

The Protective Effects of Quercetin on Paraquat-Induced Ovarian Toxicity in Female Wistar Rats

Parisa Saberi-Hasanabadi¹

Alireza Naeji²

Hamidreza Mohammadi³

¹ PhD in Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Doctor of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received February 17, 2024; Accepted June 23, 2024)

Abstract

Background and purpose: Paraquat is one of the chemical herbicides with high toxicity. In case of incorrect consumption, this chemical causes fatal poisoning in people, especially those active in the field of agriculture. Nowadays, using compounds of natural origin to improve or reduce the harmful effects of agricultural pesticides is one of the important issues that has attracted the attention of researchers in this field. Quercetin as a natural flavonoid is found in large quantities in fruits and vegetables. As a kind of natural antioxidant, this compound has great power in removing free radicals. The purpose of this research was to evaluate the protective effects of quercetin on ovarian toxicity caused by paraquat in rats.

Materials and methods: To conduct this experimental research, 30 adult Wistar rats with an average age of 6 to 8 months and a weight range of 160 to 180 gr were randomly divided into 5 experimental groups including 6 rats in each group. Paraquat (1.25 mg/kg, intraperitoneally) was injected into mice. Then quercetin was injected intraperitoneally in concentrations of 50, 100, and 200 mg/kg. The negative control group received only normal saline. After 24 hours, the animals were sacrificed and their ovaries were evaluated for changes in oxidative stress indices.

Results: The results showed that paraquat significantly increased the reactive oxygen species (ROS), protein carbonyl, and lipid peroxidation, and significantly decreased glutathione content and survival of ovarian tissue cells when compared with the control group ($P < 0.001$). The results showed that different concentrations of quercetin could inhibit the lipid peroxidation reaction caused by paraquat toxicity, and the positive control group had a statistically significant difference compared to the negative control group ($P < 0.001$). By administering quercetin in different concentrations, we saw a decrease in the production of lipid peroxidation. From a statistical point of view, quercetin at the concentration (mg/kg) of 50 had a significant difference with the positive control group ($P < 0.01$) and this significant difference was also evident at the concentrations of (mg/kg) 100 and 200 ($P < 0.0001$). Increasing the concentration of quercetin was associated with improved performance in inhibiting paraquat toxicity.

Conclusion: Results showed that quercetin can be useful as an effective antioxidant combination in improving oxidative stress indicators and ovarian tissue of mice. Quercetin can reduce paraquat-induced oxidative damage in rat ovarian tissues in a dose-dependent manner. Quercetin can potentially be used to control ovarian toxicity, modulate or inhibit oxidative factors, strengthen the immune system, and strengthen the antioxidant system in animal models. Probably, it can be used as a kind of safe supplement in combination with other drugs affecting the immune system. However, this hypothesis along with the effect of other drug interactions should be confirmed using appropriate *in vivo* studies. Understanding the process of cell death caused by paraquat and the inhibitory effect of natural antioxidants on it provides a new road map for future studies to develop new therapeutic strategies.

Keywords: Paraquat, Quercetin, toxicity, ovary, Oxidative stress indexes

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 34 (234): 22-33 (Persian).

Corresponding Author: Hamidreza Mohammadi - Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: hmohammadi@farabi.tums.ac.ir)

بررسی اثرات محافظتی کوئرستین بر سمیت تخمدان ناشی از پاراکوات در موش‌های صحرایی نژاد ویستار

