Research Paper

The effect of diosgenin on mitochondrial health and neutrophil infiltration indices in methotrexate-induced liver damage in the rat

Narges Haddadzadeh Niri[1], Mohsen Khalili[2], Fatemeh Taleahmad[1], Ensiyeh Joneidi[3], Mehrdad Roghani[2*]

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

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

Citation: Haddadzadeh Niri N, Khalili M, Taleahmad F, Joneidi E, Roghani M. The effect of diosgenin on mitochondrial health and neutrophil infiltration indices in methotrexate-induced liver damage in the rat. Daneshvar Medicine 2022; 30(3):62-71.
doi: 10.22070/DANESHMED.2022.15645.1165

Abstract

Background and Objective: The liver is the largest gland in the body with multiple functions. Methotrexate causes acute and chronic liver damage. In this study, the effects of diosgenin were investigated as a steroidal sapogenin on mitochondrial membrane potential (MMP) and neutrophil infiltration activity in a methotrexate-induced liver injury model in male rats.

Materials and Methods: 40 rats in 5 groups; control, control treated with diosgenin 50 mg/kg, methotrexate at a dose of 20 mg/kg (i.p) and two groups treated with diosgenin at doses 10, 50 mg/kg (gavage) were divided. The rats were anesthetized and the liver tissue was isolated after killing. After tissue homogeneity, neutrophil infiltration activity and mitochondrial membrane potential were measured. For statistical analysis, one-way ANOVA and Tukey post-test were used, and the significance level was $p < 0.05$.

Results: The potential of the mitochondrial membrane in the methotrexate group treated with diosgenin 10 mg/kg was significantly reduced compared to the control group and in the group treated with diosgenin 50 mg/kg was significantly increased compared to methotrexate. On the other hand, myeloperoxidase increased significantly in the methotrexate group and treated with diosgenin 10 mg/kg compared to the control group and decreased significantly in the group treated with diosgenin 50 mg/kg compared to the methotrexate group.

Conclusion: Diosgenin at a dose of 50 mg/kg in the methotrexate-induced liver injury model was able to improve mitochondrial health and reduced neutrophil infiltration.

Keywords: Liver, Methotrexate, Diosgenin, Mitochondrial health, Neutrophilic infiltration

Received: 20 Apr 2022
Last revised: 12 July 2022
Accepted: 20 July 2022

مقاله پژوهشی

اثر دیوسجنین بر شاخص‌های سلامت میتوکندری و انفیلتراسیون نوتروفیلی در آسیب کبد القاء شده با متوترکسات در موش بزرگ آزمایشگاهی

نویسندگان: نرگس حدادزاده نیری[۱]، محسن خلیلی[۲]، فاطمه طالع احمد[۱]، انسیه جنیدی[۳]، مهرداد روغنی[۲*]

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

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

چکیده

مقدمه و هدف: کبد به‌عنوان بزرگ‌ترین غده بدن با وظایف متعدد است. متوترکسات سبب آسیب حاد و مزمن در کبد می‌شود. در این مطالعه اثر دیوسجنین به عنوان ساپوژنین استروئیدی، بر پتانسیل غشاء میتوکندری (MMP) و فعالیت انفیلتراسیون نوتروفیلی در مدل آسیب کبد القاء شده با متوترکسات درموش بزرگ آزمایشگاهی نر بررسی شد.

مواد و روش ها: تعداد ۴۰ موش به ۵ گروه کنترل، کنترل تحت تیمار با دیوسجنین 50 mg/kg، متوترکسات با دوز 20 mg/kg (i.p) و دو گروه تحت تیمار دیوسجنین با دوزهای 10, 50 mg/kg (گاواژ) تقسیم شدند. با رعایت اخلاق موش‌ها بی‌هوش و پس از کشته شدن بافت کبد جدا شد. پس از تهیهٔ هموژنهٔ بافتی فعالیت انفیلتراسیون نوتروفیلی و پتانسیل غشاء میتوکندری سنجش شد. برای آنالیز آماری داده ها از آزمون آنووای یکطرفه و تست تعقیبی توکی استفاده شد و سطح معنی داری $p<0.05$ مقررشد.

نتایج: پتانسیل غشاء میتوکندری در گروه متوترکسات و تحت تیمار با دیوسجنین 10 mg/kg نسبت به کنترل کاهش معنی‌دار و در گروه تحت تیمار با دیوسجنین 50 mg/kg نسبت به متوترکسات افزایش معنی‌دار داشت. از طرفی میلوپراکسیداز در گروه متوترکسات و گروه تحت تیمار با دیوسجنین 10 mg/kg نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار و در گروه تحت تیمار با دیوسجنین 50 mg/kg نسبت به گروه متوترکسات کاهش معنی‌دار داشت.

نتیجه‌گیری: دیوسجنین با دوز 50 mg/kg در مدل آسیب کبد القاء شده با متوترکسات توانست باعث بهبود سلامت میتوکندری و نیز کاهش انفیلتراسیون نوتروفیلی گردد.

