

مطالعه اثرات محافظتی کوئرستین بر آسیب روده باریک، ناشی از

متوترکسات در موش صحرایی

داریوش مهاجری*^۱، علیرضا منادی^۱، رامین کفاشی الهی^۱، مهرداد نشاط قراملکی^۲

چکیده

آسیب روده یکی از مهمترین اثرات سمی متوترکسات می‌باشد. هدف این مطالعه ارزیابی تاثیر محافظتی کوئرستین بر آسیب روده باریک ناشی از متوترکسات در موش صحرایی می‌باشد. تعداد ۳۶ سر موش صحرایی نر و بیستار به‌طور تصادفی به چهار گروه برابر تقسیم شدند. گروه اول شاهد سالم بود. به گروه دوم فقط کوئرستین (۱۵ mg/kg) به‌طور داخل صفاقی به مدت ۱۵ روز متمادی تزریق شد. به گروه سوم تک دوز متوترکسات (۲۰ mg/kg) در روز پانزدهم به‌طور داخل صفاقی تزریق شد. به گروه چهارم علاوه بر متوترکسات، کوئرستین نیز تا زمان معده‌وم سازی موش‌ها تزریق شد. همه موش‌ها ۴ روز پس از تزریق متوترکسات جهت آسیب‌شناسی بافتی و ارزیابی فعالیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم و مقادیر بافتی گلوپروتئین احیاء، مالون‌دی‌آلدنید، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوپروتئین پراکسیداز و گلوپروتئین ردونکاز آسان‌گشتی شدند. در مشاهدات ریزینی، ژوژنوم گروه تیمار با متوترکسات، کوتاه و کُندشدگی شدید پرزها، ارتشاح سلول‌های آماسی، خونریزی زیر غشاء پایه و نکروز سلول‌های پوششی را نشان داد، در حالی که کوئرستین آسیب ژوژنوم را کاهش داد. فعالیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم و مقادیر گلوپروتئین احیاء، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوپروتئین پراکسیداز و گلوپروتئین ردونکاز در گروه تیمار با متوترکسات کاهش یافت ولی به‌طور معنی‌داری ($p=0/000$) در گروه تیمار با کوئرستین و متوترکسات افزایش یافت. کوئرستین مقدار مالون‌دی‌آلدنید را که در اثر تیمار با متوترکسات افزایش یافته بود به‌طور معنی‌داری ($p=0/000$) کاهش داد. نتایج نشان داد کوئرستین با خواص آنتی‌اکسیدانی خود روده باریک موش‌های صحرایی را از آسیب ناشی از متوترکسات محافظت کند.

واژگان کلیدی: متوترکسات، روده، کوئرستین، موش صحرایی.

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۸

مقدمه

شیمی‌درمانی روندی است پیچیده و طولانی که با مشکلات و عوارض جانبی متعددی مثل ریزش مو، تهوع، استفراغ و اسهال همراه می‌باشد. متوترکسات که آنالوگی از اسید فولیک

می‌باشد، به عنوان یک داروی شیمی‌درمانی به طور گسترده برای درمان تعداد قابل توجهی از بدخیمی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۳). علاوه بر سلول‌های سرطانی، سلول‌هایی که سریعاً تزیید می‌یابند، نظیر مغز استخوان و بافت پوششی دستگاه گوارش تحت تاثیر متوترکسات قرار می‌گیرند. التهاب مخاطات دستگاه گوارش، تهوع، اسهال، استفراغ و آنتروکولیت مهمترین عوارضی هستند که متعاقب مصرف متوترکسات مشاهده می‌شوند (۱۳). مشخص شده است که متوترکسات میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را در سلول‌ها کاهش داده و منجر به حساس شدن سلول‌ها به آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود (۱۴). بنابراین، برای کنترل عوارض جانبی متوترکسات تحقیقات اخیر عمدتاً روی تاثیر آنتی‌اکسیدان‌ها متمرکز شده‌اند. برخی از گزارشات به تاثیر مثبت مصرف همزمان متوترکسات با آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر ویتامین آ، عصاره سیر، ان - استیل سیستین، تنگستات سدیم و پروآنتوسیانیدین تاکید داشته‌اند (۳۲ و ۱۸، ۱۲).

مواد بیولوژیک با منشأ گیاهی شاخه‌ای از فارماکوتراپی مدرن بیماری‌ها را تشکیل می‌دهند. اگر چه عوامل دارویی متنوعی برای درمان انواع بیماری‌ها وجود دارد، لکن اغلب بیماران قادر به تحمل اثرات جانبی داروهای شیمیایی نیستند و از سوی دیگر اکثر مواد بیولوژیک با منشأ طبیعی اثرات جانبی بسیار اندکی روی بیماران به جای می‌گذارند. فلاونوئیدها که گروه بزرگی از پلی‌فنل‌ها با بیش از ۴۰۰۰ ترکیب هستند، یکی از مهمترین دستجات ترکیبات طبیعی در گیاهان، سبزیجات، میوه‌ها و نوشیدنی‌ها هستند. فلاونوئیدها دارای اثرات

*۱- گروه پاتوبیولوژی، واحد تریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تریز، ایران

daryoushmohajeri@yahoo.com

۲- گروه علوم درمانگاهی، واحد تریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تریز، ایران

آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد سرطانی، ضد آلرژی، ضد میکروبی، ضد ویروسی، ممانعت از شکنندگی و خونریزی عروق و محافظت از قلب می‌باشند (۲). کوئرستین (Quercetin) که یکی از فلاونوئیدهای رایج مواد غذایی محسوب می‌شود، بیش از ۶۰ درصد فلاونوئید موجود در رژیم غذایی را تشکیل می‌دهد و میزان آن در پیاز و چای سیاه نسبت به بقیه مواد غذایی بیشتر می‌باشد. اثر بخشی کوئرستین در کنترل و درمان فشار خون بالا، ایسکمی قلب، نارسایی احتقانی قلب، افزایش چربی خون، آترواسکلروز، اختلالات انعقادی خون، افزایش قند خون، نوروپاتی دیابتی، نکروز و ضایعات بافت‌های مختلف در اثر ایسکمی مورد تایید قرار گرفته است (۱). با توجه به مجموعه فوق‌الذکر و اثرات آنتی‌اکسیدانی کوئرستین، گمان می‌رود این ماده بتواند بافت روده را در مقابل اثرات توکسیک داروی متوترکسات محافظت کند. در هر صورت با توجه به بررسی منابع، مطالعه‌ای در رابطه با اثرات محافظتی کوئرستین در برابر اثرات توکسیک متوترکسات در روده موش صحرائی وجود ندارد. بنابراین، مطالعه حاضر برای اولین بار جهت ارزیابی اثرات محافظتی کوئرستین در برابر اثرات توکسیک متوترکسات بر روده موش صحرائی انجام گردید.

