مطالعه اثرات پیشگیرانه نارینژنین از آسیب ایسکمی-خون‌رسانی مجدد روده کوچک در موش صحرایی

غفور موسوی

استادیار گروه علوم درمانگاهی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: gh_mousavi@iaut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۳/۱۲/۵ پذیرش نهایی: ۹۴/۲/۳۰)

چکیده

مخاط روده به شدت توسط ایسکمی-خون‌رسانی مجدد (IR) تحت تاثیر قرار می‌گیرد. نشان داده شده است که نارینژنین در برابر آسیب ایسکمی-خون‌رسانی مجدد در ارگان‌های مختلف دارای اثرات محافظتی می‌باشد. هدف از این مطالعه این است که آیا نارینژنین در آسیب ایسکمی-خون‌رسانی مجدد روده موش صحرایی نقش محافظتی دارد. بدین منظور، ٤٠ سر موش صحرایی نر ویستار به‌طور تصادفی به چهار گروه شاهد (گروه ۱)، شاهد جراحی (گروه ۲)، ایسکمی-خون‌رسانی مجدد (گروه ۳) و ایسکمی-خون‌رسانی مجدد به‌علاوه تیمار با نارینژنین (گروه ٤) تقسیم شدند. آسیب ایسکمی-خون‌رسانی مجدد با ۳۰ دقیقه ایسکمی روده و ٦٠ دقیقه خون‌رسانی مجدد ایجاد شد. موش‌های گروه ٤ نارینژنین (۲۰ mg/kg) را ۱۲۰ دقیقه قبل از القاء ایسکمی از طریق تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. پس از انجام آزمایشات، ژوژنوم خارج و جهت آسیب‌شناسی بافتی آماده گردید. فعالیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم و مقادیر مالون‌دی‌آلدئید، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در بافت ژوژنوم اندازه‌گیری شد. آسیب‌شناسی بافتی، ارتشاح شدید سلول‌های آماسی، کوتاه و کُندشدگی پرزها، خونریزی لامینا پروپریا و نکروز سلول‌های بافت پوششی ژوژنوم را در گروه ایسکمی-خون‌رسانی مجدد نشان داد. مصرف نارینژنین آسیب ژوژنوم را موش‌های گروه ٤ کاهش داد. فعالیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم و مقادیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در گروه ایسکمی-خون‌رسانی مجدد کاهش یافت ولی به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در گروه ایسکمی-خون‌رسانی مجدد به‌علاوه تیمار با نارینژنین افزایش یافت. نارینژنین مقدار مالون‌دی‌آلدئید را که در اثر ایسکمی-خون‌رسانی مجدد افزایش یافته بود به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) کاهش داد. نتایج ما نشان داد نارینژنین روده باریک موش‌های صحرایی را از آسیب ایسکمی-خون‌رسانی مجدد محافظت کرد.

کلید واژه‌ها: **روده، ایسکمی-خون‌رسانی مجدد، نارینژنین، موش صحرایی.**

مقدمه

آسیب ایسکمی-بازخون‌رسانی روده در بیماران تحت اعمال جراحی و آسیب تروماتیک با مرگ‌ومیر بالایی همراه است (Koike *et al*., 1993). این آسیب در شرایطی نظیر جراحی آنوریسم آئورت، بای‌پس قلبی-ریوی، فتق‌های اختناقی، آنتروکولیت نکروزان نوزادان و پیوند روده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Collard and Gelman, 2001). آسیب ایسکمی-بازخون‌رسانی روده در شوک‌های‌سپتیک و هیپوولومیک نیز اتفاق می‌افتد (Moore *et al*., 1994; Swank and Deitch, 1996).

مخاط روده به افت فشار خون احشایی، که وقوع آن پس از اعمال بزرگ جراحی عروق، بای پس قلبی ریوی، تروما، سوختگی، شوک هموراژیک، پانکراتیت حاد، بیماری‌های ایسکمیک روده، انسداد عروق مزانتر و پیوند عضو، به‌ویژه پیوند روده کوچک اجتناب‌ناپذیر است، بسیار حساس می‌باشد (Collard and Gelman, 2001; Asfar *et al*., 1994; Cicales *et al*., 2001).

برقراری مجدد جریان خون (بازخونرسانی) پس از یک دوره خون‌رسانی ناقص و یا ایسکمی، طیفی از تغییرات را در میکروسیرکولاسیون روده آغاز می‌کند که در نهایت باعث ایجاد آسیب در یکپارچگی پوشش مخاطی روده می‌شود که تحت عنوان آسیب ایسکمی/ خون‌رسانی مجدد (Ischemia–Reperfusion (I/R) injury) روده شناخته می‌شود. اختلال در عملکرد مخاط روده به دلیل آسیب ایسکمی/ خون‌رسانی مجدد 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 (Ozkan *et al*., 2009). مکانیسم‌های درگیر در آسیب ایسکمی/ خون‌رسانی مجدد چند عاملی بوده و به طور گسترده مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته‌اند (Mallick *et al*., 2004). یکی از این مکانیسم‌ها تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن مانند آنیون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و سایتوکاین‌های التهابی است که از مکانیسم‌های دفاعی طبیعی در مخاط پیشی گرفته و به آسیب سلولی منجر می‌گردند (Yamamoto *et al*., 2001).

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، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز به عنوان اولین خط دفاعی شناخته شده و ماکرومولکول‌های بیولوژیک مانند DNA، پروتئین‌ها و چربی‌ها را در برابر آسیب رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کنند. سوپراکسید دیسموتاز به سرعت، یون سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن کم خطر تبدیل می‌کند که بعداً توسط کاتالاز و گلوتاتیون 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 (Mallick *et al*., 2004).

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 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 نارینژنین در محافظت از بافت روده در شرایط ایسکمی- خون‌رسانی مجدد مورد ارزیابی قرار می‌گیرد که در صورت تائید می‌تواند به عنوان یک منبع قابل دسترس با خاصیت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گیرد.