پریسا صابری حسن آبادی^۱

علیرضا نائیجی^۲

حمیدرضا محمدی^۳

چکیده

سابقه و هدف: پاراکوات از جمله علف کش‌های شیمیایی بوده که سمیت بالایی داشته و در صورت مصرف نادرست یا عدم آگاهی در نحوه استفاده باعث مسمومیت کشنده در افراد در معرض این سم، به ویژه فعالان در حوزه کشاورزی می‌شود. امروزه استفاده از ترکیباتی با منشأ طبیعی به منظور بهبود و یا کاهش اثرات مخرب سموم کشاورزی از مسائل مهمی به‌شمار می‌رود که توجه محققان را در این حوزه به خود جلب نموده است. کوئرستین به‌عنوان فلاونوئیدی طبیعی به مقدار زیاد در میوه‌ها و سبزیجات یافت می‌شود. این ترکیب به‌عنوان نوعی آنتی اکسیدان طبیعی از قدرت زیادی در حذف رادیکال‌های آزاد برخوردار است. مطالعه حاضر، با هدف ارزیابی اثرات محافظتی کوئرستین بر سمیت تخمدان ناشی از پاراکوات در موش‌های صحرایی، انجام پذیرفت. **مواد و روش‌ها:** جهت انجام این پژوهش تجربی، ۳۰ موش بالغ صحرایی نژاد ویستار با میانگین سنی ۶ تا ۸ ماه و با محدوده وزنی ۱۶۰ تا ۱۸۰ گرم به طور تصادفی به ۵ گروه آزمایشی شامل ۶ عدد موش در هر گروه تقسیم شدند. گروه کنترل مثبت فقط سم پاراکوات (به میزان ۱/۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم) و گروه کنترل منفی نرمال سالین دریافت کردند. کوئرستین در دوزهای مختلف (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی به حیوانات دچار سمیت حاد تزریق شد. بعد از ۲۴ ساعت، حیوانات قربانی شده و تخمدان آن‌ها بیرون آورده شد. پس از شستشو، مراحل تعیین شاخص‌های استرس اکسیداتیو در گروه‌ها صورت گرفت.

یافته‌ها: موش‌های تحت تیمار با تمامی غلظت‌های کوئرستین شامل ۵۰ (P<۰/۰۱)، ۱۰۰ (P<۰/۰۰۱) و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم (P<۰/۰۰۱) اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل مثبت داشتند. با افزایش غلظت کوئرستین، بهبود عملکرد مهار سمیت پاراکوات در این دسته از حیوانات مشاهده گردید. نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف کوئرستین توانایی مهار واکنش پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از سمیت پاراکوات را داشته و گروه کنترل مثبت از لحاظ آماری در مقایسه با گروه کنترل منفی دارای اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱). با تجویز کوئرستین در غلظت‌های مختلف، کاهش تولید لیپید پراکسیداسیون مشاهده شد. از لحاظ آماری، کوئرستین در غلظت ۵۰ (mg/kg) دارای اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل مثبت بود (P<۰/۰۱) و در غلظت‌های ۱۰۰ (mg/kg) و ۲۰۰ نیز این اختلاف معنی‌داری مشهود بود (P<۰/۰۰۱). در غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از کوئرستین، بیش‌ترین اثرگذاری در کاهش تولید لیپید پراکسیداسیون مشاهده گردید.

استنتاج: نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد که کوئرستین می‌تواند به‌عنوان ترکیبی مؤثر و آنتی‌اکسیدانی مفید در بهبود شاخص‌های استرس اکسیداتیو و بافت تخمدان موش مفید واقع شود. کوئرستین به‌صورت وابسته به دوز می‌تواند آسیب اکسیداتیو ناشی از پاراکوات را در بافت‌های تخمدان موش کاهش دهد. کوئرستین به‌طور بالقوه می‌تواند جهت کنترل سمیت تخمدان، تعدیل و یا مهار عوامل اکسیداتیو، تقویت سیستم ایمنی و تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی در مدل‌های حیوانی استفاده شود. احتمالاً می‌توان از آن به‌عنوان نوعی مکمل بی‌خطر در ترکیب با سایر داروهای تأثیرگذار بر سیستم ایمنی استفاده کرد. با این حال، این فرضیه همراه با اثر سایر تداخلات دارویی باید با استفاده از مطالعات *in vivo* مناسبی تأیید شود. درک فرآیند مرگ سلولی ناشی از پاراکوات و اثر مهارکنندگی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بر آن، نقشه راه جدیدی را برای مطالعات آتی به منظور توسعه استراتژی‌های درمانی جدید ارائه می‌کند.

واژه‌های کلیدی: پاراکوات، کوئرستین، سمیت، تخمدان، شاخص‌های استرس اکسیداتیو

مؤلف مسئول: حمیدرضا محمدی - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی

۱. دکتری تخصصی سم شناسی، دانشکده داروسازی، کمیته تحقیقات و فناوری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. دکتر داروساز، دانشکده داروسازی، کمیته تحقیقات و فناوری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۲۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۱/۱۸ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۴/۳