مواد و روش کار

مطالعه حاضر از نوع تجربی آزمایشگاهی بوده و در سال ۱۳۹۲ در مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تبریز انجام شد. در این مطالعه کلیه ملاحظات اخلاقی و پروتکل‌های کار روی حیوانات آزمایشگاهی مورد تأیید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید.

برای انجام این مطالعه، از تعداد ۳۶ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار با وزن 20 ± 200 گرم و در محدوده سنی ۶-۷ هفته استفاده شد. شرایط تغذیه و نگهداری برای تمام گروه‌ها یکسان و به صورت ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی و دمای 22 ± 21 درجه

سانتی‌گراد بود. جیره غذایی یکسان و آب نیز به‌طور آزاد در دسترس قرار گرفته و پس از یک هفته عادت به شرایط جدید، آزمایش شروع شد. همه تیمارها بین ساعات ۱ تا ۶ بعد از ظهر اجرا شد.

موش‌ها به‌طور تصادفی به ۴ گروه مساوی تقسیم شدند. گروه اول به عنوان شاهد سالم در نظر گرفته شد. گروه دوم به مدت ۱۵ روز داروی کوئرستین (پودر خالص از شرکت سیگما، آمریکا) را با دز ۱۵ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی دریافت کرد (۱۰). گروه سوم تک دز متوترکسات (از شرکت سیگما، آمریکا) را به میزان ۲۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی (۲۵) در روز پانزدهم مطالعه دریافت کرد. گروه چهارم داروی کوئرستین را با دز ۱۵ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی به مدت ۱۵ روز و تک دز متوترکسات را به میزان ۲۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی در روز پانزدهم دریافت کرد. به گروه شاهد، همزمان با تیمار سایر گروه‌ها نرمال سالین به میزان ۱۰ میلی‌لیتر به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی تزریق شد. چهار روز پس از دریافت متوترکسات نمونه خون ناشتا جهت ارزیابی و تعیین فعالیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم (Total Antioxidant Activity, TAA) از سینوس پشت کره چشم (Retro-orbital plexus) اخذ گردید. نمونه‌های خون با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. فعالیت تام آنتی‌اکسیدانی پلاسما توسط تکنیک رنگ سنجی (Colorimetric technique) طبق روش Miller و همکاران با استفاده از کیت تجارتي (Randox Laboratories Ltd, UK) اندازه‌گیری شد (۱۷). ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) با یک پراکسید (Met-myoglobin) و H_2O_2 جهت تولید یک کاتیون رادیکال (OH^\cdot) انکوبه گردید شدت جذب در $nm\ 34$ توسط اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. این جذب با ظرفیت آنتی

(ethylenediaminetetraacetate)، ۵ میکرولیتر گزانتین اکسیداز (xanthine oxidase) و ۵۰ میکرولیتر گزانتین بود. به مخلوط فوق ۱۵۰ میکرولیتر دی‌فنیل تترازولیوم بروماید (diphenyl tetrasolium bromide; MTT) و نمونه (۱۵۰-۵۰ میکروگرم پروتئین) افزوده شد و حجم آن به وسیله آب به یک میلی‌لیتر رسانده شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق (۳۰ درجه سانتی‌گراد) انکوبه گردید و واکنش با افزودن یک میلی‌لیتر بافر متوقف کننده (اسید استیک گلاسیال) به پایان رسید و شدت جذب در ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید. یک واحد سوپراکسید دیسموتاز بر اساس مقدار پروتئین لازم برای جلوگیری از کاهش MTT تا ۵۰ درصد (ممانعت از تولید رنگ تا ۵۰ درصد) در ۱ دقیقه، تحت شرایط مطالعه، تعیین شد. (ب) اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز

فعالیت کاتالاز با اندازه‌گیری تغییر جذب در ۲۴۰ نانومتر با استفاده از پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به‌عنوان سوبسترا تخمین زده می‌شود (۳). برای آغاز واکنش به یک میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن بافر ۳۰ میلی‌مولار، آنزیم (نمونه) اضافه گردید. حجم نهایی توسط فسفات بافر ۰/۰۵ مولار با pH برابر ۷، به ۲ میلی‌لیتر رسید. تغییر در چگالش نوری به مدت ۲ دقیقه در ۲۴۰ نانومتر مورد مشاهده قرار گرفت. یک واحد، برابر با مقدار آنزیمی است که پراکسید هیدروژن را با سرعت ۳-۱۰ جذب در ثانیه تجزیه می‌کند.

(ج) اندازه‌گیری فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز گلوتاتیون پراکسیداز تام بر اساس روش Nakamura و Hosada با اکسیداسیون NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) توسط پراکسید هیدروژن در ۳۴۰ نانومتر تعیین می‌شود (۲۱). به ۰/۲۵ میلی‌لیتر فسفات بافر ۰/۴ مولار، ۰/۲ میلی‌لیتر EDTA (Ethylenediamine-tetra-) (acetic acid) ۴ میلی‌مولار، ۰/۲ میلی‌لیتر گلوتاتیون احیاء (reduced glutathione; GSH)، ۰/۲ میلی‌لیتر سدیم آزید (Na₃ Sodium; azide)، ۰/۲ میلی‌لیتر NADPH ۱/۶

