Research Paper

Effect of the flavonoid quercetin on mitochondrial membrane potential and neutrophilic infiltration following methotrexate-induced testicular injury in rats

Ensyie Joneidi[1], Manizheh Karami[1], Fatemeh Taleahmad[2], Narges HadadZadeh[2], Mehrdad Roghani[3*]

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran
2. Department of Physiology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
3. Neurophysiology Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

*** Corresponding author e-mail: mehjour@yahoo.com**

Citation: Joneidi E, Karami M, Taleahmad F, HadadZadeh N, Roghani M. Effect of the flavonoid quercetin on mitochondrial membrane potential and neutrophilic infiltration following methotrexate-induced testicular injury in rats. Daneshvar Medicine 2022; 30(2):74-82.
doi: 10.22070/DANESHMED.2022.15392.1144

Abstract

Background and Objective: Methotrexate as a chemotherapeutic drug causes damage and oxidative stress in testicular tissue. Quercetin is a flavonoid with antioxidant and anti-inflammatory properties. The aim of this study was to evaluate the effect of quercetin flavonoid on mitochondrial membrane potential and neutrophil infiltration following testicular damage due to methotrexate in rats.

Materials and Methods: 40 rats were randomly divided into 5 groups: control, treated with quercetin, methotrexate and two groups of methotrexate treated with quercetin at doses of 10 and 50 mg/kg. Methotrexate was injected intraperitoneally at a dose of 20 mg/kg. Quercetin was administered daily by gavage from one day before methotrexate injection until two weeks later. At the end of the test, the testes were isolated and myeloperoxidase activity was measured as a specific marker of neutrophil infiltration and the potential of mitochondrial membrane in testicular homogenization. One-way ANOVA and Tukey post hoc test were used for statistical analysis.

Results: The mitochondrial membrane potential of methotrexate group showed a significant decrease compared to the control group ($p=0.001$). Quercetin at a dose of 50 mg/kg could improve the mitochondrial membrane potential compared to the methotrexate group ($p=0.081$). The level of myeloperoxidase in methotrexate group showed a significant increase compared to the control group ($p=0.027$) and quercetin at a dose of 50 mg/kg showed a somewhat reducing effect on the reduction of neutrophil infiltration compared to the methotrexate group ($p=0.093$).

Conclusion: The results of this study briefly showed that quercetin treatment reduces some of the side effects of methotrexate in testicular tissue, including adverse changes in mitochondrial membrane potential and, to some extent, neutrophilic infiltration.

Keywords: Quercetin, Mitochondrial membrane potential, Neutrophilic infiltration, Testis, Methotrexate

Received: 06 Mar 2022
Last revised: 12 Jun 2022
Accepted: 21 Jun 2022

مقاله پژوهشی

اثر فلاونوئید کوئرستین بر پتانسیل غشای میتوکندری و انفیلتراسیون نوتروفیلی به دنبال آسیب بیضه القا شده توسط متوترکسات در موش بزرگ آزمایشگاهی

نویسندگان: انسیه جنیدی[۱]، منیژه کرمی[۱]، فاطمه طالع احمد[۲]، نرگس حداد زاده نیری[۲]، مهرداد روغنی[۳*]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۲. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۳. مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: مهرداد روغنی Email: mehjour@yahoo.com

چکیده

مقدمه و هدف: متوترکسات به‌عنوان داروی شیمی‌درمانی سبب آسیب و ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت بیضه می‌شود. کوئرستین یک فلاونوئید با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی است. هدف از این پژوهش بررسی اثر فلاونوئید کوئرستین بر پتانسیل غشای میتوکندری و انفیلتراسیون نوتروفیلی به دنبال آسیب بیضه براثر متوترکسات در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی بود.

مواد و روش ها: تعداد ٤٠ سر موش به ٥ گروه: کنترل، تحت تیمار با کوئرستین، متوترکسات و دو گروه متوترکسات تیمار شده با کوئرستین با دوزهای ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت تصادفی تقسیم شدند. متوترکسات با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌طور داخل صفاقی تزریق گردید. کوئرستین به‌طور روزانه از یک روز قبل از تزریق متوترکسات تا دو هفته بعد آن با استفاده از گاواژ تجویز شد. در پایان کار، بیضه‌ها جدا و فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز به‌عنوان مارکر اختصاصی انفیلتراسیون نوتروفیلی و میزان پتانسیل غشای میتوکندری در هموژنه بافت بیضه سنجش شد. برای آنالیز آماری از آنووای یکطرفه و تست تعقیبی توکی استفاده شد.

نتایج: پتانسیل غشای میتوکندری گروه متوترکسات نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد ($p=0.001$). و کوئرستین با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم توانست موجب بهبود میزان پتانسیل غشا میتوکندری در مقایسه با گروه متوترکسات شود ($p=0.081$). میزان میلوپراکسیداز گروه متوترکسات نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد ($p=0.027$) و کوئرستین با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر روی کاهش انفیلتراسیون نوتروفیلی نسبت به گروه متوترکسات تاحدی اثر کاهنده از خود نشان داد ($p=0.093$).