واژه های کلیدی: کبد، متوترکسات، دیوسجنین، سلامت میتوکندری، انفیلتراسیون نوتروفیلی

دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۳۱
آخرین اصلاح‌ها: ۱۴۰۱/۰۴/۲۱
پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۲۹

مقدمه

کبد از جمله غدد ضمیمه دستگاه گوارش و بزرگ‌ترین غده در بدن است که صفرا را ساخته و ترشح می‌کند همچنین، اعمال مهم دیگری نظیر متابولیسم، سنتز برخی از مواد، ذخیره، دفع و شرکت در سیستم دفاعی بدن را نیز به عهده دارد (۱). کبد در تنظیم متابولیسم، سنتز پروتئین‌ها و سایر مولکول‌ها، ذخیره نمودن ویتامین‌ها و آهن، تجزیه‌ی هورمون‌ها، غیرفعال کردن داروها و توکسین‌ها و دفع آن‌ها نیز نقش مهمی دارد (۲). تحت برخی شرایط خاص، داروهایی که در کبد غیرفعال می‌شوند، می‌توانند موجب افزایش شبکهٔ آندوپلاسمیک صاف در هپاتوسیت‌ها و بدین ترتیب بهبود ظرفیت سم‌زدایی این اندام شوند (۳). کبد برخلاف سرعت کند بازسازی سلول‌های آن ظرفیت عجیبی برای ترمیم خود دارد. از دست رفتن بافت کبدی از طریق برداشت جراحی یا اثر مواد سمی، مکانیسمی را به راه می‌اندازد که منجر به تقسیم سلول‌های کبدی می‌شود و این مکانیسم تا جایی که توده اصلی بافت جایگزین شود، ادامه می‌یابد. بافت کبدی بازسازی‌شده معمولاً به‌طور کامل سازمان‌یافته (ارگانیزه) و دارای آرایش تیپیک لوبولی است و کارکردهای بافت تخریب‌شده را جبران می‌کند؛ اما هنگامی‌که صدمه مداوم و یا مکرر در یک دوره زمانی طولانی به هپاتوسیت‌ها وارد می‌شود، به دنبال تکثیر سلول‌های کبدی افزایش شدیدی در میزان بافت همبند ایجاد می‌شود. میتوکندری اندامکی است که نقش حیاتی در تنظیم ردوکس سلول کبدی، متابولیسم لیپیدها و مرگ سلولی دارد. اختلال عملکرد میتوکندری در بیماری‌های حاد و مزمن کبدی وجود دارد. مرگ هپاتوسلولاری تقریباً در همه انواع بیماری‌های کبدی انسان وجود دارد و به‌عنوان یک پارامتر حساس برای تشخیص بیماری حاد و مزمن کبدی از نوع ویروسی، سمی، متابولیکی یا خود ایمن در نظر گرفته می‌شود (٤). مرگ سلول‌های کبدی عامل اصلی پیشرفت بیماری کبدی ست که با توسعه بعدی التهاب، فیبروز، سیروز و سرطان سلول‌های کبدی آشکار می‌شود (۵). میلوپراکسیداز یک پروتئین لیزوزومی و بخشی از دفاع میزبان است. میلوپراکسیداز (MPO)[1] یک متالوپروتئین اساسی با وزن مولکولی ۱٤۰ کیلودالتون است که از دوزنجیره‌ی سنگین و سبک به وزن‌های ۵۵ و ۱۳/۵ کیلو دالتون تشکیل‌شده است. میلوپراکسیداز تنها عضوی از خانواده‌ی پراکسیداز-سیکلواکسیژناز است که به‌عنوان دایمر بالغ عمل می‌کند اما هر یک از همولوگ‌های میلوپراکسیداز ازنظر آنزیمی فعال است. محصولات تجمع یافته اکسیداتیو میلوپراکسیداز بسیار واکنشی هستند و در بافت‌های اطراف آزاد می‌شوند. این باعث اکسیداسیون بیشتر پروتئین‌ها و مولکول‌های کوچک می‌شود. پراکسیداسیون لیپید و لیپوپروتئین در محل‌های التهاب باواسطه‌های واکنش اکسیداسیون میلوپراکسیداز به‌خوبی شناخته‌شده است. میلوپراکسیداز ازنظر آنزیمی باعث ایجاد پراکسیدازها می‌شود و درنتیجه قدرت میکروب‌کشی را در درجه‌ی اول پاسخ ایمنی ذاتی، افزایش می‌دهد (٦). متوترکسات ازجمله داروهایی است که در شیمی‌درمانی علیه سرطان‌ها به کار می‌رود. متوترکسات از طریق چندین مکانیسم اثر دارویی که برایش پیشنهادشده روی سلول‌ها اثر می‌گذارد. (۷). مکانیسم دخیل در توکسیسیتهٔ ناشی از متوترکسات هنوز به طور کامل مشخص نشده با این حال برخی فرضیات مطرح است که مهم‌ترین آن‌ها آسیبی است که به واسطه‌ی رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شود که باعث کاهش پتانسیل غشاء میتوکندری نیز می‌شود (۸). استرس اکسیداتیو ناشی از متوترکسات باعث آسیب غشای لیپیدی سلول‌ها (۹) به ویژه هپاتوسیت‌ها می‌شود.