اکسیدانی ماده تست نسبت معکوس دارد. نتایج به صورت میکرومول در لیتر ارائه شد. برای تعیین وضعیت آنتی‌اکسیدانی روده، همه موش‌ها هم‌زمان با ایجاد دررفتگی در مهره‌های گردن (Cervical dislocation) آسان‌کشی شدند. قسمت ژوژنوم روده موش‌ها سریعاً خارج و در سالیان بسیار سرد شستشو و هموژنات ۱۰٪ در ۱/۱۵ (w/v) کلرور پتاسیم تهیه شد. هموژنات با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و محلول رویی جهت سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی از طریق اندازه‌گیری مقدار مالون‌دی‌آلدئید (Malondialdehyde; MDA) و گلوتاتیون احیاء (Reduced Glutathione; GSH) و همچنین برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide Dismutase; SOD)، کاتالاز (Catalase; CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز (Glutathione peroxidase; GPx) و گلوتاتیون ردوکتاز (Glutathione reductase; GR) مورد استفاده قرار گرفت.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد مطالعه و میزان MDA و GSH با استفاده از کیت‌های تجاری موجود (Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, Nanjing, China) طبق دستورالعمل شرکت تولید کننده کیت انجام شد. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به صورت واحدهای قراردادی در میلی‌گرم پروتئین، مقدار MDA بافتی به صورت نانومول در گرم بافت و مقدار گلوتاتیون احیاء به صورت میکرومول در گرم بافت عنوان گردید.

(الف) اندازه‌گیری فعالیت سوپراکسید دیسموتاز فعالیت سوپراکسید دیسموتاز توسط روش Ohkuma و همکاران تعیین گردید (۲۳). مخلوط واکنش متشکل از ۱۰۰ میکرولیتر فسفات بافر، ۱۰ میکرولیتر بوتیل اسکوپالامین (butylscopolamin; BSC)، ۵۰ میکرولیتر تریتون-۱-کس-۱۰۰ (Triton X-100)، ۵ میکرولیتر EDTA

به شدت تکان داده شد. بعد از سانتریفیوژ با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، شدت جذب لایه ارگانیک در ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار TBARS (Thiobarbituric acid reacting substances) به دست آمده با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده توسط محلول ۱، ۱، ۳، ۳، ۳ ترامتوکسی پروپان (1, 1', 3, 3' tetramethoxy propane) محاسبه و مقادیر به صورت نانومول در میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

(و اندازه‌گیری گلوکاتایون احیاء تیول غیر پروتئینی (گلوکاتایون) توسط روش Sedlak و Lindsay اندازه‌گیری گردید (۲۶). به طور خلاصه پروتئین‌ها با افزودن ۲۱ میکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید (trichloroacetic acid; TCA) ۵۰ درصد به ۴۰۰ میکرولیتر هموزنات باقی و سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه جدا گردید. سپس ۵۰ میکرولیتر محلول شناور عاری از پروتئین و ۶۰۰ میکرولیتر دی‌تیونیتروبنزن (dithionitrobenzene; DTNB) ۶ میلی‌مول/لیتر (معرف Ellman) به ۸۵۰ میکرولیتر فسفات بافر ۰/۲ میلی‌مول/لیتر با pH برابر با ۸/۲ افزوده شد و بعد از یک ساعت شدت جذب در ۴۱۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج از روی منحنی استاندارد تهیه شده توسط محلول امیلی‌مول/لیتر گلوکاتایون احیاء قرائت گردید.

برای آسیب‌شناسی بافتی روده، حدود نیم سانتی‌متر از قسمت انتهایی پروگزیمال ژوژنوم جدا و در فرمالین بافر ۱۰ درصد پایدار گردید. از نمونه‌های پایدار شده در فرمالین، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون و با روش رنگ‌آمیزی معمول هماتوکسیلین-ئوزین تهیه شد. بررسی آسیب‌شناسی با میکروسکوپ نوری مدل Nikon (ECLIPSE E200) ساخت کشور ژاپن انجام شد. شدت آسیب روده توسط یک مقیاس نیمه‌کمی و دوسو بی‌خبر بر اساس روش ارائه شده توسط Gulgun و همکاران در سال ۲۰۱۰ ارزیابی شد. کوتاه شدن پرزهای روده در هر حیوان به صورت: صفر، طبیعی؛ ۱، کوتاه شدن ملایم؛ ۲، کوتاه شدن متوسط؛ ۳، کوتاه شدن شدید؛ و ۴،

میلی‌مولار، ۰/۰۳ میلی‌لیتر گلوکاتایون ردوکتاز (یک واحد) و آنزیم (نمونه) اضافه گردید. حجم کلی توسط آب به ۲ میلی‌لیتر رسید. واکنش با افزودن ۰/۲ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن آغاز گردید و تغییرات در چگالش نوری در ۳۴۰ نانومتر تعقیب شد. یک واحد، برابر با مقدار آنزیمی است که یک نانومول NADPH را در دقیقه اکسیده می‌کند.

(د) اندازه‌گیری فعالیت گلوکاتایون ردوکتاز در حضور آنزیم، هیدروژن از NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) به گلوکاتایون اکسید (GSSG) منتقل می‌شود و واکنش می‌تواند در ۳۴۰ نانومتر مورد سنجش قرار گیرد (۲۴). به مخلوط واکنش متشکل از ۰/۰۵ میلی‌لیتر فسفات بافر یک مولار با pH برابر ۷/۶، ۰/۱۵ میلی‌لیتر EDTA (Ethylene-diamine-tetra-acetic acid) ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۱ میلی‌لیتر NADPH یک میلی‌مولار و ۰/۱ میلی‌لیتر گلوکاتایون اکسید ۱۰ میلی‌مولار، آنزیم افزوده شد. حجم نهایی به یک میلی‌لیتر رسانده شد و کاهش در چگالی نوری در ۳۴۰ نانومتر به مدت ۲-۳ دقیقه اندازه‌گیری شد. یک واحد، برابر با مقدار آنزیمی است که یک میکرومول NADPH را در دقیقه اکسیده می‌کند.