فلاوونوئیدها ترکیبات پلی‌فنلی با خصوصیات فارماکولوژیک متعدد هستند و به عنوان زداینده رادیکال‌های آزاد با گروه هیدروکسیل در ساختار مولکولیشان عمل می‌کنند (Arul and Subramanian, 2013). بر اساس تفاوت در ساختار مولکولی این ترکیبات، شش گروه عمده از فلاوونوئیدها وجود دارد که شامل: فلاوونول‌ها (flavonols)، فلاوون‌ها (flavones)، فلاوانون‌ها (flavanones)، کاتچین‌ها (catechins)، آنتوسیانیدین‌ها (anthocyanidins) و ایزوفلاوون‌ها (isoflavones) هستند (Kinoshita *et al*., 2006). نارینژنین (Naringenin)، ۷،۵،٤-تری-هیدروکسی-تری‌هیدروکسی فلاوانون (4,5,7-trihydroxyflavanone) فلاوانونی هست که به وفور در میوه خانواده مرکبات مثل پرتغال و نارنگی، گریپ فروت و همچنین گوجه فرنگی و گیلاس و کاکائو وجود دارد (Jain *et al*., 2011; Kawaii *et al*., 1999). به‌طور طبیعی، این فلاوانون به شکل گلیکوزید (glycoside) درآمده و جذب روده‌ای را افزایش می‌دهد (Haidari *et al*., 2009).

مطالعات نشان داده‌است که نارینژنین دارای اثرات ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و حفاظت از سیستم عصبی می‌باشد (Choi and Ahn, 2008; Nalini *et al*., 2012; Lee and Kim, 2010; Miyake *et al*., 2003). نارینژنین ترکیبی با سه گروه هیدروکسیل بوده و بنابراین نسبت به سایر فلاوانون‌ها توانایی و قدرت آنتی اکسیدانی بسیار بالایی داشته و قادر است آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها را تحریک کند (Chiou and Xu, 2004; Pollard *et al*., 2006). مطالعات فارماکولوژیک اثرات آنتی‌دیابتیک (Ortiz-Andrade *et al*., 2008)، آنتی‌آتروژنیک (Lisa *et al*., 1999)، ضدافسردگی (Zbarsky *et al*., 2005)، تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی (Lisa *et al*., 1999)، ضدسرطانی (Jong-Hwa *et al*., 2010)، محافظت‌کنندگی از DNA (Oršolić *et al*., 2011) و هیپولیپیدمیک (Mulvihill *et al*., 2009) نارینژنین را نشان داده‌اند. نشان داده شده است که نارینژنین دارای اثرات بالقوه آنتی‌اکسیدانی (Rahigude *et al*., 2012) و ضدالتهابی (Hirai *et al*., 2007) برجسته‌ای می‌باشد. بنابراین، به نظر می‌رسد که مصرف نارینژنین قبل از ایسکمی ممکن است بافت روده را در برابر آسیب ناشی از ایسکمی-خون‌رسانی مجدد محافظت کند و مطالعه حاضر برای آزمون این فرضیه انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی آزمایشگاهی بوده و در سال ۱۳۹۳ در مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تبریز انجام شد. در این مطالعه کلیه ملاحظات اخلاقی و پروتکل‌های کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی مورد تائید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی، مد

نظر قرار گرفت. برای انجام این مطالعه، از ٤٠ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰±۲۰۰ گرم استفاده شد. شرایط تغذیه و نگه‌داری برای تمام گروه‌ها یکسان و به صورت ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی و دمای ۲ ± ۲۱ درجه سلسیوس 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 ٤ گروه مساوی شامل گروه شاهد، گروه شاهد جراحی، گروه ایسکمی- خون‌رسانی مجدد و گروه ایسکمی- خون-رسانی مجدد و تیمار با نارینژنین تقسیم شدند. در مورد موش‌های گروه شاهد هیچگونه مداخله جراحی و دستکاری روده‌ها انجام نشد. در گروه شاهد جراحی، موش‌ها مشابه با گروه ایسکمی- خون‌رسانی مجدد تحت عمل جراحی قرار گرفته ولی متحمل ایسکمی- خون‌رسانی مجدد روده نشدند. این موش‌ها به مدت برابر با گروه ایسکمی- خون‌رسانی مجدد (۳۰ دقیقه ایسکمی و ٦٠ دقیقه خونرسانی مجدد) تحت بیهوشی قرار گرفته و قبل از القا ایسکمی حلال دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) را از طریق تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. موش‌های گروه ایسکمی- خون‌رسانی مجدد تحت عمل جراحی قرار گرفته و به مدت ۳۰ دقیقه تحت ایسکمی، سپس ٦٠ دقیقه دیگر تحت خون‌رسانی مجدد روده قرار گرفتند. موش‌های گروه ایسکمی- خون‌رسانی مجدد به‌علاوه تیمار با نارینژنین، نارینژنین (Sigma-Aldrich Chemical Co., United Kingdom) را به طور تازه با حل کردن پودر در حلال دی‌متیل‌سولفوکسید، به میزان ۲۰mg/kg از راه تزریق داخل صفاقی، ۱۲۰ دقیقه قبل از القا ایسکمی دریافت کردند. میزان و روش مصرف نارینژنین بر اساس مطالعات کارا و همکاران در سال ۲۰۱٤ انتخاب شده است (Kara *et al*., 2014).

برای انجام جراحی موش‌ها با تزریق داخل صفاقی کتامین هیدروکلراید (۱۰۰ mg/kg) و زایلازین (mg/kg ۲۰) بیهوش شدند. بعد از تراش موها و ضدعفونی پوست ناحیه شکم، 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 ۳۷ درجه سانتی‌گراد تثبیت شد. برای ایجاد ایسکمی در روده‌ها، آئورت شکمی در قسمت بالاتر از شریان سلیاک به مدت ۳۰ دقیقه به‌وسیله گیره غیرتروماتیک عروقی مسدود شد. پس از برداشتن گیره‌ها و رفع انسداد، خون‌رسانی مجدد به مدت ٦٠ دقیقه انجام شد. نمونه‌برداری از خون و روده در تمامی گروه‌ها ٤٥ 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 ٤۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. فعالیت تام آنتی‌اکسیدانی پلاسما توسط تکنیک رنگ‌سنجی (colorimetric technique) طبق روش میلر و همکاران در سال ۱۹۹۳ (Miller *et al*., 1993) با استفاده از کیت تجارتی (Randox

Laboratories Ltd, UK) اندازه‌گیری شد. در این روش ABTS (2,2′-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) با یک پراکسید (met-myoglobin) و H2O2 جهت تولید یک کاتیون رادیکال انکوبه می‌شود (جذب در ۷۳٤ nm). این جذب با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ماده تست نسبت معکوس دارد. در نهایت، نتایج به صورت میکرومول در لیتر (µmol/l) ارائه شد.