تجهیز کبد با آنتی‌اکسیدان اگزوژن یک روش مؤثر برای بازسازی تعادل اکسیداتیو/آنتی‌اکسیدان در هموئوستاز کبد است (۱۰). از طرفی استفاده از محصولات طبیعی، ازجمله ترکیبات استروئیدی نه‌تنها به‌عنوان عوامل فعال درمانی بلکه به‌عنوان ترکیبات پیشرو در مسیرهای کشف دارو روبه رشد بوده است (۱۱). دیوسجنین یک ساپوژنین استروئیدی شناخته شده است که از هیدرولیز ساپونین دیوسین و از چندین گیاه مانند Dioscuri، Trigon Ella، Costas و گونه‌های Smilax به دست می‌آید (۱۲). در حقیقت این ترکیب دارای خواص ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی شناخته شده است (۱۳) و می‌تواند به‌عنوان‌مثال در خون، اختلالات مغزی، بیماری‌های آلرژیک، دیابت و چاقی (۱۲)، علائم

[1] Myeloperoxidase

یائسگی و پیری پوست مفید باشد. همچنین در بیماری‌های قلبی و عروقی مانند ترومبوز و تصلب شرایین و از همه مهم‌تر در سرطان نیز نقش محافظتی داشته باشد (۱۱). با توجه به مجموعهٔ فوق، دیوسجنین احتمالاً با استفاده از خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی خود، کبد موش بزرگ آزمایشگاهی را دربرابر اثرات اکسیداتیو و التهابی سمی متوترکسات محافظت می‌کند ولی تاکنون اثرات حفاظتی دیوسجنین بر پتانسیل غشاء میتوکندری (MMP) و انفیلتراسیون نوتروفیلی در آسیب کبد القاء شده با متوترکسات بررسی نشده است.

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این پژوهش تعداد ٤٠ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر به وزن ۲۵۰–۲۰۰ گرم از مرکز مطالعات حیوانی دانشگاه شهید بهشتی تهیه گردید. موش‌ها به مدت ۲ هفته در مرکز مطالعات حیوانی دانشگاه شاهد با شرایط روشنایی و تاریکی طبیعی و دما و رطوبت استاندارد نگه‌داری شدند. در این بررسی حیوانات به‌طور تصادفی به ۵ گروه ۸ تایی شامل گروه‌های کنترل، کنترل تیمار شده با دیوسجنین، متوترکسات و ۲ گروه متوترکسات تیمار شده با دیوسجنین با دوزهای ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن (١٤) تقسیم شدند. متوترکسات با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن (۱۵) داخل صفاقی تزریق شد و یک روز قبل از تزریق به مدت ۲ هفته دیوسجنین به‌صورت خوراکی گاواژ شد. سپس با تزریق داخل صفاقی کتامین موش‌ها بی‌هوش شده و با رعایت مسائل اخلاقی و کشتن آن‌ها بافت کبد جهت تهیه‌ی هموژنهٔ بافتی جدا شد و در آخر کار سنجش پتانسیل غشاء میتوکندری (MMP) و انفیلتراسیون نوتروفیلی انجام شد.

تهیهٔ هموژنهٔ بافتی

هموژنهٔ بافتی کبد به میزان ۱۰ درصد در بافر تریس هیدروکلراید ۱۵۰ میلی مولار تهیه شد. مخلوط به‌دست‌آمده با استفاده از دستگاه هموژنیزه کننده سوسپانسیون شد. سوسپانسیون به‌دست‌آمده با حفظ زنجیره‌ی سرمایی به سانتریفیوژ یخچال‌دار منتقل شد و با دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و سپس سوپرناتانت حاصل به وسیله سمپلر از رسوبات جدا شده و به درون میکروتیوب انتقال داده شد (١٦).

سنجش شاخص انفیلتراسیون نوتروفیلی (MPO)

میلوپراکسیداز (MPO) یک پروتئین لیزوزومی و بخشی از سیستم دفاع بدن میزبان است. عملکرد آن به‌صورت فعالیت آنزیمی در پاسخ به عوامل بیماری‌زا در نظر گرفته می‌شود. در طول عفونت، خواص ضد باکتریایی و قارچ‌کش میلوپراکسیداز به پاک‌سازی عوامل بیماری‌زا در داخل فاگوزوم کمک می‌کند. این آنزیم قادر به کاتالیز کردن دو نوع واکنش‌های اکسیداسیون و کاهش چرخهٔ هالوژناسیون و چرخهٔ پراکسیداز است. میلوپراکسیداز ازنظر آنزیمی باعث ایجاد سوپراکسیدازها می‌شود و درنتیجه قدرت میکروب‌کشی را در درجه‌ی اول پاسخ ایمنی ذاتی افزایش می‌دهد. محققان پیشنهاد می‌کنند که علاوه بر عملکرد میکروب‌کشی، سیستم (MPO-H2O2-Halide) با تضعیف مکانیسم تشخیص گیرنده‌های سلول‌های فاگوسیتی (که باعث واکنش‌های التهابی و آسیب بافت می‌شود) پاسخ التهابی را تعدیل می‌کند (٦).

سنجش فعالیت میلوپراکسیداز به‌عنوان شاخصی از انفیلتراسیون نوتروفیلی شناخته می‌شود. در این روش از سوپرناتانت هموژنهٔ بافت کبد استفاده شد. در این روش هموژنه به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس نمونه‌ها را در اتاق تاریک با آب‌اکسیژنه و تترامتیل بنزیدین در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد در مدت ۵ دقیقه مخلوط شد. سپس برای اتمام واکنش، به محلول‌ها H2SO4)) اضافه شد و در اسپکتروفتومتر میزان جذب آن را در طول‌موج ٤٥٠ نانومتر خوانده شد (١٦).