(ه) اندازه‌گیری مقدار مالون‌دی‌آلدئید مقدار مالون‌دی‌آلدئید بر اساس روش ارائه شده توسط Ohkawa و همکاران اندازه‌گیری شد (۲۲). مخلوط واکنش متشکل از ۰/۸ میلی‌لیتر نمونه (۱ میلی‌گرم)، ۰/۲ میلی‌لیتر سدیم دودسیل سولفات (sodium dodecyl sulfate; SDS) ۸/۱ درصد، ۱/۵ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال با pH برابر با ۳/۵ و ۱/۵ میلی‌لیتر محلول آبی تیوباربیتوریک اسید (thiobarbituric acid; TBA) ۰/۸ درصد بود. حجم مخلوط واکنش توسط آب مقطر به ۴ میلی‌لیتر رسانده شد و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد گرم گردید. پس از خنک کردن با آب شیر، یک میلی‌لیتر آب مقطر و ۵ میلی‌لیتر مخلوط n-بوتانول و پیریدین (به نسبت ۱۵:۱) به آن اضافه گردید و محلول حاصل

مشاهده نشدن پرز درجه بندی 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 درجه بندی شد. میزان آماس به صورت: صفر، طبیعی؛ ۱، ارتشاح کانونی سلول‌های آماسی؛ ۲، ارتشاح جزئی 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، درجه بندی شد (۱۳).
تحلیل آماری: برای تحلیل داده‌ها از بسته نرم‌افزاری SPSS نسخه ۱۳ استفاده شد. داده‌های به دست آمده کمی، به صورت انحراف معیار \pm میانگین (mean \pm SD) ارائه و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها توسط آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) مورد بررسی قرار گرفت. برای مقایسه درجات آسیب بافت روده بین گروه‌های مورد مطالعه از آزمون ناپارامتری کروسکال والیس (Kruskal-Wallis H test) استفاده شد که در صورت معنی‌دار بودن آزمون فوق، با استفاده از آزمون ناپارامتری یو مان - ویتنی (Mann-Whitney U test) با اصلاح بونفرونی (Bonferroni Correction) مقایسات زوجی انجام شد. اختلافات در سطح $p < 0.05$ معنی‌دار تلقی شدند. از آزمون آماری کلموگروف - اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov)، نیز برای تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها استفاده شد.

نتایج

در موش‌های صحرائی گروه ۲، تیمار با کوئرستین تغییر معنی‌داری را در هیچ یک از فراسنجه‌های مورد آزمایش در مقایسه با گروه ۱ (شاهد) ایجاد نکرد. در موش‌های صحرائی گروه ۳، متوترکسات فعالیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم (TAA) و مقادیر گلوتاتیون احیاء (GSH) و آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون

پراکسیداز (GPx) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) بافت ژوژنوم را در مقایسه با گروه ۱ (شاهد)، به طور معنی‌داری ($p=0.000$) کاهش و میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA) آن را به طور معنی‌داری ($p=0.000$) افزایش داد. در گروه ۴ (متوترکسات + کوئرستین) تیمار با کوئرستین به طور معنی‌داری ($p=0.000$) مانع از افزایش مالون‌دی‌آلدئید و هم-چنین مانع از کاهش TAA و مقادیر GSH و آنزیم‌های SOD، CAT، GPx و GR در اثر متوترکسات شد به‌طوری‌که، تفاوت معنی‌داری بین این گروه و گروه شاهد مشاهده نگردید (جدول ۱).

در آسیب‌شناسی بافتی، ساختار بافتی ژوژنوم در موش‌های صحرائی گروه ۱ (شاهد) طبیعی و سالم بود (نگاره ۱). تغییر پاتولوژی خاصی نیز در ژوژنوم موش‌های صحرائی گروه ۲ (کوئرستین)، مشاهده نشد به‌طوری‌که، ساختار بافت ژوژنوم، شبیه گروه تیمار کاملاً طبیعی به نظر می‌رسید (نگاره ۲). در ژوژنوم موش‌های صحرائی گروه ۳ (تیمار با متوترکسات)، کاهش ارتفاع پرزها، ارتشاح فراوان سلول‌های آماسی و زخم در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌دار ($p=0.000$) مشاهده گردید (نگاره ۳). در گروه ۴ (متوترکسات + کوئرستین)، تیمار با کوئرستین، به‌طور معنی‌دار ($p=0.000$) مانع از بروز تغییرات پاتولوژیک در بافت ژوژنوم موش‌های صحرائی شد و تنها آسیب قابل مشاهده، کاهش بسیار خفیف ارتفاع پرزها، نکروز تعداد معدودی از سلول‌های پوششی در رأس پرزها و حضور کانونی و اندک سلول‌های آماسی در بافت مخاط روده تعدادی از موش‌ها بود (نگاره ۴) که از این لحاظ اختلاف معنی‌داری بین این گروه و گروه شاهد برآورد نگردید (به ترتیب: $p=0.758$ ، $p=0.791$ و $p=0.929$).
مقایسه آسیب‌شناسی بافتی ژوژنوم موش‌های صحرائی گروه‌های مورد مطالعه به‌طور کمی در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱: مقایسه فراسنجه‌های بیوشیمیایی (GR و GPx, CAT, SOD, MDA, GSH, TAA) بین گروه‌های مورد مطالعه