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق به‌طور خلاصه نشان داد که تیمار با کوئرستین برخی از عوارض متوترکسات را در بافت بیضه ازجمله تغییرات نامطلوب پتانسیل غشای میتوکندری و تا حدی انفیلتراسیون نوتروفیلی را کاهش می‌دهد.

واژه های کلیدی: کوئرستین، پتانسیل غشای میتوکندری، انفیلتراسیون نوتروفیلی، بیضه، متوترکسات

دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۱۸
آخرین اصلاح‌ها: ۱۴۰۱/۰۳/۲۲
پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۳۱

مقدمه

متوترکسات[1] (٤-آمینو-١٠-متیل فولیک اسید)، آنالوگ و آنتاگونیست اسید فولیک، معمولاً در درمان طیف وسیعی از بیماری‌های بدخیم و غیر بدخیم استفاده می‌شود (١). این دارو پس از تشخیص تأثیرات غیرمستقیم بر سنتز DNA در سال ١٩٤٨، به‌عنوان داروی ضد نئوپلاستیک وارد پزشکی بالینی شد. همچنین با مکانیسم دیگری، با تأثیر بر تکثیر بافت همبند، به داروهای کورتیکو استروئید نیز شباهت دارد. بنابراین این دارو در درمان پسوریازیس، پسوریازیس آرتریت و آرتریت روماتوئید[2] نیز مورداستفاده است. این دارو اخیراً با داروهای مختلف روماتیسمی مانند کورتیکو استروئیدها و داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی جدید مانند مهارکننده‌های مولکولی خاص التهاب مقایسه شده است (٢).

اما مطالعات نشان می‌دهد که متوترکسات با دوز پایین از طریق تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS) سلول‌های T را وادار به آپوپتوز می‌کنند و منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو و آسیب بافتی می شود. ROS نه تنها در مرگ سلول نقش دارد، بلکه عملکردهای مختلف سلول مانند سرکوب تولید سیتوکین و تکثیر سلول را نیز تنظیم می‌کند. تولید ROS ناشی از متوترکسات ممکن است به واسطه تتراهیدروبیوپترین[3] باشد. متوترکسات یک مهارکننده قوی دی‌هیدروفولات ردوکتاز است. دی‌هیدروفولات ردوکتاز باعث کاهش کاتالیز دی هیدروبیوپترین به تتراهیدروبیوپترین می‌شود که یک فاکتور مورد نیاز برای سنتز نیتریک اکسید (NO) توسط نیتریک اکسید سنتتاز (NOS) است. تخلیه تتراهیدروبیوپترین NOS را جدا و رها کرده و منجر به از دست دادن سنتز NO و افزایش تولید ROS می‌شود (١).

از طرفی میتوکندری، نقطه هدف آسیب های ناشی از استرس اکسیداتیو (در فرآیندهای متابولیک داخلی/تأثیرات اکسیداتیو خارجی) است. آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو در DNA میتوکندری، می‌تواند منجر به کاهش پروتئین‌های دخیل در انتقال الکترون، تولید ROS و در نهایت اختلال در عملکرد سیستم‌های آنزیمی زنجیره انتقال الکترون (نیکوتین آمید آدنین دینوکلئوتید دهیدروژناز، سیتوکروم C اکسیداز و آدنوزین تری فسفات سنتتاز) به عنوان اهداف عمده رادیکال‌های آزاد آن شود که به نوبه خود منجر به فعال شدن مکانیسم آپوپتوز سلولی می‌گردد. همچنین ROS از طریق تغییر در فسفولیپیدهای میتوکندریایی و پراکسیداسیون لیپیدی سبب افزایش نفوذپذیری غشای میتوکندری می شود، ضمن اینکه با اکسیداسیون گروه های تیول موجود در واحدهای انتقال دهنده نوکلئوتید آدنین بخشی از (MPTP)[4] باعث تشدید ایجاد منافذی با نفوذپذیری بیشتر در غشاء میتوکندری گردد. یون ONOO- هم از طریق غیرفعال کردن سیستم های آنزیمی و افزایش انتشار Ca2+ میتوکندریایی می‌تواند بر روی هوموستاز و تولید انرژی میتوکندری، مؤثر باشد. افزایش آنی سطح کلسیم سیتوزولی با تغییر پتانسیل غشای میتوکندریایی موجب القای تولید رادیکال های سوپراکسید و متعاقب آن تضعیف چرخه گردد. افزایش سطح کلسیم میتوکندریایی نقش کمک کننده‌ای در تشکیلMPTP، تورم اسمزی و پارگی غشای بیرونی میتوکندری دارد. این تغییرات میتوکندریایی ناشی از استرس اکسیداتیو، میتواند همراه با رهاسازی سیتوکروم c-، تغییر در میزان بیان Bcl2/Bax (کاهش پروتئین Bcl2 و افزایش بیان Bax)، فعال سازی MAPK ها و Casp-3، به آپوپتوزسلولی ختم شود (٣) .