برای تعیین وضعیت آنتی‌اکسیدانی روده، همه موش‌ها هم‌زمان به آسانی با تزریق دز بالای پنتوباربیتال سدیم (sodium pentobarbital) کشته شدند. حدود ۵ سانتی‌متر از قسمت انتهایی ژژنوم سریعاً خارج و در سالین 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 ٤ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شده و محلول رویی جهت سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی از طریق اندازه‌گیری مقدار مالون‌دی‌آلدئید (MDA; malondialdehyde) و همچنین برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (superoxide dismutase; SOD)، کاتالاز (catalase; CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX; glutathione peroxidase) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR glutathione reductase) مورد استفاده قرار گرفت.

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

پراکسیداسیون چربی در بافت روده با روش رنگ‌سنجی (colorimetrically) به وسیله اندازه‌گیری TBARS (thiobarbituric acid reacting substances) طبق روش فراگا و همکاران در سال ۱۹۸۸ انجام شد (Fraga *et al*., 1988). به‌طور خلاصه: ۰/۱ میلی لیتر هموژنات بافتی با ۲ میلی‌لیتر معرف Thiobarbituric acid;TBA-trichloroacetic acid;TCA-Hcl (۳۷٪ TBA، ۰/۲۵ مول HCL و ۱۵٪ TCA، به نسبت ۱:۱:۱) مخلوط و پس از ۱۵ دقیقه قرارگیری در بن‌ماری‌جوشان، خنک گردید و در g ۳۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. شدت جذب محلول رویی شفاف در nm ۵۳۵ در مقابل بلانک اندازه‌گیری گردید. مقادیر به صورت نانومول بر ۱۰۰ گرم بافت بیان شدند.

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز توسط روش نیشیکیمی و همکاران در سال ۱۹۷۲ تعیین گردید (Nishikimi *et al*., 1972). در حدود ۵ میکروگرم از پروتئین‌های تام هر یک از هموژنات‌های روده با بافر پیروفسفات سدیم، فنازین متوسولفات (phenazine methosulfate; PMT) و نیترو-بلو تترازولیوم (Nitro-blue Tertazolium; NBT) مخلوط گردید. واکنش با افزودن نیکوتین‌آمید-آدنین دی‌نوکلئوتید (Nicotinamide-adenine dinucleotide; NADH) آغاز شد. مخلوط واکنش در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه انکوبه و با افزودن ۱ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال متوقف گردید. شدت جذب مخلوط رنگ‌زای تشکیل شده در ٥٦٠nm اندازه‌گیری 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 کلایبورنه در سال ۱۹۸۵ و بر اساس تجزیه پراکسید هیدروژن در ۲٤۰nm، مورد سنجش قرار گرفت (Claiborne, 1985). به طور خلاصه، مخلوط مورد سنجش متشکل از ۱/۹۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۰۵ M, pH= ۷)، ۱ میلی‌لیتر پرکسید هیدروژن (۰/۰۱۹ M) و ۰/۰۵ میلی‌لیتر PMS (۱۰٪) در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر بود. تغییرات در جذب، در ۲٤۰nm اندازه‌گیری شد. در نهایت نتیجه به شکل "فعالیت کاتالاز در دقیقه" محاسبه گردید.

فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز با استفاده از روش روتروک و همکاران (Rotruck *et al.*, 1973) و بر اساس واکنش ذیل مورد سنجش قرار گرفت.

$H2O2 + 2GSH \rightarrow 2H2O + GSSG$

گلوتاتیون پراکسیداز، در هموژنات بافتی، گلوتاتیون را اکسیده کرده که به طور هم زمان پراکسید هیدروژن به آب احیاء می‌گردد. این واکنش پس از ۱۰ دقیقه توسط تری‌کلرواستیک اسید متوقف و گلوتاتیون باقی‌مانده توسط محلول دی‌تیوبیس نیتروبنزوئیک اسید (Dithiobis nitrobenzoic acid; DTNB) مجدداً فعال گردیده و منجر به تشکیل ترکیب رنگی می‌گردد که با اسپکتروفتومتر در ٤۲۰nm اندازه‌گیری می‌شود. مخلوط واکنشگر متشکل از ۰/۲ میلی‌لیتر اتیلن دی‌آمین تترا-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 هموژنات بود که در ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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 ۰/۰٤ درصد به محلول شناور افزوده شد و بلافاصله رنگ حاصله در ٤۲۰nm اندازه‌گیری شد. فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز به صورت میلی‌گرم پروتئین/دقیقه/میکرومول گلوتاتیون اکسید بیان گردید.

فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز با استفاده از روش مهنداس و همکاران در سال ۱۹۸٤ (Mohandas *et al.*, 1984) بر اساس واکنش ذیل مورد سنجش قرار گرفت.

$NADPH + H^+ + GSSG \rightarrow NADP^+ + 2GSH$

در حضور گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون اکسیده، احیاء گردیده و هم‌زمان، 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 ۳٤۰nm، تعیین گردید.