سنجش پتانسیل غشای میتوکندری (MMP)

ازآنجایی‌که میتوکندری یکی از اندامک‌های درگیر در آپوپتوز است، پتانسیل غشای میتوکندری به‌عنوان یک شاخص سلامت میتوکندری سنجیده می‌شود. در این پژوهش از روش رنگ آمیزی رودامین ۱۲۳ برای سنجش پتانسیل غشای میتوکندری استفاده شد. به این صورت که ۱۵۰ میکرولیتر نمونهٔ هموژنه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس از روی نمونهٔ سانتریفیوژ شده ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شد و به باقی‌مانده‌ی آن‌ها ۱۸۰

میکرولیتر محلول بافر فسفات افزوده شد. محلول به دست‌آمده به خوبی مخلوط شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن‌ها جدا شد و ۲۰ میکرولیتر رودامین ۱۲۳ در محیط تاریک در میکروپلیت مخصوص به آن افزوده شد، سپس نمونه‌های حاصل درمدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد و در طول موج ٤٨٨ نانومتر تحریک و در ٥٢٠ نانومتر جذب نوری آن خوانده شد (۱۷).

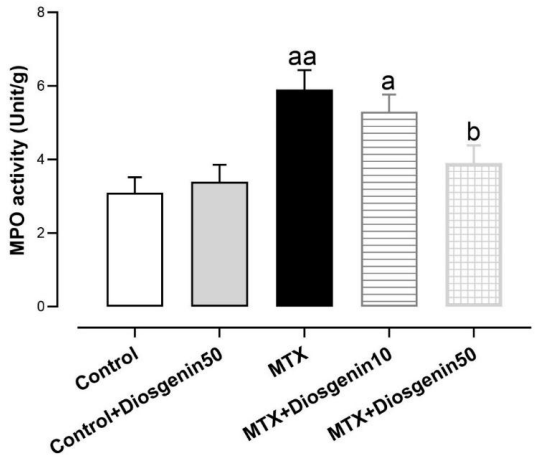
تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های جمع‌آوری‌شده به کمک نرم‌افزار آماری (Graph pad prism 0.8) تجزیه و تحلیل شدند. تمامی داده‌ها به‌صورت Mean±SEM گزارش‌شده‌اند. از آزمون Kolmogorov-Smirnov برای اطمینان از توزیع نرمال داده‌ها استفاده شد. سپس از آزمون ANOVA یک‌طرفه و به دنبال آن از آزمون Tukey استفاده شد. در این مطالعه ($P<0.05$) به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

سنجش میلوپراکسیداز

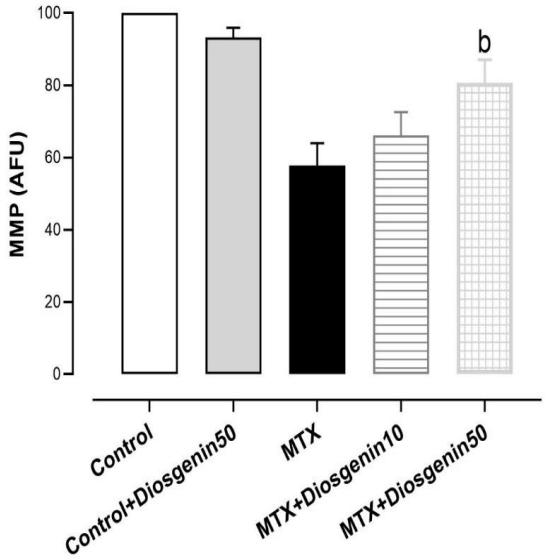
با اندازه‌گیری میزان میلوپراکسیداز به‌عنوان شاخص معتبر انفیلتراسیون نوتروفیلی در بافت کبد در گروه‌های مختلف مشخص شد که در گروه متوترکسات یک افزایش معنی‌دار میلوپراکسیداز در مقایسه با گروه کنترل اتفاق می‌افتد ($P<0.01$). به‌علاوه همین افزایش معنی‌دار میلوپراکسیداز دربافت کبد گروه درمان شده با دیوسجنین به میزان دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به گروه کنترل در حد کمتر به دست آمد ($p<0.05$). همچنین افزایش میلوپراکسیداز در گروه درمان شده با دیوسجنین به میزان دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به گروه کنترل رخ داد ولی معنی‌دار نبود ($P>0.05$). از طرف دیگر می‌توان گفت میلوپراکسیداز در گروه درمان شده با دیوسجنین به میزان دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن یک کاهش تا حدی معنی‌دار در مقایسه با گروه متوترکسات نشان داد ($P<0.05$) که این نشان‌دهنده‌ی کاهش انفیلتراسیون نوتروفیلی توسط دیوسجنین با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن است. به‌علاوه در گروه کنترل دریافت‌کننده‌ی دیوسجنین به میزان دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن میزان میلوپراکسیداز در مقایسه با گروه کنترل افزایش داشت ولی معنی‌دار نبود ($P>0.05$). (نمودار ۱).



نمودار ۱. بررسی مقادیر میلوپراکسیداز در گروه‌های موردمطالعه
a = $P<0.05$ مقایسه با گروه کنترل، aa = $P<0.01$ مقایسه با گروه کنترل، b = $P<0.01$ مقایسه با گروه متوترکسات بر اساس آزمون تعقیبی توکی
میلوپراکسیداز یا (MPO) شاخص انفیلتراسیون نوتروفیلی است. واحد اندازه‌گیری آن واحد بر گرم است. برای القاء آسیب در کبد موش بزرگ آزمایشگاهی از متوترکسات (MTX) با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و برای درمان آن از دیوسجنین با دوزهای ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن استفاده شد.