آنزیم میلوپراکسید از نیز یکی از اعضای خانواده آنزیمی پراکسیداز است که نقش بسیارمهمی در فرآیندهای التهابی و استرس اکسیداتیو دارد. این آنزیم در حالت فیزیولوژیک در سیستم ایمنی ذاتی و مقابله با پاتوژن‌های میکروبی نقش دارد و از طریق کاتالیز نمودن واکنش انفجار تنفسی با کمک هیدروژن پراکسید باعث تولید حدواسط های اکسید کننده زیادی می‌شود که باعث آسیب های اکسیداتیو به سلول ها و بافت ها می شود (٤).

داروی متوترکسات قابلیت عبور از سد خونی بیضه‌ای را دارد. مطالعاتی که در پی تجویز داروی متوترکسات به‌صورت مزمن انجام گرفته نشان داده است که سایز سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه، ثانویه، اسپرماتید و

[1] Methotrexate(MTX)
[2] Rheumatoid Arthritis (RA)
[3] Tetrahydrobiopterin
[4] MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)

سلول‌های لایدیک و سرتولی در گروه‌های موردمطالعه در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته و همچنین توده کروماتین سلول‌های اسپرماتوسیت از حالت کروی به بیضوی دچار تغییر شکل شده‌اند و در بافت بینابینی بیضه سبب افزایش فضای سلولی و کاهش قطر لوله‌های سمینی فر و نیز تغییر شکل سلول‌های لایدیک شده، همچنین منجر به کاهش میزان تستوسترون و کلسترول سرم و سبب الیگواسپرمیا و کاهش تعداد و تغییر شکل سر اسپرم، سمیت سلول‌های ژرمینال، تغییرات بافتی و بروز آپوپتوز در موش‌های آزمایشگاهی شده است (۹-۵).

کاملاً ثابت‌شده است که آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی معمولاً برای بدن انسان بی‌ضرر هستند. آن‌ها مولکول‌هایی هستند که از طریق مسدود کردن اثرات فاجعه بار رادیکال‌های آزاد بر بسیاری از بیماری‌ها و واکنش‌های زنجیره‌ای و همچنین پیری زودرس جلوگیری می‌کنند. مشاهده شده است، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای توسط درمان کوئرستین افزایش می‌یابد (۱۰).

کوئرستین C15H10O7 با فرمول شیمیایی (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4-Hchromen-4-one) یکی از مهم‌ترین مولکول‌های گیاهی است که فعالیت‌های دارویی زیادی دارد. ازنظر دارویی دارای اثرات ضدالتهاب و آنتی‌اکسیدان، تحریک‌کننده سیستم ایمنی، گشادکننده عروق، ضد دیابت، فشارخون بالا، ضد تصلب شرایین و ضد کلسترول خون است. به صورت مکمل غذایی به‌صورت کپسول و پودر موجود است (۱۱). منابع غذایی غنی از کوئرستین، میوه و سبزی (مخصوصاً پیاز قرمز، سیب، توت و مرکبات)، چای، مغزها و دانه‌ها بوده و در آن‌ها بیشتر به شکل گلیکوزیدی کوئرسیترین دیده می‌شود که قابلیت جذب کمی دارد و در صورت هیدرولیزگلیکوزید جذب آن به ۸۱- ٦٨٪ می‌رسد (۱۲،۱۳). کوئرستین قادر به مهار گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر است و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی آن به مهار رادیکال‌های آزاد نسبت داده می‌شود (١٤). ویژگی آنتی‌اکسیدانی کوئرستین به ساختار شیمیایی، به‌ویژه وجود و محل جایگزینی‌های هیدروکسیل و نوع حلقه کاتکول مرتبط است (۱۰). گزارش‌شده است که کوئرستین اثر مهاری در برابر پراکسیداسیون لیپید ناشی از ترت بوتیل هیدروپراکسید در سلول‌های اسپرم انسان نشان می‌دهد (١٤). مطالعه دیگری نشان داده است که کوئرستین قادر به جلوگیری از اثر سمی مواد شیمیایی تحت درمان قبل از بارداری است و می‌تواند از اقدامات سمی ترکیبات شیمی‌درمانی تحت درمان قبل از بارداری جلوگیری کند (۱۵).