برای آسیب‌شناسی بافتی، حدود ۵ سانتی‌متر از ژژنوم پروگزیمال برداشته شد. لومن روده بلافاصله با استفاده از فسفات بافر سالین پاک شده و برای پایدارسازی بافت روده، فرمالین ۱۰٪ با استفاده از یک سرنگ ۲۰ میلی لیتری از یک انتهای روده به داخل آن تزریق شد. برای پایدارسازی بیشتر، نمونه‌ها به داخل محلول فرمالین ۱۰٪ منتقل شدند. از نمونه‌های پایدارشده در فرمالین، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون و با روش رنگ‌آمیزی معمول هماتوکسیلین-ائوزین تهیه شد (Lee and Luna, 1988). شدت آسیب روده با یک مقیاس نیمه‌کمی و دوسو بی‌خبر بر اساس روش ارائه شده توسط گلگون 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 ٤، 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 ٤، تخریب لایه عضلانی درجه‌بندی 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 ٤، آماس شدید روده که به لایه عضلانی نیز گسترش یافته است، درجه‌بندی شد (Gulgun *et al.*, 2010). آسیب‌شناسی بافتی با میکروسکوپ نوری مدل نیکون (ECLIPSE E200، ساخت کشور ژاپن) و عدسی چشمی ۱۰× انجام شد.

تحلیل آماری داده‌ها: داده‌های به‌دست آمده کمی، به صورت mean±S.E.M ارائه و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها توسط آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ با نرم‌افزار آماری SPSS مورد واکاوی آماری قرار گرفت.

یافته‌ها

در موش‌های صحرایی گروه شاهد جراحی، هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در پارامترهای مورد آزمایش در مقایسه با گروه شاهد ایجاد نشد. در موش‌های صحرایی گروه ایسکمی- خون‌رسانی مجدد، فعالیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم و آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز بافت ژوژنوم در مقایسه با گروه شاهد، به‌طور معنی‌داری ($p=۰/۰۰۰$) کاهش و میزان مالون‌دی‌آلدئید به طور معنی‌داری ($p=۰/۰۰۰$) افزایش یافت. در گروه ایسکمی- خون-رسانی مجدد و تیمار با نارینژنین، نارینژنین به طور معنی‌داری ($p=۰/۰۰۰$) مانع از افزایش مالون‌دی‌آلدئید و هم‌چنین مانع از کاهش فعالیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم و آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در اثر ایسکمی و خون-رسانی مجدد شد، طوری که تفاوت معنی‌داری بین این گروه و گروه شاهد مشاهده نشد (جدول ۱).

مقایسه آسیب‌شناسی بافتی ژوژنوم موش‌های صحرایی گروه‌های مورد مطالعه به‌طور کمّی در جدول ۲ آورده شده است. در مطالعات ریزبینی، ساختار بافتی ژوژنوم در موش‌های صحرایی گروه شاهد کاملاً طبیعی و سالم بود (شکل ۱). آسیب بافتی قابل ملاحظه‌ای نیز در مخاط ژوژنوم موش‌های صحرایی گروه شاهد جراحی، مشاهده نشد و بافت ژوژنوم این گروه، سالم و طبیعی به نظر می‌رسید (شکل ۲). در بافت ژوژنوم موش‌های صحرایی گروه ایسکمی- خون‌رسانی مجدد ، تغییرات بافتی شامل ارتشاح فراوان سلول‌های آماسی، کاهش ارتفاع پرزها و زخم شدن مخاط روده به‌طور معنی‌داری ($p=۰/۰۰۰$) در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد (شکل ۳). در گروه ایسکمی- خون‌رسانی مجدد و تیمار با نارینژنین، نارینژنین به‌طور معنی‌داری ($p=۰/۰۰۰$) مانع از بروز آسیب‌های بافتی شدید ژوژنوم موش‌ها شد و آسیب‌ها فقط شامل کاهش بسیار جزئی ارتفاع پرزها، نکروز تعداد کمی از سلول‌های اپیتلیالی رأس پرزها و ارتشاح کانونی و بسیار اندک سلول‌های التهابی در مخاط روده تعدادی از موش‌ها بود (شکل ٤)، به‌طوری که اختلاف معنی‌داری بین این گروه و گروه شاهد مشاهده نشد.

جدول ۱- مقایسه پارامترهای بیوشیمیایی مورد آزمایش بین گروه‌های تحت مطالعه

گروها	پارامترهای بیوشیمیایی					
	فعالیت تام آنتی‌اکسیدانی (micmol/l)	مالون‌دی‌آلدئید (nmol/g tissue)	سوپراکسید دیسموتاز (mU/mg protein)	کاتالاز (U/mg protein)	گلوتاتیون پراکسیداز U/mg) (protein	گلوتاتیون ردوکتاز (U/mg (protein
شاهد	۱/۵۹±۰/۴۸[a]	۴۱/۲۷±۵/۸۵[a]	۷/۱۴±۲/۴۳[a]	۰/۱۴±۰/۰۳[a]	۳/۵۷±۰/۵۱[a]	۵/۷۲±۲/۷۵[a]
شاهد جراهی	۱/۶۲±۰/۳۹[a]	۳۹/۳۲±۴/۶۷[a]	۷/۲۷±۲/۱۵[a]	۰/۱۵±۰/۰۴[a]	۳/۴۹±۰/۶۵[a]	۵/۴۳±۲/۴۱[a]
ایسکمی-خونرسانی مجدد	۱/۰۷±۰/۲۹[b]	۸۰/۴۸±۹/۷۴[b]	۳/۳۹±۱/۶۸[b]	۰/۰۹±۰/۰۱[b]	۷/۹۸±۲/۴۲[b]	۸/۱۱±۳/۱۶[b]
ایسکمی-خونرسانی مجدد و تیمار با نارینژنین	۱/۵۷±۰/۴۵[a]	۳۸/۲۶±۵/۱۲[a]	۶/۹۸±۲/۲۵[a]	۰/۱۳±۰/۰۲[a]	۳/۵۰±۰/۶۶[a]	۵/۲۴±۲/۷۰[a]

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

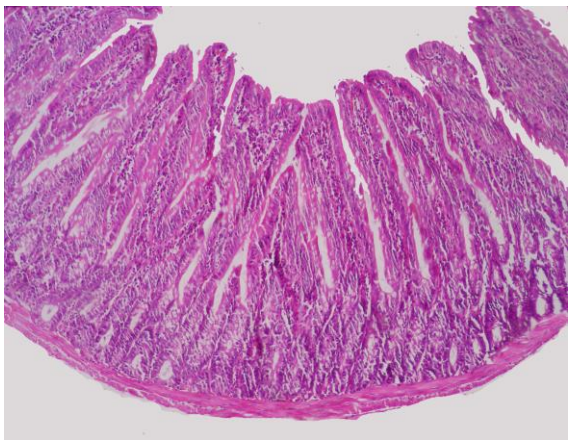
a,b: حروف غیرمشابه در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار است ($p<0/05$).