مقدمه

مسمومیت با علف کش ها و دیگر ترکیبات شیمیایی مورد استفاده در حوزه کشاورزی به عنوان یکی از مشکلات بزرگ سیستم سلامت در سطح جهان مطرح است. سالیانه در حدود ۲ میلیون مسمومیت منجر به بستری و ۲۰۰۰۰ مرگ در اثر استفاده ناآگاهانه از سموم کشاورزی گزارش می شود (۱). دسته ای از علف کش ها مثل پاراکوات (با نام تجاری گراماکسون) و فرمول شیمیایی ۱، ۱-دی متیل-۴-۴-بای پیریدیلیوم دی کلرید با مکانیسم تأخیری مبتنی بر چرخه ردوکس و ایجاد استرس اکسیداتیو درون سلولی موجب بروز سمیت مرگبار در انسان و حیوانات می شوند. مسیر اصلی ورود این سم به بدن از طریق دهان و دستگاه گوارش به صورت عمدی و یا تصادفی است. هر چند که آلودگی به این سم از طریق پوست و مجاری تنفسی هم به دفعات گزارش شده است. جذب پاراکوات از طریق دستگاه گوارش ظرف ۲ ساعت پس از هضم اتفاق می افتد (۲). مکانیسم کامل سمیت سلولی پاراکوات مبهم است. این احتمال مطرح است که پاراکوات نوعی محرک قوی در شکل گیری آنیون های سوپراکسید باشد. این رادیکال ها به شدت سمی بوده و به سهولت با درشت مولکول های زیستی بدن جانداران ترکیب شده و منجر به آسیب شدید به ارگان های مختلف می شود. عملکرد سیستم ایمنی می تواند توسط مواد شیمیایی مختلفی چون آفت کش ها مختل شود (۳). مطالعات تجربی بسیاری به ارزیابی اثر سمی پاراکوات و نارسایی در عملکرد ارگان های چون کبد، کلیه، ریه و سیستم اعصاب مرکزی پرداخته اند. مطالعات قبلی هم چنین نشان داده که میتوکندری مهم ترین بافت هدف سمیت پاراکوات در سلول بوده و این سم از طریق آسیب به میتوکندری باعث تشدید استرس اکسیداتیو و شروع مسیر مرگ سلولی شود (۴-۶). در یک مطالعه، Sun و همکاران (۲۰۲۱) اظهار داشتند که پاراکوات باعث کاهش قدرت باروری موش ماده بواسطه اختلال در بلوغ تخمک در طی ۲۱ روز پس از

مواجهه با این سم شد. مواجهه با سم پاراکوات سبب اختلال در عملکرد میتوکندری و افزایش سطح گونه های اکسیژن فعال و آپوپتوز اولیه شد. در نتیجه، این محققین کاهش رشد اولیه جنین را در موش های مورد مطالعه گزارش کردند (۷). امروزه استفاده از ترکیباتی با منشأ طبیعی به منظور بهبود و یا کاهش اثرات مخرب سموم کشاورزی از مسائل مهمی بشمار می رود که توجه محققان را در این حوزه به خود جلب نموده است. کوئرستین به عنوان فلاونوئیدی طبیعی به مقدار زیاد در میوه ها و سبزیجات یافت می شود. این ترکیب به عنوان نوعی آنتی اکسیدان طبیعی از قدرت زیادی در حذف رادیکال های آزاد برخوردار است (۸). در یک مطالعه، Saberi-Hasanabadi و همکاران (۲۰۲۴)، به ارزیابی اثر محافظتی کوئرستین در برابر اختلال میتوکندری مغز ناشی از مواجهه با سم پاراکوات در موش پرداختند. نتایج آن ها نشان داد که کوئرستین به روشی وابسته به دوز دارای اثرات محافظت کننده عصبی است. سازوکار احتمالی اثر پاراکوات در این مطالعه به وجود شکل گیری و تقویت اثر تخریبی رادیکال های آزاد در مقابل مکانیسم های آنتی اکسیدانی موجود در میتوکندری مغز مرتبط دانسته شد. به نظر می رسد که کوئرستین می تواند اکسیداسیون پروتئین و چربی را تعدیل کند و آسیب اکسیداتیو ناشی از پاراکوات را در مراحل اولیه بهبود ببخشد (۹). در یک مطالعه، Sun و همکاران (۲۰۲۱) اظهار داشتند که پاراکوات با اختلال در بلوغ تخمک موجب کاهش باروری در موش های ماده می شود. در این مطالعه، قرارگیری در معرض پاراکوات توزیع میتوکندری را مختل کرده و سطح گونه های اکسیژن فعال و آپوپتوز اولیه را افزایش داد که در نتیجه منجر به اختلال در رشد اولیه جنین شد. هم چنین، تجویز پاراکوات توانست تغییراتی در روند اپی ژنتیکی مانند سطح H3K9me2 و H3K27me3 ایجاد کند. بنابراین، تجویز پاراکوات با آسیب رساندن به بلوغ هسته ای و سیتوپلاسمی تخمک ها در موش، باروری جنس ماده را کاهش می دهد (۷). در