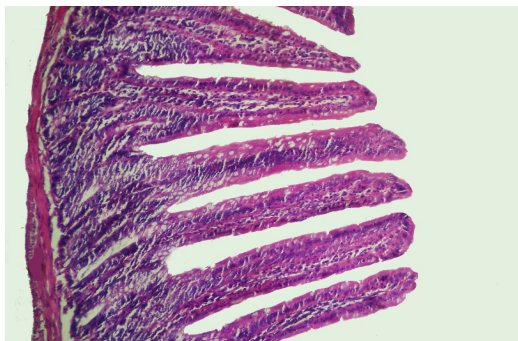
| گروه | تیماز | فراسنجه‌های بیوشیمیایی | | | | | |
|---|-------------------------|---|--|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|--|
| | | فعالیت تام آنتی‌اکسیدانی (micromol/l) | گلوکاتیون احیاء (micromol/g tissue) | مالون‌دی‌آلدئید (nmol/g tissue) | دیسموتاز (mU/mg protein) | کاتالاز (U/mg protein) | گلوکاتیون پراکسیداز (U/mg protein) |
| ۱ | شاهد | ۱/۶۲±۰/۳۳ ^a | ۱/۸۲±۰/۴۹ ^a | ۳۸/۱۸±۶/۱۵ ^a | ۸/۰۲±۲/۴۶ ^a | ۰/۱۲±۰/۰۳ ^{ab} | ۲/۱۵±۰/۴۷ ^a |
| ۲ | کوئرتستین | ۱/۶۴±۰/۳۸ ^a | ۱/۸۵±۰/۷۴ ^a | ۳۵/۲۴±۵/۱۷ ^a | ۸/۱۴±۲/۱۳ ^a | ۰/۱۳±۰/۰۳ ^{ab} | ۲/۰۹±۰/۶۱ ^a |
| ۳ | متوترکسات | ۱/۱۱±۰/۳۱ ^b | ۰/۸±۰/۱۱ ^b | ۷۷/۳۷±۱۳/۱۶ ^b | ۴/۲۵±۱/۷۸ ^b | ۰/۰۷±۰/۰۱ ^b | ۷/۶۵±۲/۲۴ ^b |
| ۴ | متوترکسات+ کوئرتستین | ۱/۶۱±۰/۵ ^a | ۱/۷۷±۰/۶۶ ^a | ۳۶/۲۹±۵/۱۴ ^a | ۷/۹۵±۲/۰۴ ^a | ۰/۱۱±۰/۰۳ ^a | ۲/۲۱±۰/۵۹ ^a |
| نتیجه آزمون پارامتری تحلیل واریانس یک‌طرفه | | p=۰/۰۰۰ | p=۰/۰۰۰ | p=۰/۰۰۰ | p=۰/۰۰۰ | p=۰/۰۰۰ | p=۰/۰۰۰ |

مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار برای ۹ سر موش صحرایی در هر گروه ارائه شده است. a, b: حروف غیرمشابه در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار است (p < ۰/۰۵).

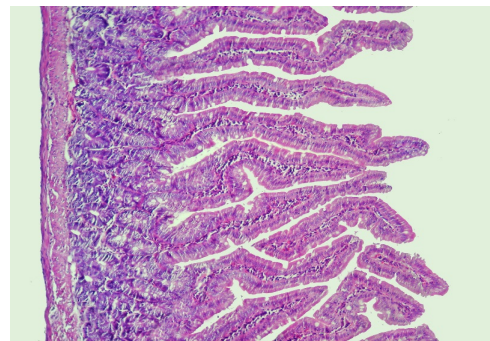
جدول ۲: مقایسه درجات شدت آسیب بافت روده بین گروه‌های مورد مطالعه

| گروه‌ها | تیماز | شدت آسیب در بافت روده | | |
|--------------------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | کاهش ارتفاع پرزها | التهاب | ایجاد زخم |
| ۱ | شاهد | ۰/۰۰±۰/۰ ^b | ۰/۰۰±۰/۰ ^b | ۰/۰۰±۰/۰ ^b |
| ۲ | کوئرتستین | ۰/۰۰±۰/۰ ^b | ۰/۰۰±۰/۰ ^b | ۰/۰۰±۰/۰ ^b |
| ۳ | متوترکسات | ۲/۵۸±۰/۴۶ ^a | ۳/۱۸±۰/۲۳ ^a | ۲/۴۰±۰/۷۲ ^a |
| ۴ | متوترکسات+ کوئرتستین | ۰/۳۲±۰/۰۵ ^b | ۰/۴۳±۰/۰۲ ^b | ۰/۲۲±۰/۰۵ ^b |
| نتیجه آزمون ناپارامتری کروسکال والیس | | p=۰/۰۰۰ | p=۰/۰۰۰ | p=۰/۰۰۰ |

مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار برای ۹ سر موش صحرایی در هر گروه ارائه شده است. a, b: حروف غیرمشابه در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار است (p < ۰/۰۵).



نگاره ۲: نمای ریزبینی از بافت ژوژنوم یک موش صحرایی از گروه تیمار شده با کوئرتستین: تغییر پاتولوژی خاصی در بافت ژوژنوم مشاهده نمی‌شود (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، بزرگنمایی ۴۰x).



نگاره ۱: نمای ریزبینی از بافت ژوژنوم یک موش صحرایی از گروه شاهد: بافت ژوژنوم سالم و بدون تغییر پاتولوژیک است (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، بزرگنمایی ۴۰x).

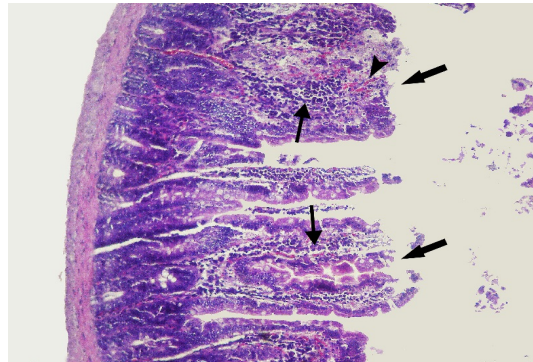
سیستم تدافعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی در این مطالعه، نشان دادند که استرس‌اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد، یکی از مکانیسم‌های احتمالی در پاتوفیزیولوژی سمیت روده‌ای متوترکسات می‌باشد.

مطالعات انجام شده توسط Ciralik و همکاران در سال ۲۰۰۶ و Sener و همکاران در سال ۲۰۰۶ نیز نقش استرس‌اکسیداتیو در آسیب ناشی از متوترکسات در روده را مورد تأیید قرار می‌دهد (۲۸ و ۸).

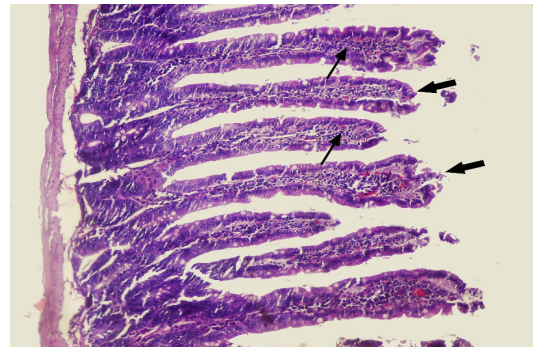
وجود التهاب در بافت مخاطی روده نیز حاکی از وقوع استرس‌اکسیداتیو در این بافت می‌باشد که با افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش محتوای GSH اثبات می‌گردد (۳۰).