با توجه به کاربرد وسیع داروی متوترکسات و اثرات آسیب‌رسان استرس اکسیداتیوی که به همراه دارد و در بسیاری از گزارشات ذکر گردیده است و به منظور دستیابی به یک ماده محافظتی موثر که منجر به کاهش اثر استرس اکسیداتیوی متوترکسات شود، برای اولین بار در این مطالعه اثر فلاونوئید کوئرستین بر دو فاکتور مهم: پتانسیل غشای میتوکندری (که خود نقطه هدف آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو است) و همچنین سنجش فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز (به عنوان شاخصی از انفیلتراسیون نوتروفیلی) مورد بررسی قرار گرفته شد. بنابراین هدف از این مطالعه ارزیابی اثر محافظتی کوئرستین به دنبال آسیب بیضه القا شده توسط متوترکسات در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی با در نظر گرفتن پارامترهای استرس اکسیداتیو، سنجش پتانسیل غشای میتوکندری و نشانگر نفوذ نوتروفیل‌ها، سنجش فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

گروه‌های مورد آزمایش

در این تحقیق تعداد ٤٠ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر به وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم از مرکز مطالعات حیوانی دانشگاه شهید بهشتی خریداری شد. و در درجه حرارت ۲۱±۲°C سیکل تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته و رطوبت ٤٠-۳۰٪ نگهداری شدند. آب و غذای استاندارد بدون هیچ محدودیتی در اختیار آن‌ها قرار گرفت. موش‌ها به ۵ گروه تقسیم شدند و در هر گروه ۸ موش به صورت تصادفی در گروه‌های: کنترل، تحت تیمار با کوئرستین به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، متوترکسات و دو گروه متوترکسات تیمار شده +کوئرستین با دوزهای ۱۰ و۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم قرار گرفتند. متوترکسات با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌طور داخل صفاقی تزریق گردید. کوئرستین

به‌طور روزانه از یک روز قبل از تزریق متوترکسات تا دو هفته بعد آن به فرم خوراکی با استفاده از گاواژ با دوزهای ۱۰و۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تجویز شد (۱۶،۱۷).

مراحل انجام کار

در پایان دو هفته گاواژ، موش‌ها بیهوش شده و پس از بیهوش نمودن موش‌ها و کشتن آن‌ها با رعایت مسائل اخلاقی بیضه‌ها جدا و هموژنه بافتی تهیه شد، سپس فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز به عنوان مارکر اختصاصی انفیلتراسیون نوتروفیلی و میزان پتانسیل غشا میتوکندری در هموژنه بافت بیضه سنجش شد.

تهیه هموژنه بافتی

مخلوط هموژنه بافتی ۱۰ درصد در محلول لیز کننده تریس هیدروکلراید ۱۵۰ میلی‌مولار تهیه شد. سپس مخلوط به دست آمده را با استفاده از دستگاه هموژنیزه کننده مخلوط کردیم. سوسپانسیون به دست‌آمده را با حفظ زنجیره سرمایی به سانتریفیوژ یخچال دار منتقل کردیم و با دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کردیم سپس سوپرناتانت حاصل را به وسیله سمپلر از رسوبات جدا کردیم و به درون میکروتیوب انتقال دادیم (۱۸).

سنجش میلوپراکسیداز (MPO)

سنجش فعالیت MPO به عنوان شاخصی از انفیلتراسیون نوتروفیلی شناخته می‌شود. در این روش از سوپرناتانت هموژنه‌ی بافت بیضه استفاده می‌شود. در این روش هموژنه را به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کردیم. سپس نمونه‌ها را در اتاق تاریک با آب اکسیژنه و تترا متیل بنزیدین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مدت ۵ دقیقه مخلوط کردیم سپس برای اتمام واکنش به محلول‌ها H2SO4 اضافه کردیم و در اسپکتروفتومتر میزان جذب آن را در طول‌موج ٤٥٠ نانومتر خواندیم (۱۸).

سنجش پتانسیل غشای میتوکندری(MMP)

از آنجایی که میتوکندری یکی از اندامک‌های اصلی درگیر در آپوپتوز است پتانسیل غشای میتوکندری به عنوان یک شاخص سلامت میتوکندری سنجیده می‌شود. در این پژوهش از روش رودامین۱۲۳ برای سنجش پتانسیل غشای میتوکندری استفاده شد. به این صورت که ۱۵۰ میکرولیتر نمونه هموژنه را برداشتیم و با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کردیم. سپس از روی نمونه‌ی سانتریفیوژ شده ۱۰۰ میکرولیتر برداشتیم و به باقی‌مانده آن‌ها ۱۸۰ میکرولیتر محلول بافر فسفات افزودیم. محلول به دست آمده را به خوبی مخلوط کردیم، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن‌ها جدا کردیم و ۲۰ میکرولیتر رودامین۱۲۳ را در محیط تاریک در میکروپلیت مخصوص به آن افزودیم، سپس نمونه‌های حاصل را ۳۰ دقیقه انکوبه کردیم و در طول موج ٤٨٨ نانومتر تحریک و در ۵۲۰ نانومتر جذب نوری آن را خواندیم (۱۹).

