141.
33. Yildiz, Y., Kose, H., Cecen, S., Ergin, K., Demir, E.M., Serter, M. (2010): Protective effect of leflunomide on intestinal ischemia-reperfusion injury: leflunomide against intestinal ischemia-reperfusion. *Dig. Dis. Sci.* 55: 245-252.