افزایش تجمع نوتروفیل و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species; ROS) باعث اختلال در گردش خون مویرگی مخاط روده شده و نقشی اساسی را در ایجاد زخم در این بافت برعهده دارد (۵). ROS 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، ۱۸، ۱۶). میلوپراکسیداز آنزیمی ضروری برای تولید اکسیدان‌ها در نوتروفیل‌ها است.

افزایش فعالیت میلوپراکسیداز و ایجاد زخم‌های مخاطی، در موش‌های صحرائی تیمار شده با متوترکسات قبلاً گزارش شده است (۱۶). همچنین ROS باعث افزایش نفوذپذیری در سلول‌های آندوتلیال و اپی‌تلیال می‌شود. افزایش در نفوذپذیری روده باعث می‌شود که باکتری‌ها و آندوتوکسین‌ها از سد روده‌ای نفوذ کرده و سبب ایجاد آماس و تولید بیشتر ROS در آن گردند. ROS از طریق واکنش با اسیدهای چرب غیر اشباع غشاهای سلولی، نوکلئوتیدهای DNA و باندهای سولفیدریل پروتئین‌ها، باعث آسیب روده در اثر استرس‌اکسیداتیو ناشی از متوترکسات می‌شود (۱۸). بدین ترتیب، پراکسیداسیون لیپیدی، که در آسیب غشاهای سلولی میزان آن افزایش پیدا می‌کند، اتفاق می‌افتد (۱۱). افزایش میزان MDA در موش‌های تیمار



نگاره ۳: نمای ریزبینی از بافت ژوژنوم یک موش صحرائی از گروه تیمار با متوترکسات: نکروز و انفصال بافت پوششی همراه با تخریب رأس پرزها (پیکان‌های ضخیم)، ارتشاح فراوان سلول‌های آماسی (پیکان‌های باریک) و خونریزی (نوک پیکان) در مخاط ژوژنوم مشاهده می‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین، بزرگنمایی $\times 40$).



نگاره ۴: نمای ریزبینی از بافت ژوژنوم یک موش صحرائی از گروه تیمار با متوترکسات+کوئرستین: کاهش بسیار خفیف ارتفاع پرزها، نکروز تعدادی از سلول‌های پوششی در رأس پرزها و حضور اندک سلول‌های آماسی در بافت ژوژنوم قابل مشاهده است (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین، بزرگنمایی $\times 40$).

بحث

در مطالعه حاضر، آسیب شناسی بافتی ژوژنوم آتروفی پرزها، آماس و زخم‌های مخاطی روده را در اثر متوترکسات نشان داد که این یافته با نتایج مطالعه Rezaei Moghadam و همکاران در سال ۲۰۱۳ هم‌خوانی دارد (۲۵). افزایش پراکسیداسیون لیپیدی (که با افزایش مقدار MDA مشخص می‌شود) و کاهش ذخیره گلوکوتایون احیاء (GSH) و کاهش فعالیت

شده با متوترکسات اهمیت پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از ROS را در سمیت روده‌ای متوترکسات آشکار می‌سازد (۲۷).

مشخص شده است که تخلیه GSH در بافت‌ها استرس اکسیداتیو و در نتیجه آسیب بافتی را سبب می‌شود (۲۹). در مطالعه ما فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز که برای تولید مجدد GSH بسیار ضروری است، متعاقب تیمار با متوترکسات کاهش یافت و مقدار آن به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود. کاهش فعالیت این آنزیم ممکن است دلیلی برای کاهش پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن توسط GSH باشد که به آسیب اکسیداتیو بافت روده منجر می‌شود. تحت شرایط طبیعی، NADPH توسط گلوتاتیون ردوکتاز مصرف می‌شود تا وضعیت احیاء گلوتاتیون سلول را برقرار نماید. قبلاً نشان داده شده است که دهیدروژنازهای وابسته به NADP سیتوزولی و آنزیم مالیک توسط متوترکسات مهار می‌گردند و این نشان می‌دهد که دارو می‌تواند فراهمی NADPH را توسط مهار آنزیم‌های چرخه پنتوز کاهش دهد (۶ و ۴). کاهش فراهمی NADPH ممکن است مسئول کاهش فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز باشد و به همین علت است که در بررسی حاضر کاهش میزان GSH مشاهده شده است. بنابراین، کاهش معنی‌دار مقادیر GSH توسط متوترکسات، منجر به کاهش کارایی سیستم تدافعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و افزایش حساسیت سلول‌ها به گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (۴). اگرچه مطالعات متعددی کاهش مقادیر GSH را در روده کوچک متعاقب مصرف متوترکسات نشان داده‌اند (۲۸ و ۱۴، ۱۲)، ولی در یک مطالعه افزایش مقادیر GSH در شرایط مشابه گزارش شده است (۸).

در بررسی حاضر کاهش معنی‌دار فعالیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم و آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز مشاهده شد که این یافته با نتایج مطالعه Viswa و همکاران در سال ۲۰۰۷ (۳۰)، Gulgun و همکاران در سال ۲۰۱۰ (۱۳) و Rezaei Moghadam و همکاران در سال ۲۰۱۳ (۲۵) همخوانی دارد. در هر صورت،

در مطالعه Ciralik و همکاران در سال ۲۰۰۶ که مصرف متوترکسات، باعث افزایش مقادیر GSH شده بود، افزایش فعالیت این آنزیم‌ها نیز گزارش شده است، که ایشان این تغییرات را به پاسخ بافت به استرس اکسیداتیو ناشی از متوترکسات نسبت داده‌اند (۸).

کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز شاخصی حساس برای آسیب سلول‌ها است. این آنزیم یکی از مهم‌ترین عوامل در سیستم تدافعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی محسوب می‌شود. سوپراکسید دیسموتاز، آنیون سوپراکسید را از طریق تبدیل آن به پراکسید هیدروژن پاکسازی کرده و بدین ترتیب اثرات سمی آن را کاهش می‌دهد (۹). در بررسی حاضر، میزان سوپراکسید دیسموتاز در موش‌های صحرایی تیمار شده با متوترکسات به دلیل تشکیل فراوان آنیون‌های سوپراکسید، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت که در پی آن فعالیت آنزیم‌های زداینده پراکسید هیدروژن یعنی کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز نیز در این موش‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافته بود. به نظر می‌رسد که غیرفعال شدن سوپراکسید دیسموتاز توسط آنیون‌های افزایش یافته سوپراکسید، منجر به غیرفعال شدن آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز می‌شود. کاتالاز با تجزیه پراکسید هیدروژن بافت‌ها را در برابر رادیکال‌های بسیار فعال هیدروکسیل محافظت می‌کند. بنابراین، کاهش فعالیت کاتالاز ممکن است به برخی اثرات مخرب ناشی از رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن منجر گردد (۷). گلوتاتیون ردوکتاز یک آنزیم سیتوزولی است که در کاهش گلوتاتیون اکسید (GSSG)، به عنوان محصول نهایی فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز روی GSH، دخالت دارد (۲۰).

در این مطالعه که برای اولین بار برای ارزیابی اثرات محافظتی کوئرستین در برابر سمیت روده‌ای متوترکسات در موش صحرایی انجام شده است، تیمار با کوئرستین با دز ۱۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۱۵ روز، بطور معنی‌داری مانع از بروز اثرات سمی متوترکسات و آسیب‌های بافتی در ژوژنوم موش‌های صحرایی گردید. اثرات

که کوئرستین از طریق کاهش استرس‌های اکسیداتیو با کاهش میزان MDA و افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز نقش حفاظتی خود را در بیماری دیابت اعمال می‌دارد (۱۰). در مطالعه‌ای که توسط Yousef و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام شده، اثرات محافظتی کوئرستین در برابر استرس اکسیداتیو و آسیب بافتی ناشی از پاراستامول (Paracetamol) مورد بررسی قرار گرفته و نشان داده شده است که کوئرستین بافت‌های کبد، کلیه، ریه‌ها، مغز، قلب و بیضه موش‌های صحرایی را با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون-اس-ترانسفراز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز و محتوای گلوتاتیون بافتی در برابر سمیت پاراستامول محافظت می‌کند (۳۱). همچنین، نتایج به‌دست آمده از بررسی حاضر در مورد اثرات ضدالتهابی کوئرستین در بافت روده با نتایج مطالعه Kim و همکاران در سال ۲۰۰۵ و مطالعه Murphy و همکاران در سال ۲۰۱۱ همسو می‌باشد (۱۹ و ۱۵). با توجه به مجموعه فوق‌الذکر، کوئرستین با استفاده از خواص آنتی‌اکسیدانی خود، روده موش صحرایی را در برابر اثرات اکسیداتیو سمی متوترکسات محافظت می‌کند. بنابراین، پس از انجام کارآزمایی‌های شاهددار اتفاقی و حصول نتایج مثبت، کوئرستین می‌تواند در پیشگیری از آسیب‌های اکسیداتیو روده ناشی از متوترکسات در بیماران سرطانی توصیه و به عنوان یک منبع قابل دسترس با خاصیت آنتی‌اکسیدانی به‌طور هم‌زمان با داروی متوترکسات مورد استفاده قرار گیرد. این‌که آیا کوئرستین باعث کاهش اثرات درمانی متوترکسات می‌شود یا خیر، در این مطالعه نامشخص مانده و امکان مقایسه تاثیر این ماده با سایر ترکیبات در مواردی که دچار نئوپلازی هستند، فراهم نشده است. هم‌چنین چگونگی تاثیر دزهای مختلف کوئرستین، مکان و مکانیسم یا مکانیسم‌های مولکولی و سلولی مؤثر در عملکرد فارماکولوژیکی آن ناشناخته مانده و نیاز به مطالعات آتی و گسترده‌تری دارد.

مفید فوق را می‌توان به اثرات آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس‌های اکسیداتیو کوئرستین مربوط دانست. همچنین، در این مطالعه مصرف کوئرستین مانع از کاهش فعالیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم و آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز در اثر متوترکسات شد که این اتفاق ممکن است در اثر پاکسازی رادیکال‌ها توسط کوئرستین اتفاق افتاده باشد که باعث حفظ و بقاء 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. همان‌طوری که قبلاً نیز اشاره شد، متعاقب تیمار با متوترکسات کاهش قابل توجهی در میزان گلوتاتیون پراکسیداز حاصل گردید که منجر به دسترسی گلوتاتیون ردوکتاز به سوبسترا شده و بدین ترتیب فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز کاهش یافت. چنین به نظر می‌رسد که مصرف کوئرستین در کنار متوترکسات فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز را مجدداً برقرار نموده که مصرف گلوتاتیون اکسید را جهت تشکیل GSH و افزایش سم‌زدایی متابولیت‌های فعال توسط کوئرستین با GSH برقرار می‌کند.

نتایج بررسی حاضر، گزارش سایر محققین را در خصوص اثرات آنتی‌اکسیدانی و زدایش رادیکال‌های آزاد توسط کوئرستین را مورد تأیید قرار می‌دهد. تحقیقاتی که توسط Birsan و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام شده است، اثرات محافظت از کبدی کوئرستین را در برابر سمیت کبدی متوترکسات، نشان داده و مشخص کرده است که کوئرستین با کاهش استرس‌های اکسیداتیو از طریق کاهش پراکسیداسیون لیپیدی میکروزمی، افزایش محتوای گلوتاتیون سلولی و حفظ سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در مقادیر طبیعی نقش حفاظتی خود را در برابر متوترکسات اعمال می‌دارد (۵). تحقیقاتی که توسط Edremitlioglu و همکاران در سال ۲۰۱۲ در مورد اثرات کوئرستین در برابر آسیب بافت‌های کبد، کلیه، مغز، قلب و آئورت در بیماری دیابت انجام شده، نشان داده است

تشکر و سپاسگزاری

این مقاله از طرح تحقیقاتی که با بودجه پژوهشی و حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز به انجام رسیده است، استخراج شده است. بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز تشکر و قدردانی می‌گردد.