جدول ۲- مقایسه شدت آسیب بافت ژوژنوم بین گروه‌های مورد مطالعه

گروها	شدت آسیب در بافت ژوژنوم		
	کاهش ارتفاع پرزها	آماس	زخم
شاهد	۰/۰۰±۰/۰[b]	۰/۰۰±۰/۰[b]	۰/۰۰±۰/۰[b]
شاهد جراهی	۰/۰۰±۰/۰[b]	۰/۰۰±۰/۰[b]	۰/۰۰±۰/۰[b]
ایسکمی-خونرسانی مجدد	۳/۵۲±۰/۳۱[a]	۲/۶۶±۰/۳۷[a]	۲/۵۶±۰/۴۸[a]
ایسکمی-خونرسانی مجدد و تیمار با نارینژنین	۰/۴۸±۰/۰۵[b]	۰/۳۵±۰/۰۴[b]	۰/۲۹±۰/۰۷[b]

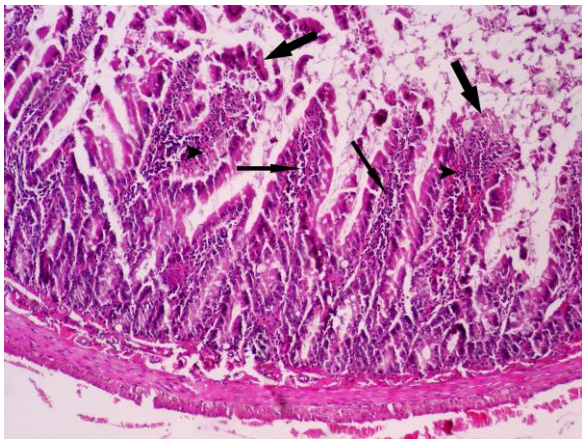
مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار برای ۱۰ سر موش صحرایی در هر گروه ارائه شده است.

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

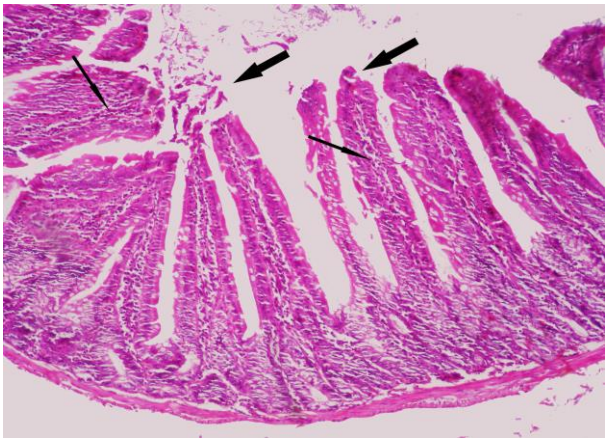


شکل ۱- نمای میکروسکوپی از بافت ژوژنوم یک موش صحرایی از گروه شاهد: بافت ژوژنوم کاملاً سالم و طبیعی است (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ۴۰×).

شکل ۲- نمای میکروسکوپی از بافت ژوژنوم یک موش صحرایی از گروه شاهد جراحی: آسیب بافتی قابل ملاحظه‌ای در بافت ژوژنوم مشاهده نمی‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ۴۰×).



شکل ۳- نمای میکروسکوپی از بافت ژوژنوم یک موش صحرایی از گروه ایسکمی-خون‌رسانی مجدد: نکروز و جدا شدن بافت پوششی مخاط روده و تخریب رأس پرزها (پیکان‌های ضخیم)، همراه با حضور فراوان سلول‌های آماسی (پیکان‌های باریک) و خون‌ریزی (نوک پیکان‌ها) در مخاط بافت ژوژنوم مشاهده می‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ۴۰×).



شکل ۴- نمای میکروسکوپی از بافت ژوژنوم یک موش صحرایی از گروه ایسکمی-خون‌رسانی مجدد به‌علاوه تیمار با نارینژنین: کاهش جزئی ارتفاع پرزها، نکروز تعداد اندکی از سلول‌های بافت پوششی رأس پرزها (پیکان‌های ضخیم) و حضور کم سلول‌های آماسی (پیکان‌های باریک) در بافت ژوژنوم قابل مشاهده است (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ۴۰×).

بحث و نتیجه‌گیری

در بررسی حاضر، مطالعه ریزبینی بافت ژوژنوم تغییرات آماسی، آتروفی پرزها و زخم‌های مخاطی روده را در اثر آسیب ایسکمی-خون‌رسانی مجدد نشان داد که این یافته با نتایج مطالعه آبدین و همکاران در سال ۲۰۱۱ هم‌خوانی دارد (Abdeen *et al*., 2011). در این مطالعه افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در بافت ژوژنوم، نشان داد که استرس‌اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد، یکی از مکانیسم‌های احتمالی در پاتوفیزیولوژی آسیب ایسکمی-خون‌رسانی مجدد 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 ترزی و همکاران در سال ۲۰۱۰ و اکودان و همکاران در سال ۲۰۱۳ نیز نقش استرس اکسیداتیو در آسیب ناشی از ایسکمی-خون‌رسانی مجدد در روده را مورد تائید قرار می‌دهد (Terzi *et al*., 2010; Okudan *et al*., 2013).

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 (Viswa *et al*., 2007).

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 (۵). 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 (Kremer, 2004; Miyazono *et al*., 2004; Sener *et al*., 2006).