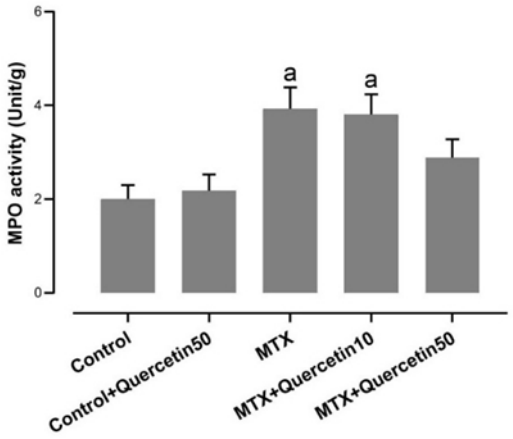
تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های جمع‌آوری‌شده به کمک نرم‌افزار آماری Graph Pad Prism 8.0 تجزیه و تحلیل شدند. تمامی داده‌ها به‌صورت mean±SEM گزارش شده‌اند. از آزمون Kolmogorov-Smirnov برای اطمینان از توزیع نرمال داده‌ها استفاده شد. سپس تحلیل واریانس از نوع یک طرفه (یک راهه یا یک عامله) از آزمون One-Way ANOVA و به دنبال آن آزمون Tukey استفاده شد. در این مطالعه P<۰/۰۵ به‌عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج میلوپراکسیداز (MPO)

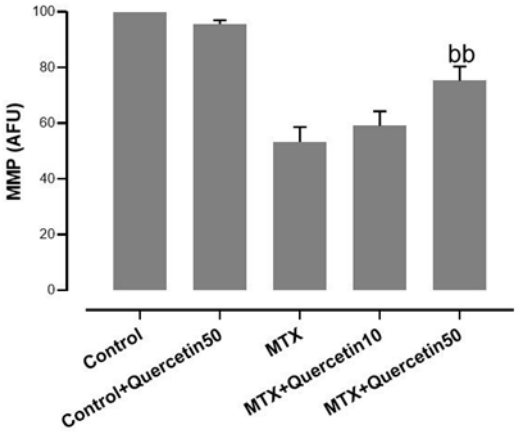
برای اطمینان از نرمال بودن توزیع متغیر وابسته (داده‌ها) در گروه ها از آزمون Kolmogorov-Smirnov استفاده شد. با اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز (MPO) به‌عنوان شاخصی از انفیلتراسیون نوتروفیلی در گروه‌های مختلف همان‌طور که در نمودار ۱ آمده است، گروه متوترکسات یک افزایش معنادار (MPO) در مقایسه با گروه کنترل نشان داد (P=0.027). به علاوه همین افزایش معنادار (MPO) در بافت بیضه گروه متوترکسات تیمارشده با کوئرستین با دوز ۱۰ mg/kg نسبت به گروه کنترل به دست آمد (P=0.031). از طرف دیگر میزان (MPO) در گروه متوترکسات دریافت‌کننده کوئرستین با دوز 50 mg/kg در مقایسه با گروه متوترکسات با کاهش همراه بود ولی این کاهش معنادار نیست (P=0.093). به‌علاوه در گروه کنترل دریافت‌کننده کوئرستین با دوز ۵۰ mg/kg تغییر معنادار(MPO) در بافت بیضه در مقایسه با گروه کنترل به دست نیامد (P=0.17).



نمودار ۱. فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز(**MPO**) در بافت بیضه در گروه‌های موردمطالعه
a : p<0.05 در مقایسه با گروه کنترل

نتایج سنجش پتانسیل غشای میتوکندری (MMP)

برای اطمینان از نرمال بودن توزیع متغیر وابسته (داده‌ها) در گروه ها از آزمون Kolmogorov-Smirnov استفاده شد. با اندازه‌گیری میزان پتانسیل غشای میتوکندری (MMP) به‌عنوان یک شاخص سلامت میتوکندری در گروه‌های مختلف همان‌طور که در نمودار ۲ آمده است، گروه متوترکسات یک کاهش بارز و معنادار در مقایسه با گروه کنترل نشان داد (p=0.001). به‌علاوه کاهش معنادار دیگری نیز در گروه متوترکسات تیمارشده با کوئرستین با دوز ۱۰ mg/kg نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (p=0.003). همچنین در گروه متوترکسات دریافت‌کننده کوئرستین با دوز 50 mg/kg هم این کاهش در حد کمتر ولی به طور معنادار در مقایسه با گروه کنترل به دست آمد (p=0.022). از طرف دیگر میزان (MMP) در گروه متوترکسات دریافت‌کننده کوئرستین با دوز۵۰ mg/kg یک افزایش معنادار در مقایسه با گروه متوترکسات نشان داد (p=0.081) که این نشان‌دهندهٔ کاهش آسیب و شرایط التهابی در گروه متوترکسات تیمارشده با کوئرستین به میزان 50 mg/kg می‌باشد. به‌علاوه در گروه کنترل دریافت‌کننده کوئرستین با دوز 50 mg/kg تغییر معنادار(MMP) در بافت بیضه در مقایسه با گروه کنترل به دست نیامد (p=0.18).