سنجش پتانسیل غشای میتوکندری

با اندازه‌گیری میزان پتانسیل غشای میتوکندری به‌عنوان شاخص معتبر سلامت میتوکندری در بافت کبد در گروه‌های مختلف مشخص شد که در گروه متوترکسات کاهش پتانسیل غشاء میتوکندری در مقایسه با گروه کنترل به‌طور قابل‌توجهی کاهش معنی‌دار داشت ($p<0.001$). همین کاهش در گروه درمان شده با دیوسجنین ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در مقایسه با گروه کنترل با معنی‌داری کمتری به دست آمد ($P<0.01$)؛ اما در گروه درمان شده با دیوسجنین ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به کنترل کاهش معنی‌دار به دست نیامد ($P>0.05$). از طرف دیگر می‌توان گفت پتانسیل غشاء میتوکندری در گروه متوترکسات دریافت‌کنندهٔ دیوسجنین به میزان دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن یک افزایش تا حدی معنی‌دار در مقایسه با گروه متوترکسات نشان داد ($P<0.05$) که این نشان‌دهندهٔ آن است که دیوسجنین ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در حفظ سلامت میتوکندری مؤثر است. به‌علاوه در گروه درمان شده با دیوسجنین ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه متوترکسات افزایش معنی‌دار مشاهده نشد ($P>0.05$) (نمودار ۲).



نمودار ۲. بررسی مقادیر پتانسیل غشاء میتوکندری در گروه‌های مورد مطالعه در این نمودار چون گروه کنترل را ازنظر پتانسیل غشاء میتوکندری ۱۰۰ در نظر گرفته شد و همچنین برای این گروه انحراف معیار در نظر گرفته نشد برای هیچ‌کدام از گروه‌ها نسبت به کنترل علامت معنی‌داری ثبت نشده ولی درواقع برای گروه متوترکسات نسبت به کنترل کاهش معنی‌دار (**$P<0.001$**)، گروه درمان شده با دیوسجنین ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به کنترل کاهش معنی‌دار (**$p<0.01$**)، گروه درمان شده با دیوسجنین ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به متوترکسات افزایش معنی‌دار (**$p<0.05$**)، همین گروه نسبت به کنترل عدم کاهش معنی‌داری (**$p>0.05$**) و همچنین در گروه درمان شده با دیوسجنین ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به گروه متوترکسات عدم افزایش معنی‌داری در نظر گرفته شد. برای القاء آسیب از متوترکسات ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و برای درمان از دیوسجنین با دوزهای ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن استفاده شد.

بحث

متوترکسات که یک ماده‌ی ضد متابولیکی است و بر متابولیسم اسیدفولیک اثر می‌گذارد، در سال ۱۹٤۸ به‌عنوان یک داروی ضد سرطان وارد طب بالینی شد. این دارو به خاطر اثرات ضد سرطانی که دارد باعث سمیت سلول و آپوپتوز می‌شود و نیز تغییراتی در میزان شاخص‌های التهابی و استرس اکسیداتیو ایجاد می‌کند (۷). متوترکسات ازجمله داروهایی است که در شیمی‌درمانی علیه سرطان‌ها به کار می‌رود. متوترکسات از طریق چندین مکانیسم اثر دارویی که برایش پیشنهاد شده روی سلول‌ها اثر می‌گذارد. مکانیسم دخیل در توکسیسیتهٔ ناشی از متوترکسات هنوز به‌طور کامل مشخص نشده با این‌حال برخی فرضیات مطرح است که مهم‌ترین آن‌ها آسیبی است که به واسطهٔ رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شود (۸). این دارو از طریق یک ناقل اشباع وارد سلول می‌شود سپس به فرم حامل فولات ۱ (**RFC1**) کاهش می‌یابد و به وسیله‌ی آنزیم فولی‌پلی‌گلوتامات‌سنتاز (**FPGS**) به متوترکسات گلوتامات (**MTX glu**) تبدیل می‌شود. متوترکسات گلوتامات با تجمع داخل سلول باعث مهار یک آنزیم قوی در سنتز پورین‌های جدید می‌شود که آمینوایمیدازیل کربوکسامید ریبونوکلئوتید ترانسفرمیلاز (**AICAR T`ASE**) نام دارد. این مهار باعث تجمع آنزیم فوق در داخل سلول شده که در مهار رقابتی با **AMP** دآمیناز منجر به تجمع **AMP** درون سلول می‌شود.**AMP** در خارج سلول رهاشده و به آدنوزین که همان نوکلئوزید پورین اگزوژن است تبدیل می‌شود. متوترکسات با اثر بر روی گیرنده‌های خود باعث ترشح آدنوزین در مدل‌های حیوانی التهاب و در بیماران مبتلابه **RA** [1] می‌شود، بنابراین یک مهارکننده‌ی قوی التهاب است. اما در دوزهای بالا

[1] Rheumatoid Arthritis

خود باعث التهاب می‌شود. مکانیسم اثر آن بر تکثیر سلول و آپوپتوز به گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (**ROS**) بستگی دارد. سطوح بالاتر (**ROS**) در لنفوسیت‌های فعال یافت می‌شود و ممکن است آپوپتوز را القاء کند ضمن این‌که در مونوسیت‌ها مهار تکثیر سلول دیده می‌شود.