هم‌چنین گونه‌های فعال اکسیژن باعث افزایش نفوذپذیری در سلول‌های توپوشی 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 غیراشباع غشاهای سلولی، اسیدهای نوکلئیک و باندهای سولفیدریل پروتئین‌ها، باعث آسیب روده در اثر استرس اکسیداتیو ناشی از آسیب ایسکمی-خون‌رسانی مجدد می‌شوند (Mallck *et al*., 2004). بدین ترتیب، پراکسیداسیون لیپیدی، که در آسیب غشاهای سلولی میزان آن افزایش پیدا می‌کند، اتفاق می‌افتد. افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید در موش‌های دچار آسیب ایسکمی-خون‌رسانی مجدد 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، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز مشاهده شد که این یافته با نتایج مطالعه ترزی و همکاران در سال ۲۰۱۰، آبدین و همکاران در سال ۲۰۱۱ و اکودان و همکاران در سال ۲۰۱۳ هم‌خوانی دارد (Terzi *et al*., 2010; Abdeen *et al*., 2011; Okudan *et al*., 2013). 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 سمّی آن را کاهش می‌دهد (Curtis *et al*., 1972). در مطالعه ما، میزان سوپراکسید دیسموتاز در بافت روده موش‌های صحرایی دچار آسیب ایسکمی-خون‌رسانی مجدد به دلیل تشکیل فراوان آنیون‌های سوپراکسید، به طور معنی‌داری کاهش یافت که به دنبال آن فعالیت آنزیم‌های زداینده پراکسید هیدروژن یعنی کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز نیز به طور معنی‌داری کاهش یافت. 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 بروز اثرات مخرب ناشی از رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن منجر شود (Chance *et al*., 1952).

در مطالعه ما فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز که برای تولید مجدد گلوتاتیون احیا ضروری است، متعاقب آسیب ایسکمی-خون‌رسانی مجدد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. کاهش فعالیت این آنزیم ممکن است دلیلی برای کاهش پاک‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن توسط گلوتاتیون احیا باشد که به آسیب اکسیداتیو بافت روده منجر می‌شود. گلوتاتیون ردوکتاز یک آنزیم

سیتوزولی است که در کاهش گلوتاتیون اکسید، به عنوان محصول نهایی فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز روی گلوتاتیون احیا، دخالت دارد (Naik and Panda; 2008).

اغلب گزارش‌ها نشان داده‌اند که استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها باعث کاهش اثرات مخرب خون‌رسانی مجدد در مخاط روده می‌شود (Ozkan *et al*., 2009; Ustundag *et al*., 2000; Chen *et al*., 2007; Teke *et al*., 2007; Berber *et a*l., 2009).

در این مطالعه، موش‌های گروه ایسکمی- بازخون- رسانی به‌علاوه تیمار با نارینژنین، نارینژنین را به طور تازه با حل کردن پودر در حلال دی‌متیل‌سولفوکسید، به میزان ۲۰mg/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 (Yildiz *et al*., 2009; Yildiz *et al*., 2010).

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

نتایج بررسی حاضر، گزارش سایر محققین در خصوص اثرات آنتی‌اکسیدانی و زدایش رادیکال‌های آزاد توسط نارینژنین را مورد تائید قرار می‌دهد. تحقیقاتی که توسط تستای و همکاران در سال ۲۰۱۳ به انجام رسیده است اثرات مفید آنتی اکسیدانی نارینژنین بر آسیب ایسکمی- خون‌رسانی مجدد میوکارد قلب را به اثبات رسانده است (Testai *et al*., 2013). رازا و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که نارینژنین می‌تواند بافت عصبی را با خواص آنتی‌اکسیدانی خود از آسیب ایسکمی- خون‌رسانی مجدد محافظت کند (Raza *et al*., 2013). مطالعات انجام شده توسط آلنستیل و همکاران در سال ۲۰۰۶ اثرات محافظتی آنتی‌اکسیدانی نارینژنین را در برابر آسیب ایسکمی- خون‌رسانی مجدد کلیه به اثبات رسانده است (Ahlenstiel *et al*., 2006). دمبینسکی و همکاران در سال ۲۰۰٤ مشخص نمودند که نارینژنین با خواص آنتی‌اکسیدانی خود آسیب ایسکمی- خون‌رسانی مجدد پانکراس را کاهش می‌دهد (Dembinski *et al*., 2004). اثرات محافظتی نارینژنین بر آسیب ایسکمی- خون‌رسانی مجدد بافت شبکیه توسط کارا و همکاران در سال ۲۰۱٤ به اثبات رسیده است (Kara *et al*., 2014).

با توجه به مجموعه فوق‌الذّکر، نارینژنین با استفاده از خواص آنتی‌اکسیدانی خود، بافت ژوژنوم موش‌های صحرایی را در برابر آسیب ایسکمی-خون‌رسانی مجدد محافظت می‌کند. بنابراین، نارینژنین می‌تواند پس از انجام کارآزمایی‌های بالینی و کسب نتایج مفید، در موارد انسداد اختناقی روده، جراحی‌های قلبی-عروقی، جراحی آئورت بطنی و پیوند روده که آسیب ایسکمی-

خون‌رسانی مجدد روده مشکلات جدی را برای بیمار فراهم می‌کند (Mallick *et al*., 2005)، مورد استفاده قرار گیرد. به هرحال تاثیر دزهای مختلف نارینژنین، مکان و مکانیسم یا مکانیسم‌های مولکولی و سلولی مؤثر در عملکرد فارماکولوژیکی نارینژنین ناشناخته مانده و نیاز به مطالعات آتی دارد.

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.