نمودار ۲. مقادیر پتانسیل غشای میتوکندری (**MMP**) در بافت بیضه در گروه‌های موردمطالعه
bb p<0.01 : در مقایسه با گروه متوترکسات

بحث

در طی مطالعات مختلف تأثیرات استرس اکسیداتیو متوترکسات بر بافت بیضه در موش‌های آزمایشگاهی گزارش شده است. متوترکسات اثرات خود را بر روی سلول‌ها، با کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی سلولی و قرار گرفتن سلول‌ها در معرض اثرات نامطلوب رادیکال‌های آزاد اکسیژن ایفا می‌کند و در نهایت منجر به تغییرات مضر در بافت بیضه و سلول‌های بنیادی می‌شود (۲۰). متوترکسات دارویی است که کاربردهای گسترده‌ای در درمان بیماری‌های بدخیم نشان داده است. اثربخشی آن به توانایی آن در مهار آنزیم‌های اصلی درگیر در بیوسنتز پورین و پیریمیدین نسبت داده می‌شود، درنتیجه تولید سلول‌های بدخیم را محدود می‌کند. به‌عنوان یک مهارکننده قوی دی هیدروفولات ردوکتاز، باعث کاهش فولات‌های داخل سلولی فعال می‌شود و سنتز جدید پورین و پیریمیدین‌ها موردنیاز برای تکثیر سلولی را کاهش می‌دهد (۱). مطالعات نشان داده است که بافت بیضه در موش‌های دریافت‌کنندهٔ متوترکسات دچار آسیب شده و تعداد سلول‌های آپوپتوز در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش نشان دادند و در گروه متوترکسات، سطح مالون دی آلدئید و میلوپراکسیداز به‌طور قابل‌توجهی در بافت و خون افزایش یافته است (۲۱). در این مطالعه ما برای اولین بار اثرات کوئرستین در آسیب بیضه القاء شده با متوترکسات را در موش بزرگ آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادیم. القاء متوترکسات به روش تزریق داخل صفاقی با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم انجام شد. در این مطالعه، در گروه دریافت کننده متوترکسات میزان فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز به عنوان شاخص انفیلتراسیون نوتروفیلی نسبت به گروه کنترل بیشتر شد. همچنین میزان پتانسیل غشای میتوکندری به عنوان شاخص سلامت میتوکندری نسبت به گروه کنترل کمتر شد. در مطالعه‌ی Ahmet Gökçe و همکارانش گزارش شد متوترکسات به‌تنهایی ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی و فعالیت میلوپراکسیداز را در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌دهد همچنین بر اساس مشاهدات میکروسکوپ نوری مشخص شد متوترکسات منجر به اتساع فضای بین بافتی، ادم، اختلال شدید در اپیتلیوم سمینی فر و کاهش قطر لوله‌های سمینی فر می‌شود (۲۲). Süleyman Oktar و همکارانش نیز گزارش کردند سطح کل ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و استرس اکسیداتیو و فعالیت میلوپراکسیداز در گروه متوترکسات بیشتر از گروه کنترل است (۲۳). نتایج به دست آمده از این مطالعه با مطالعات انجام شده همسو بود. کاملاً ثابت‌شده است که آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی معمولاً برای بدن انسان بی‌ضرر هستند. آن‌ها مولکول‌هایی هستند که از طریق مسدود کردن اثرات فاجعه‌بار رادیکال‌های آزاد بر بسیاری از بیماری‌ها و واکنش‌های زنجیره‌ای و همچنین پیری زودرس جلوگیری می‌کنند. مشاهده‌شده است، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای توسط درمان کوئرستین افزایش می‌یابد (۱۰). کوئرستین می‌تواند با کنترل تعادل اکسیدان و آنتی‌اکسیدان ، استرس اکسیداتیو را کاهش دهد. کوئرستین از رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کند و سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی بدن را تقویت می‌کند و همچنین طبق مطالعات، یک ماده ضدالتهابی با ماندگاری طولانی است (۱۱). در این مطالعه کوئرستین با دوزهای ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تجویز دهانی شد. در گروه متوترکسات تیمار شده با دیوسجنین دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، میزان فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز نسبت به گروه متوترکسات تا حدی کاهش یافت. همچنین میزان پتانسیل غشای میتوکندری نسبت به گروه متوترکسات افزایش پیدا کرد. مطالعهٔ Monika A Papiez و همکارش نشان داده است کوئرستین به‌طور قابل‌توجهی از سلول‌های غنی از میلوپراکسیداز در برابر اثرات پرو اکسیداتیو و آپوپتوز محافظت می‌کند (۲٤). همچنین Sergio M Borghi و همکارانش گزارش کردند، کوئرستین فعالیت‌های میلوپراکسیداز و تولید سیتوکین، استرس اکسیداتیو، بیان سیکلواکسیژناز-۲ (COX-2) و آسیب عضلانی کراتینین کیناز [CK] را مهار می‌کند (۲۵). در مطالعه‌ای Jana Pečivová و همکارانش بیان کردند کوئرستین می‌تواند از طریق کاهش فعالیت نوتروفیل‌ها از فرآیندهای ضدالتهابی نیز پشتیبانی کند (۲٦). همچنین مطالعات نشان داد کوئرستین می‌تواند با افزایش میتوفاژی ، آسیب میتوکندری ناشی از اتانول را کاهش دهد و منجر به کاهش آسیب‌های میتوکندری