متوترکسات آنالوگ و آنتاگونیست اسید فولیک است و بااتصال به آنزیم دی هیدروفولات ردوکتاز از تبدیل دی هیدروفولات به تتراهیدروفولات می‌کاهد. اسیدفولیک در سنتز و همانندسازی سلولی دخالت دارد و توسط آنزیم دی هیدروفولات ردوکتاز به تترا هیدروفولات کاهش می‌یابد بنابراین متوترکسات ردوکتاز را مهار می‌کند و در ترمیم **DNA** و سنتز و همانندسازی سلولی تداخل ایجاد می‌کند. این دارو همچنین واکنش‌های ترانس متیلاسیون موردنیاز برای التهاب را مهار می‌کند (۱۰). استرس اکسیداتیو ناشی از متوترکسات باعث آسیب غشای لیپیدی سلول‌ها می‌شود (۹).

در مطالعه‌ای بررسی اثر فرولیک اسید بر کبد القاء شده با متوترکسات انجام شده و گزارش شده است که تجویز متوترکسات باعث نفوذ سلول‌های التهابی، خونریزی و تغییر ترانس آمینازهای سلولی شد (۱۸). همچنین در مطالعه‌ای بهبود عملکرد کبد، التهاب و استرس اکسیداتیودر اثر تجویز فرولیک اسید پس از مصرف متوترکسات بررسی شده و نتیجه به صورت تجمع سلول‌های التهابی و گلبول‌های قرمز در کبد گزارش شده است (۱۹). به‌علاوه اثر حفاظتی **Infliximab** را بر روی ریهٔ آسیب‌دیده از متوترکسات بررسی و گزارش شده است که متوترکسات باعث مسمومیت ریوی مربوط به تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سایتوکاین‌های مختلف شد. بنابراین شاخص‌های استرس اکسیداتیو و میلوپراکسیداز تا حد قابل‌توجهی در گروه متوترکسات افزایش یافت و باعث آسیب ریه شد (۲۰).

در همین راستا در مطالعه‌ای اثر محافظتی عصاره‌ی داروی **Mistletoe** دربرابر استرس اکسیداتیو حاد و نفروتوکسی سیتی[1] ناشی از متوترکسات در موش بزرگ آزمایشگاهی بررسی شده است. متوترکسات باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و سمیت کلیوی در موش شد و میزان میلوپراکسیداز را تا حد قابل‌توجهی افزود (۲۱) که این نتیجه از مطالعه ما پشتیبانی می کند. همچنین در مطالعه‌ای اثرات نامطلوب متوترکسات بر بافت بیضه و اثر حفاظتی آپوسینین بر بافت بیضه‌ی آسیب‌دیده با متوترکسات ارزیابی شد و نشان داده شد که تعداد سلول‌های آپوپتوز در مقایسه با گروه کنترل، افزایش معنی‌دار داشت (۲۲).

افزون بر این در مطالعه‌ای که عوامل حفاظتی لیزوزومی و میتوکندریایی سمیت سلول و استرس اکسیداتیو القاء شده با سیکلوفسفامايد و متوترکسات در لنفوسیت‌های خون انسان بررسی شده است مشخص شد که این دارو به‌طور قابل‌توجهی باعث کاهش میزان زنده‌بودن سلول گردید. علاوه بر آن باعث تشکیل (**ROS**) و فروپاشی پتانسیل غشاء میتوکندری، آسیب غشاء لیزوزومی، پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش (**GSH**)[2] نسبت به گروه کنترل شد (۲۳). از سویی مطالعه‌ی انجام شده بر روی اثر ضد تکثیری متوترکسات برای بررسی شاخص مرگ سلولی در سلول‌های تخمدانی **SKVO-3** در طول درمان با متوترکسات نشان داد که مصرف این دارو باعث تولید گونه‌های اکسیژن فعال (**ROS**) و تخریب **DNA** و تغییر پتانسیل غشاء میتوکندری همراه با تنظیم ژن آپوپتوز گردید (۲٤) .

در مطالعه‌ی اخیراز متوترکسات با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن برای القاء آسیب کبدی استفاده شد. همچنین اثر حفاظتی دیوسجنین بر میزان انفیلتراسیون نوتروفیلی و پتانسیل غشاء میتوکندری در آسیب کبد القاء شده با متوترکسات در گروه‌های مورد مطالعه بررسی شد.برای جلوگیری از اثرات مضر و مخرب متوترکسات می‌توان به‌طور هم‌زمان از یک ماده محافظتی نظیر دیوسجنین استفاده کرد (۱۲). در مطالعه‌ی اخیردیوسجنین با دو دوز ۱۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در دو گروه القاء شده با متوترکسات استفاده شد. دیوسجنین باعث کاهش شاخص انفیلتراسیون نوتروفیلی و نیز افزایش شاخص پتانسیل غشاء میتوکندری گردید.