فهرست منابع

- 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. *Gastroentology*. 62(1):84-92.
- 10- Edremitlioglu, M., Andi, M.F., Korkut, O. (2012): Quercetin, a powerful antioxidant bioflavonoid, prevents oxidative damage in different tissues of long-term diabetic rats. *Balkan Med. J.* 29(1):49.
- 11- Fine, A.M. (2000): Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. *Altern. Med. Rev.* 5:144-151.
- 12- Gao, F., Horie, T. (2002): A synthetic analog of prostaglandin E(1) prevents the production of reactive oxygen species in the intestinal mucosa of methotrexate-treated rats. *Life Sci.* 71(9):1019-1091.
- 13- Gulgun, M., Erdem, O., Ozta, E., Kesik, V., Balamtekin, N., Vurucu, S., Kul, M., Kismet, E., Koseoglu, V. (2010): Proanthocyanidin prevents methotrexate-induced intestinal damage and oxidative stress. *Exp. Toxicol. Pathol.* 62(2):109-115.
- 14- Jahovic, N., Sener, G., Cevik, H., Ersoy, Y., Arbak, S. (2004): Amelioration of methotrexate induced enteritis by melatonin in rats. *Cell Biochem. Funct.* 22(3):169-178.
- 15- Kim, H., Kong, H., Choi, B., Yang, Y., Kim, Y., Lim, M.J., Neckers, L., Jung, Y. (2005): Metabolic and pharmacological properties of rutin, a dietary quercetin glycoside, for treatment of inflammatory bowel disease. *Pharm. Res.* 22(9):1499-1509.
- 16- Kremer, J.M. (2004): Toward a better understanding of methotrexate. *Arthritis Rheum.* 50:1370-1382.
- 17- 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.
- 18- Miyazono, Y., Gao, F., Horie, T. (2004): Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. *Scand. J. Gastroenterol.* 39(11):1119-1127.
- 1- روغنی، م.، بلوچ‌نژاد مجرد، ت. (۱۳۸۴): اثرات عروقی وابسته و غیروابسته به اندوتلیوم فلاونوئید کوئرستین در آنورت سینه- ای موش صحرائی دیابتی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان، ۶(۳): ۲۲۳-۲۲۸.
- ۲- کامکار، ج.، رضایی، م.ب.، عصاره، م.ح.، سیدرضا طبایی عقدایی، س.ر.، مشکئی، س. (۱۳۸۹): ارزیابی میزان ترکیب‌های فلاونوئیدی گونه های گل محمدی *Rosa damascena* Mill. فصلنامه گیاهان دارویی، ۹(۳۶): ۱۶۱-۱۶۸.
- 3- Aebi, I.H. (1984): Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105:121-126.
- 4- Babiak, R.M., Campello, A.P., Carnieri, E.G., Oliveira, M.B. (1998): Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. *Cell Biochem. Funct.* 16(4):283-293.
- 5- Birsen, A. (2011): Quercetin prevents methotrexate-induced hepatotoxicity without interfering methotrexate metabolizing enzymes in liver of mice. *J. Appl. Biol. Sci.* 5(2):75.
- 6- Caetano, N.N., Campello, A.P., Carnieri, E.G.S., Kluppel, M.L.W., Oliveira, M.B.M. (1997): Effects of methotrexate (MTX) on NAD (P) + dehydrogenases of HeLa cells, malic enzymes, 2-oxoglutarate and isocitrate dehydrogenases. *Cell Biochem. Funct.* 15(4):259-264.
- 7- Chance, B., Greenstein, D.S., Roughton, R.J.W. (1952): The mechanism of catalase action. 1. Steady-state analysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 37(2):301-321.
- 8- Ciralik, H., Bulbuloglu, E., Cetinkaya, A., Kurutas, E.B., Celik, M., Polat, A. (2006): Effects of N acetylcysteine on methotrexate induced small intestinal damage in rats. *Mt. Sinai. J. Med.* 73:1086-1092.

- 19- Murphy, E.A., Davis, J.M., McClellan, J.L., Steiner, J.L., Waghmare, S., Jung, S.H., Carmichael, M.D. (2011): Effects of curcumin and quercetin on intestinal inflammation in the Apc/Min⁺ mouse. *Med. Sci. Sports Exerc.* 43(5):48-49.
- 20- Naik, S.R., Panda, V.S. (2008): Hepatoprotective effect of Ginkgoselect phytosome® in rifampicin induced liver injury in rats: Evidence of antioxidant activity. *Fitoterapia.* 79(6):439-445.
- 21- Nakamura, W., Hosada, S. (1974): Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 358:251-261.
- 22- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979): Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*; 95:351-358.
- 23- Ohkuma, N., Matsuo, S., Tutsui, M., Ohkawara, A. (1982): Superoxide dismutase in the epidermis. *Nippon Hifuka Gakkai Zasshi.* 92:583-590.
- 24- Racker, E. (1955): Glutathione reductase from bakers' yeast and beef liver. *J. Biol. Chem.* 217:855-865.
- 25- Rezaei Moghadam, A., Mohajeri, D., Namvaran-Abbas-Abad, A., Manafi, H., Shahi, D., Mazani, M. (2013): Protective effect of turmeric extract on Methotrexate-induced intestinal damage and oxidative stress. *Chin. J. Nat. Med.* 11(5):0477-0483.
- 26- Sedlak, J., Lindsay, R.H. (1968): Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25:192-205.
- 27- Sener, G., Eksioglu-Demiralp, E., Cetiner, M., Ercan, F., Sirvanci, S., Gedik, N., Yeğen, B.C. (2006): L-Carnitine ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury and inhibits leukocyte death. *Cell Biol. Toxicol.* 22(1):47-60.
- 28- Sener, G., Eksioglu-Demiralp, E., Cetiner, M., Ercan, F., Yeğen, B.C. (2006): β glucan ameliorates methotrexate induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *Eur. J. Pharmacol.* 542:170-178.
- 29- Sies, H. (1999): Glutathione and its cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* 27(9-10):916-921.
- 30- 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. *Cancer Therapy.* 5:501-510.
- 31- Yousef, M.I., Omar, S.A., El-Guendi, M., Abdelmegid, L.A. (2010): Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat. *Food. Chem. Toxicol.* 48(11):3246-3261.
- 32- Yuncu, M., Eralp, A., Celik, A. (2006): Effect of aged garlic extract against methotrexate-induced damage to the small intestine in rats. *Phytother. Res.* 20(6):504-510.