قابل‌توجهی و بهبود پتانسیل غشای میتوکندریایی شود (۲۷). در مطالعه دیگری Ki-Mo Lee و همکارانش گزارش کردند اتانول اضافی باعث کاهش پتانسیل غشای میتوکندری و گلوتاتیون می‌شود و درمان هم‌زمان سلول‌ها با اتانول و کوئرستین، کاتچین، کافئیک اسید و اسید فیتیک با مسدود کردن تولید ROS به‌طور قابل‌توجهی سمیت سلولی ناشی از متابولیسم اکسیداتیو اتانول را مهار می کند و فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی و پتانسیل غشای میتوکندری نیز ارتقا می‌یابد و اثر حفاظتی کوئرستین گزارش شد (۲۸). Naveen Kumar Kalagatur و همکارانش نیز عنوان داشتند کوئرستین استرس ناشی از دی اکسی نیوالنول را با کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن درون‌سلولی، پراکسیداسیون چربی، ارتقای پتانسیل غشای میتوکندریایی و حفظ یکپارچگی DNA و تنظیم بیان ژن در سلول‌ها کاهش می‌دهد (۲۹). در مطالعه‌ی انجام‌شده توسط رائسی و همکاران موش‌های تحت درمان با کوئرستین ازنظر سرم کراتین کیناز CK-MB، سرم لاکتات دهیدروژناز، سطح گلوتاتیون، فعالیت کاتالاز، پتانسیل غشای میتوکندری، پراکسیداسیون لیپید و گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر نتایج بهتری نشان دادند (۳۰). نتایج به دست آمده از این مطالعه با نتایج مطالعات انجام شده همسو بود. با توجه به مجموعه فوق‌الذکر، کوئرستین با استفاده از خواص آنتی‌اکسیدانی خود، می‌تواند بیضه موش را در برابر برخی اثرات اکسیداتیو سمی متوترکسات محافظت کند.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که کوئرستین برخی از عوارض متوترکسات را در بافت بیضه ازجمله تغییرات نامطلوب پتانسیل غشای میتوکندری به‌عنوان یک شاخص سلامت میتوکندری و تا حدی میزان آنزیم میلوپراکسیداز به عنوان شاخصی از انفیلتراسیون نوتروفیلی را کاهش می‌دهد و می‌تواند باعث بهبود این پارامترها در بافت بیضه و درنهایت جلوگیری از آسیب در بافت بیضه ناشی از متوترکسات شود.

ملاحظات اخلاقی

این مقاله مستخرج از یک پایان‌نامه دورهٔ کارشناسی ارشد، دانشکده علوم پایه دانشگاه شاهد بوده و با شناسه اخلاق IR.SHAHED.REC.1399.061 توسط کارگروه کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه شاهد مورد تصویب قرارگرفته است.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد .

منابع

1. Bedoui Y, Guillot X, Sélambarom J, Guiraud P, Giry C, Jaffar-Bandjee MC, et al. Methotrexate an old drug with new tricks. International Journal Of Molecular Sciences 2019;20(20):5023.
2. Schafranski M, Merlini A, Araújo E, Camargo N, Arruda P. Methotrexate: Update on Pharmaclology, Clinical Applications and Warmings. Nova Science Publishers, New York; 2012.
3. Afshar P, Shokrzadeh M, ROOZBEH NL, Ghorbani HA, Naghizadeh RS, Alimi M. Antioxidants protective effects on oxidative stress damage induced by mycotoxins: A Review. 2020.
4. Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2005;25(6):1102-11.
5. Shrestha S, Dhungel S, Saxena A, Bhattacharya S, Maskey D. Effect of methotrexate (MTX) administration on spermatogenesis: an experimental on animal model. Nepal Medical College Journal 2007;9(4):230-3.
6. 6. Saxena A, Dhungel S, Bhattacharya S, Jha C, Srivastava A. Effect of chronic low dose of methotrexate on cellular proliferation during spermatogenesis in rats. Archives of Andrology 2004;50(1):33-5.
7. 7. Riccardi R, Vigersky RA, Barnes S, Bleyer WA, Poplack DG. Methotrexate levels in the interstitial space and seminiferous tubule of rat testis. Cancer Research 1982;42(5):1617-9.
8. Padmanabhan S, Tripathi D, Vikram A, Ramarao P, Jena G. Cytotoxic and genotoxic effects of methotrexate in germ cells of male Swiss mice. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 2008;655(1-2):59-67.
9. Badri S, Vanithakumari G, Malini T.