دیوسجنین یک ساپونین استروئیدی است که در حبوبات، سیب‌زمینی هندی، دانه‌های زغال‌اخته و گیاه شنبلیله یافت می‌شود. یک ضدالتهاب، ضد دیابت، ضد تومور، میانجی

[1] Nephrotoxicity

[2] Glutathione

گر ایمنی، محافظ عصب وابسته به استروژن، گشادکنندهٔ عروق و محافظ پوست قوی است. همچنین محتوای چربی خون را کاهش می‌دهد. به‌علاوه دیوسجنین اثرات فارماکولوژیکی متعددی از خود به‌جا گذاشته است. در تحقیقاتی که قبلا انجام شده مشخص شد که دیوسجنین در سرطان پروستات با افزایش آپوپتوز و اتوفاژی از طریق مهار مسیر **PI3K/AKT/M tor** مؤثر بود. در مغز موجب بهبود یادگیری و توانائی‌های حافظه گردید. در سرطان‌های پستان، ریه و کولون اثر ضد تکثیری داشت. در یک بررسی در مغز موش آسیب‌دیده با دی گالاکتوز آمین مشخص شد که اثر افزایش حافظه دیوسجنین تا حدی از طریق افزایش فعالیت‌های آنزیماتیک آنتی‌اکسیدانی اندوژنز میانجی‌گری شد. دیوسجنین در بررسی دیگری باعث بهبود دیابت حاملگی شد و اثر خود را با کاهش قند خون ناشتا، افزایش سطح انسولین و گلیکوژن کبد نشان داد. همچنین استرس اکسیداتیو در موش‌های حامله‌ی دیابتی را مهار کرده و سطح گلوتاتیون و (**SOD**) و کاتالاز را افزایش داد (۲۵).

به علاوه در مطالعه‌ای نقش حفاظتی دیوسجنین در آسیب مخاط معده ناشی از **HCL** اتانول در موش بزرگ آزمایشگاهی بررسی شد و معلوم شد که دیوسجنین با نقش آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی خود باعث سرکوب فعالیت میلوپراکسیداز شده و در آسیب معده ناشی از **HCL** نقش حفاظتی داشت (۲٦). همچنین گزارش شده که در مطالعه‌ای اثر محافظتی دیوسجنین دربرابر آسیب بیضه ناشی از دیابت در موش بزرگ آزمایشگاهی بررسی شد. برای دیابتی کردن موش‌ها از استرپتوزوتوسین استفاده شد که ۱۰ روز پس از تجویز استرپتوزوتوسین روزانه به مدت ٦ هفته دیوسجنین مصرف شد. سپس نشان‌گرهای التهاب بافت بیضه (**TNF-a,IL-6**) و نیز نشان‌گرهای آپوپتوز (کاسپاز ۳، آنکسین ۷، تکه‌تکه شدن **DNA**) سنجش شدند. پتانسیل غشاء میتوکندری بهبود یافته و میلوپراکسیداز نیز به‌عنوان نشان‌گر زیستی نفوذ نوتروفیل‌ها کاهش یافت (۱٦) که نتایج به دست آمده در این تحقیق از نتایج کار ما پشتیبانی می کند.

مطالعات انجام شده در قبل نشان داده است که رژیم آتروژنیک و پرچرب باعث التهاب کبد شد. در این مورد مصرف دیوسجنین باعث سرکوب واسطه‌های التهابی شده، بیان (**TNFα**) تنظیم شد. به‌این‌ترتیب از پیشرفت بیماری آترواسکلروزیس در کبد جلوگیری شد (۲٤)همچنین مصرف دیوسجنین در بیماری کبد چرب غیرالکلی مانع از تجمع تری گلیسرید ناشی از گلوکز بالا شد. به‌علاوه رسوب چربی در کبد کم شده، سطح (**AST**) و (**ALT**) کاهش یافت. بنابراین از توسعه کبد چرب غیرالکلی جلوگیری شد (۲۵). به‌علاوه دیوسجنین با افزایش(**SOD**) باعث بهبود عملکرد کبد آسیب‌دیده با **LPS** شد (۲۷)

در این پژوهش اثر ضدالتهابی دیوسجنین و تأثیر آن بر میزان پتانسیل غشاء میتوکندری به‌عنوان شاخص سلامت میتوکندری و میلوپراکسیداز به‌عنوان شاخص انفیلتراسیون نوتروفیلی در کبد آسیب‌دیده از متوترکسات بررسی شد. متوترکسات با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن میزان میلوپراکسیداز را تا حد معنی‌داری افزایش داد و نیز باعث کاهش معنی‌دار میزان پتانسیل غشاء میتوکندری نسبت به گروه کنترل شد. همان طور که پیشتر ذکر شد دیوسجنین در دو دوز مختلف ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن مصرف شد و با دوز بالاتر کاهش معنی‌دار بیشتری در میزان میلوپراکسیداز (نمودار ۱) نسبت به گروه متوترکسات ایجاد کرد و همچنین باعث افزایش پتانسیل غشای میتوکندری در گروه درمان شده با دیوسجنین ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به گروه متوترکسات شد (نمودار ۲).

نتیجه گیری

با توجه به بررسی‌های انجام‌شده در زمینه‌ی اثرات داروی دیوسجنین در حفاظت از کبد القاء شده با متوترکسات و نتایج حاصل از این بررسی، مشخص شد که دیوسجنین با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مدل آسیب کبد القاء شده با متوترکسات توانست باعث بهبود پتانسیل غشای میتوکندری شود. همچنین در راستای کاهش التهاب توانست میزان انفیلتراسیون نوتروفیلی را کاهش دهد. پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آتی بررسی میزان تأثیرگذاری دیوسجنین در فرآیندهای درمانی متوترکسات، همچنین بررسی چگونگی تأثیر دوزهای مختلف دیوسجنین با سایر ترکیبات انجام شود.

ملاحظات اخلاقی

در این پژوهش مجوز کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی از طرف معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شاهد با شناسه IR.SHAHED.REC.1400.006 دریافت شد.