منابع

- 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.
- Ahlenstiel, T., Burkhardt, G., Köhler, H. and 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.
- Arul, D. and Subramanian, P. (2013). Inhibitory effect of naringenin (citrus flavonone) on N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis in rats. Biochemical and Biophysical Research Communications, 434: 203-209.
- Asfar, S., Zhong, R. and Grant, D. (1994). Small bowel transplantation. Surgical Clinics of North America, 74: 1197-1210.
- Berber, I., Aydin, C., Cevahir, N., Yenisey, C., Gumrukcu, G., Kocbil, G., *et al*. (2009). Tempol reduces bacterial translocation after ischemia/reperfusion injury in a rat model of superior mesenteric artery occlusion. Surgery Today, 39: 407-413.
- Chance, B., Greenstein, D.S. and Roughton, R.J.W. (1952). The mechanism of catalase action. 1. Steady-state analysis. Archives of Biochemistry and Biophysics, 37(2): 301-321.
- Chen, C.F., Hsueh, C.W., Tang, T.S., Wang, D., Shen, C.Y. and Pei, J.S. (2007). Reperfusion liver injury-induced superoxide dismutase and catalase expressions and protective effect of N-acetyl cysteine. Transplantation Proceedings, 39: 858-860.
- Chiou, G.C.Y. and Xu, X. (2004). Effects of some natural flavonoids on retinal function recovery after ischemic insult in the rat. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, 20(2): 107-113.
- Choi, E.J. and Ahn, W.S. (2008). Neuroprotective effects of chronic hesperetin administration in mice. Archives of Pharmacal Research, 31(11): 1457-1462.
- Cicales, L., Sileri, P., Green, M., Abu-Elmagd, K., Kocoshis, S. and Reyes, J. (2001). Bacterial translocation in clinical transplantation. Transplantation, 71: 1414-1417.
- Claiborne, A. (1985). Catalase activity In: Boca Raton FL, editor. CRC Handbook of methods for oxygen radical research. Florida: CRC Press, Boca Raton, pp: 283-284.
- Collard, C.D. and Gelman, S. (2001). Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. Anesthesiology, 94(6): 1133-1138.
- Curtis, S.J., Mortiz, M. and Sondgrass, P.J. (1972). Serum enzymes derived from liver cell fractions. I. The response to carbon tetrachloride intoxication in rats. Gastroentrology, 62(1): 84-92.

- Dembinski, A., Warzecha, Z., Konturek, S.J., Ceranowicz, P., Dembinski, M., Pawlik, W.W., *et al*. (2004). Extract of grapefruit-seed reduces acute pancreatitis induced by ischemia/reperfusion in rats; possible implication of tissue antioxidants. Journal of Physiology and Pharmacology, 55(4): 811-821.
- Fraga, C.G., Leibovitz, B.E. and Tappel, A.L. (1988). Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. Free Radical Biology and Medicine, 4(3): 155-161.
- Gulgun, M., Erdem, O., Ozta, E., Kesik, V., Balamtekin, N., Vurucu, S., *et al*. (2010): Proanthocyanidin prevents methotrexate-induced intestinal damage and oxidative stress. Experimental and Toxicologic Pathology, 62(2): 109-115**.**
- Haidari, F., Keshavarz, S.A., Rashidi, M.R., and Shahi, M.M. (2009). Orange juice and hesperetin supplementation to hyperuricemic rats alter oxidative stress markers and xanthine oxidoreductase activity. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 45(3): 285-291.
- Hirai, S., Kim, Y.I., Goto, T., Kang, M.S., Yoshimura, M., Obata, A., *et al*. (2007). Inhibitory effect of naringenin chalcone on inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. Life Science, 81: 1272-1279.
- Jain, A., Yadav, A., Bozhkov, A.I., Padalko, V.I. and Flora, S.J. (2011). Therapeutic efficacy of silymarin and naringenin in reducing arsenic-induced hepatic damage in young rats. Ecotoxicology and Environmental Safety, 74: 607-614.
- Jong-Hwa, P., Jin-Woo, L., Hyun-Dong, P., Ssang-Goo, C., Seung-Yeol, N., Yong-Sun, P., *et al*. (2010). Cytotoxic Effects of 7-O-Butyl Naringenin on Human Breast Cancer MCF-7 Cells. Food Science and Biotechnology, 19: 717-724.
- Kara, S., Gencer, B., Karaca, T., Tufan, H.A., Arikan, S., Ersan, I., *et al***.** (2014). Protective Effect of Hesperetin and Naringenin against Apoptosis in Ischemia/Reperfusion-Induced Retinal Injury in Rats**.** Scientific World Journal, 797824.
- Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, E. and Yano M. (1999). Quantitation of flavonoid constituents in Citrus fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(9): 3565-3571.
- Kinoshita, T., Lepp, Z., Kawai, Y., Terao, J. and Chuman H. (2006). An integrated database of flavonoids. BioFactors, 26(3): 179-188.
- Koike, K., Moore, F.A., Moore, E.E., Read, R.A., Carl, V.S. and Banerjee, A. (1993). Gut ischemia mediates lung injury by a xanthine oxidasedependent neutrophil mechanism. Journal of Surgical Research, 54(5): 469-473.
- Kremer, J.M. (2004): Toward a better understanding of methotrexate. Arthritis and Rheumatology, 50:1370-1382.
- Lee, J. and Kim, G. (2010). Evaluation of antioxidant and inhibitory activities for different subclasses flavonoids on enzymes for rheumatoid arthritis. Journal of Food Science, 75(7): H212-H217.
- Lee, G. and Luna, H.T. (1988). Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. Third Edition. The Blakiston Division Mc Graw. Hill Book Company, pp: 32-107.
- Lisa, J., Wilcox, M. and Borradaile, W. (1999). Antiatherogenic Properties of Naringenin, a Citrus Flavonoid. Cardiovascular Drug Reviews, 17:160-178.
- Mallick, J.H., Yang, W.X., Winslet, M.C. and Seifalian, A.M. (2004). Ischemia–reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. Digestive Diseases and Sciences, 49: 1359-1377.
- Mallick, J.H., Yang, W.X., Winslet, M.C. and Seifalian, A.M. (2005). Pyrrolidine dithiocarbamate reduces ischemia-reperfusion injury of the small intestine. World Journal of Gastroenterology 11:7308-7313.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V. and Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clinical Science, 84: 407-412.
- Miyazono, Y., Gao, F. and Horie, T. (2004). Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. Scand. Journal of Gastroenterology, 39(11): 1119-1127.