Studies on methotrexate effects on testicular steroidogenesis in rats. Endocrine Research 2000;26(2):247-62.
10. Ozgen S, Kilinc OK, Selamoğlu Z. Antioxidant activity of quercetin: a mechanistic review. Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology 2016;4(12):1134-8.
11. Batiha GE-S, Beshbishy AM, Ikram M, Mulla ZS, El-Hack MEA, Taha AE, et al. The pharmacological activity, biochemical properties, and pharmacokinetics of the major natural polyphenolic flavonoid: quercetin. Foods 2020;9(3):374.
12. Li X, Wang R, Zhou N, Wang X, Liu Q, Bai Y, et al. Quercetin improves insulin resistance and hepatic lipid accumulation in vitro in a NAFLD cell model. Biomedical Reports 2013;1(1):71-6.
13. Bahadoran Z, Mirmiran P, Azizi F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. Journal of Diabetes & Metabolic Disorders 2013;12(1):1-9.
14. Maalik A, Khan FA, Mumtaz A, Mehmood A, Azhar S, Atif M, et al. Pharmacological applications of quercetin and its derivatives: a short review. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 2014;13(9):1561-6.
15. Doğan Z, Kocahan S, Erdemli E, Köse E, Yılmaz I, Ekincioğlu Z, et al. Effect of chemotherapy exposure prior to pregnancy on fetal brain tissue and the potential protective role of quercetin. Cytotechnology 2015;67(6):1031-8.
16. Yang S, Cao C, Chen S, Hu L, Bao W, Shi H, et al. Serum metabolomics analysis of quercetin against acrylamide-induced toxicity in rats. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2016;64(48):9237-45.
17. Daggulli M, Dede O, Utangac MM, Bodakci MN, Hatipoglu NK, Penbegul N, et al. Protective effects of carvacrol against methotrexate-induced testicular toxicity in rats. International Journal of Clinical and Experimental Medicine 2014;7(12):5511.
18. Khosravi Z, Sedaghat R, Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Diosgenin ameliorates testicular damage in streptozotocin-diabetic rats through attenuation of apoptosis, oxidative stress, and inflammation. International Immunopharmacology 2019;70:37-46.
19. Samie A, Sedaghat R, Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Hesperetin, a citrus flavonoid, attenuates testicular damage in diabetic rats via inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. Life Sciences 2018;210:132-9.
20. Jamali B, Jamali S. The histopathological evaluation of healing effects of vitamin C administered on testicular injury induced by methotrexate. Turkish Journal of Urology 2018.
21. Sarihan KK, Yilmaz MY, Eraldemir FC, Yazir Y, Acar E. Protective effects of apocynin on damaged testes of rats exposed to methotrexate. Turkish Journal of Medical Sciences 2020;50(5):1409-20.
22. Gökçe A, Oktar S, Koc A, Yonden Z. Protective effects of thymoquinone against methotrexate-induced testicular injury. Human & Experimental Toxicology 2011;30(8):897-903.
23. Oktar S, Gökçe A, Aydin M, Davarci M, Meydan S, Oztürk OH, et al. Beneficial effect of erdosteine on methotrexate-induced testicular toxicity in mice. Toxicology and industrial Health 2010;26(7):433-8.
24. Papież MA, Krzyściak W. The antioxidant quercetin protects HL-60 cells with high myeloperoxidase activity against pro-oxidative and apoptotic effects of etoposide. Acta Biochimica Polonica 2014;61(4).
25. Borghi SM, Pinho-Ribeiro FA, Fattori V, Bussmann AJ, Vignoli JA, Camilios-Neto D, et al. Quercetin inhibits peripheral and spinal cord nociceptive mechanisms to reduce intense acute swimming-induced muscle pain in mice. PLoS One 2016;11(9):e0162267.
26. Pečivová J, MačIčková T, Sviteková K, Nosáľ R. Quercetin inhibits degranulation and superoxide generation in PMA stimulated neutrophils. Interdisciplinary Toxicology 2012;5(2):81.
27. Yu X, Xu Y, Zhang S, Sun J, Liu P, Xiao L, et al. Quercetin attenuates chronic ethanol-induced hepatic mitochondrial damage through enhanced mitophagy. Nutrients 2016;8(1):27.
28. Lee K-M, Kang H-S, Yun C-H, Kwak H-S. Potential in vitro protective effect of quercetin, catechin, caffeic acid and phytic acid against ethanol-induced oxidative stress in SK-Hep-1 cells. Biomolecules & Therapeutics 2012;20(5):492.
29. Kalagatur NK, Abd_Allah EF, Poda S, Kadirvelu K, Hashem A, Mudili V, et al. Quercetin mitigates the deoxynivalenol mycotoxin induced apoptosis in SH-SY5Y cells by modulating the oxidative stress mediators. Saudi Journal of Biological Sciences 2021;28(1):465-77.
30. Vanani AR, Mahdavinia M, Shirani M, Alizadeh S, Dehghani MA. Protective effects of quercetin against oxidative stress induced by bisphenol-A in rat cardiac mitochondria. Environmental Science & Pollution Research 2020;27(13).