تعارض منافع

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

منابع

1. Williams PL. Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical PracticeGray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice. 42th ed 2021 2021.
2. Snell MD, S R. Clinical Anatomy for Medical Students. 5th ed: Little Brown & Co; 1995.
3. L G. Textbook of Histology. 5th ed. Cannada: Deepthi Unni; 2021 20th November 2015; 443.
4. Chao X, Wang H, Jaeschke H, Ding WX. Role and mechanisms of autophagy in acetaminophen-induced liver injury. Liver International. 2018;38(8):1363-74.
5. Luedde T, Kaplowitz N, Schwabe RF. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance. Gastroenterology 2014;147(4):765-83. e4.
6. Kargapolova Y, Geißen S, Zheng R, Baldus S, Winkels H, Adam M. The Enzymatic and Non-Enzymatic Function of Myeloperoxidase (MPO) in Inflammatory Communication. Antioxidants 2021;10(4):562.
7. Schafranski M, Merlini A, Araújo E, Camargo N, Arruda P. Methotrexate: Update on Pharmaclology. Clinical Applications and Warmings 2012.
8. Uzar E, Koyuncuoglu HR, Uz E, Yilmaz HR, Kutluhan S, Kilbas S, et al. The activities of antioxidant enzymes and the level of malondialdehyde in cerebellum of rats subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. Molecular and Cellular Biochemistry 2006;291(1):63-8.
9. Vardi N, Parlakpinar H, Ozturk F, Ates B, Gul M, Cetin A, et al. Potent protective effect of apricot and β-carotene on methotrexate-induced intestinal oxidative damage in rats. Food and Chemical Toxicology 2008;46(9):3015-22.
10. Li S, Li H, Xu X, Saw PE, Zhang L. Nanocarrier-mediated antioxidant delivery for liver diseases. Theranostics 2020;10(3):1262.
11. Jesus M, Martins AP, Gallardo E, Silvestre S. Diosgenin: recent highlights on pharmacology and analytical methodology. Journal of Analytical Methods in Chemistry 2016.
12. Chen Y, Xu X, Zhang Y, Liu K, Huang F, Liu B, et al. Diosgenin regulates adipokine expression in perivascular adipose tissue and ameliorates endothelial dysfunction via regulation of AMPK. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 2016;155:155-65.
13. Khan H, Saeed M, Rauf A, Khan MA, Muhammad N. Antimicrobial and inhibition on heat-induced protein denaturation of constituents isolated from Polygonatum verticillatum rhizomes. Natural Product Research 2015;29(22):2160-3.

14. Mohamadi-Zarch S-M, Baluchnejadmojarad T, Nourabadi D, Khanizadeh AM, Roghani M. Protective effect of diosgenin on LPS/D-Gal-induced acute liver failure in C57BL/6 mice. Microbial Pathogenesis 2020;146:104243.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Mahmoud AM, Hussein OE, Hozayen WG, Bin-Jumah M, Abd El-Twab SM. Ferulic acid prevents oxidative stress, inflammation, and liver injury via upregulation of Nrf2/HO-1 signaling in methotrexate-induced rats. Environmental Science and Pollution Research 2020;27(8):7910-21.
19. Roghani M, Kalantari H, Khodayar MJ, Khorsandi L, Kalantar M, Goudarzi M, et al. Alleviation of Liver Dysfunction, Oxidative Stress and Inflammation Underlies the Protective Effect of Ferulic Acid in Methotrexate-Induced Hepatotoxicity. rug Design, Development and Therapy 2020;14:1933-41.
20. Kurt A, Tumkaya L, Turut H, Cure MC, Cure E, Kalkan Y, et al. Efectos protectores de infliximab sobre el daño pulmonar inducido por metotrexato. Archivos de Bronconeumología 2015;51(11):551-7.
21. Çetin ES, Tetiker H, Çelik Öİ, Yılmaz N, Ciğerci İH. Methotrexate-induced nephrotoxicity in rats: protective effect of mistletoe (Viscum album L.) extract. Complementary Medicine Research 2017;24(6):364-70.
22. 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.
23. Salimi A, Pirhadi R, Jamali Z, Ramazani M, Yousefsani B, Pourahmad J. Mitochondrial and lysosomal protective agents ameliorate cytotoxicity and oxidative stress induced by cyclophosphamide and methotrexate in human blood lymphocytes. Human & Experimental Toxicology 2019;38(11):1266-74.
24. AlBasher G, AlKahtane AA, Saud Alarifi DA, Alessia MS, Almeer RS, Abdel-Daim MM, et al. Methotrexate-induced apoptosis in human ovarian adenocarcinoma SKOV-3 cells via ROS-mediated bax/bcl-2-cyt-c release cascading. OncoTargets and Therapy 2019;12:21.
25. Sanjeev S, Devi MS, Maurya K, Roy V, Gurusubramanian G, editors. Diosgenin: Therapeutic Action, Pharmacology and Applications 2017.
26. Zhao H, Zhang X, Zhang B, Qu X. Gastroprotective effects of diosgenin against HCl/ethanol-induced gastric mucosal injury through suppression of NF-$\kappa\ \beta$ and myeloperoxidase activities. Open Life Sciences 2021;16(1):719-27.
27. Binesh A, Devaraj SN, Halagowder D. Atherogenic diet induced lipid accumulation induced NFκB level in heart, liver and brain of Wistar rat and diosgenin as an anti-inflammatory agent. Life sciences 2018;196:28-37.