- Miyake, Y., Minato, K., Fukumoto, S., Yamamoto, K., Oya-ito, T., Kawakishi, S., *et al*. (2003). New potent antioxidative hydroxyflavanones produced with Aspergillus saitoi from flavanone glycoside in citrus fruit. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 67(7): 1443-1450.
- Mohandas, J., Marshall, J.J., Duggin, G.G., Horvath, J.S. and Tiller, D.J. (1984). Low activities of glutathione-related enzymes as factors in the genesis of urinary bladder cancer. Cancer Research, 44(11): 5086-5091.
- Moore, E.E., Moore, F.A., Franciose, R.J., Kim, F.J., Biffl, W.L. and Banerjee, A. (1994). The postischemic gut serves as a priming bed for circulating neutrophils that provoke multiple organ failure. Journal of Trauma, 37(6): 881-887.
- Mulvihill, E.E., Allister, E.M., Sutherland, B.G., Telford, D.E., Sawyez, C.G., Edwards, J.Y., *et al*. (2009). Markle JM, Hegele RA, Huff MW. Naringenin prevents dyslipidemia, apolipoprotein B overproduction, and hyperinsulinemia in LDL receptor-null mice with diet-induced insulin resistance. Diabetes, 58: 2198-2210.
- Naik, S.R. and 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.
- Nalini, N., Aranganathan, S. and Kabalimurthy, J. (2012). Chemopreventive efficacy of hesperetin (citrus flavonone) against 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. Toxicology Mechanisms and Methods, 22: 397-408.
- Nishikimi, M., Appaji, N. and Yagi, K. (1972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. Biochemical and Biophysical Research Communications, 46(2): 849-854.
- Okudan, N., Belviranli, M., Gökbel, H., Oz M. and Kumak A. (2013). Protective effects of curcumin supplementation on intestinal ischemia reperfusion injury. Phytomedicine, 20(10): 844-848.
- Oršolić, N., Gajski, G., Garaj-Vrhovac, V., Dikić, D., Prskalo, Z.Š. and Sirovina, D. (2011). DNA-protective effects of quercetin or naringenin in alloxan-induced diabetic mice. European Journal of Pharmacology, 656: 110-118.
- Ortiz-Andrade, R.R., Sánchez-Salgado, J.C., Navarrete-Vázquez, G., Webster, S.P., Binnie, M., García-Jiménez, S., *et al*. (2008). Antidiabetic and toxicological evaluations of naringenin in normoglycaemic and NIDDM rat models and its implications on extra-pancreatic glucose regulation. Diabetes, Obesity and Metabolism, 10: 1097-1104.
- Ozkan, O.V., Yuzbasioglu, M.F., Ciralik, H., Kurutas, E.B., Yonden Z., Aydin, M., *et al*. (2009). Resveratrol, a natural antioxidant, attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. Tohoku Journal of Experimental Medicine, 218: 251-258.
- Pollard, S.E., Whiteman, M. and Spencer, J.P.E. (2006). Modulation of peroxynitrite-induced fibroblast injury by hesperetin: a role for intracellular scavenging and modulation of ERK signalling. Biochemical and Biophysical Research Communications, 347(4): 916-923.
- Rahigude, A., Bhutada, P., Kaulaskar, S., Aswar, M. and Otari, K. (2012). Participation of antioxidant and cholinergic system in protective effect of naringenin against type-2 diabetes-induced memory dysfunction in rats. Neuroscience, 226:62-72.
- Raza, S.S., Khan, M.M., Ahmad, A., Ashafaq, M., Islam, F., Wagner, A.P., *et al*. (2013). Neuroprotective effect of naringenin is mediated through suppression of NF-κB signaling pathway in experimental stroke. Neuroscience, 230: 157-171.
- Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G. and Hoekstra, W.G. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. Science, 179(73): 588-590.
- Sener, G., Eksioglu-Demiralp, E., Cetiner, M., Ercan, F. and Yegen, B.C. (2006). β glucan ameliorates methotrexate induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. European Journal of Pharmacology, 542: 170-178.
- Swank, G.M. and Deitch, E.A. (1996). Role of the gut in multiple organ failure: Bacterial translocation and permeability changes. World Journal of Surgery, 20(4): 411-417.

- Teke, Z., Kabay, B., Aytekin, F.O., Yenisey, C., Demirkan, N.C., Sacar, M., *et al*. (2007). Pyrrolidine dithiocarbamate prevents 60 minutes of warm mesenteric ischemia/reperfusion injury in rats. American Journal of Surgical Pathology, 194: 255-262.
- Terzi, A., Coban, S., Yildiz, F., Ates, M., Bitiren, M., Taskin, A., *et al*. (2010). Protective effects of Nigella sativa on intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. Journal of Investigative Surgery, 23(1): 21-27.
- Testai, L., Martelli, A., Cristofaro, M., Breschi, M.C. and Calderone V. (2013). Cardioprotective effects of different flavonoids against myocardial ischaemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts. Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics, 65: 750-756.
- Ustundag, B., Kazez, A., Demirbag, M., Canatan, H., Halifeoglu, I. and Ozercan, I.H. (2000). Protective effect of melatonin on antioxidative system in experimental ischemia–reperfusion of rat intestine. Cellular Physiology and Biochemistry, 10: 229-236.
- Viswa, K.K., Premila, A. and 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.
- Yamamoto, S., Tanabe, M., Wakabayashi, G., Shimazu, M., Matsumoto, K. and Kitajima, M. (2001). The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in ischemia–reperfusion injury of the rat small intestine. Journal of Surgical Research, 99: 134-141.
- Yildiz, Y., Kose, H., Cecen, S., Ergin, K., Demir, E.M. and Serter, M. (2010). Protective effect of leflunomide on intestinal ischemia–reperfusion injury: leflunomide against intestinal ischemia–reperfusion. Digestive Diseases and Sciences, 55: 245-252.
- Yildiz, Y., Serter, M., Ek, R.O., Ergin, K., Cecen, S., Demir, E.M. and Yenisey, C. (2009). Protective effect of caffeic acid phenethyl ester on intestinal ischemia–reperfusion injury. Digestive Diseases and Sciences, 54: 738-744.
- Zbarsky, V., Datla K.P., Parkar, S., Rai, D.K., Aruoma, O.I. and Dexter, D.T. (2005). Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and naringenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. Free Radical Research, 39: 1119-1125.