مطالعه دیگر، Feng و همکاران در سال (۲۰۲۳) اظهار داشتند که سولفورافان آسیب اکسیداتیو ناشی از پاراکوات را در تخمک‌های بالغ گاو از طریق مسیر انتقال Nrf2 سرکوب می‌کند. مکانیسم‌های اساسی نقش سولفورافان در برابر آسیب ناشی از پاراکوات شامل مهار پروتئین TXNIP و بازیابی سطح جهانی O-GlcNAc بود. در مجموع، این یافته‌ها شواهد جدیدی را برای نقش محافظتی سولفورافان در کاهش آسیب ناشی از پاراکوات ارائه می‌کنند و نشان می‌دهند که کاربرد سولفورافان ممکن است یک استراتژی مداخله موثر در برابر سمیت سلولی پاراکوات باشد (۱۰). با توجه به خواص متنوع دارویی و آنتی اکسیدانی کوئرستین، این مطالعه با هدف ارزیابی اثرات محافظتی کوئرستین بر سمیت تخمدان ناشی از مواجهه با پاراکوات در موش‌های صحرایی انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، از کوئرستین (تهیه شده از پایا شیمی)، پاراکوات (تهیه شده از شیمی کشاورز)، نرمال سالین، سوکسینات سدیم، اتیلن دی آمین تتراستیک اسید، دی سدیم هیدروژن فسفات، مانیتول و معرف (MTT) استفاده شد. سایر معرف‌ها و ترکیبات شیمیایی مورد استفاده هم دارای درجه آزمایشگاهی و از شرکت مرک (آلمان) تهیه شدند.

حیوانات آزمایشگاهی

جهت ارزیابی اثر محافظتی کوئرستین بر تخمدان موش‌های دچار سمیت حاد ناشی از مواجهه با علف کش پاراکوات، ابتدا حیوانات با سم پاراکوات (۱/۲۵ mg/kg, ip) دچار مسمومیت حاد گردیده و سپس کوئرستین در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم تجویز گردید. مقادیر تجویز شده از سم پاراکوات و کوئرستین برگرفته از مطالعات قبلی بود (۱۱، ۹۸). بعد از ۲۴ ساعت حیوانات قربانی شده،

تخمدان آن‌ها بیرون آورده شد و پس از شستشو مراحل تعیین میزان استرس اکسیداتیو در گروه‌ها تعیین گردید. حیوانات مورد آزمایش به ۵ گروه و هر گروه شامل ۶ موش تقسیم شد. گروه‌ها شامل، گروه کنترل (نرمال سالین)، گروه پاراکوات (۱/۲۵ mg/kg, ip)، گروه پاراکوات + کوئرستین (۵۰ mg/kg, ip)، گروه پاراکوات + کوئرستین (۱۰۰ mg/kg, ip) و گروه پاراکوات + کوئرستین (۲۰۰ mg/kg, ip) بوده است.

سنجش شاخص‌های استرس اکسیداتیو

جدا سازی میتوکندری از بافت تخمدان

تخمدان جدا شده را در بافر خنک مانیتول شسته و به وسیله قیچی به تکه‌های ریزی تقسیم گردید. سپس، تکه‌های بافت تخمدان را به یک بشر حاوی ۲۰ میلی لیتر بافر خنک شده تریس منتقل کرده و لوله‌های حاوی تخمدان هم‌ورنه را در دور ۷۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی را دور ریخته و ۵ میلی لیتر از بافر تریس به رسوبات اضافه کرده و با سمپلر منتقل شد. مخلوط به دست آمده حاوی میتوکندری‌های ایزوله تخمدان است که جهت آزمون‌های مورد نظر آماده شد (هر بار ۲۰۰ میکرو لیتر از مخلوط میتوکندری جهت سنجش شاخص‌های استرس اکسیداتیو برداشته شد) (۱۲).

تست سمیت سلولی (میزان زنده مانی سلول MTT)

یک میلی لیتر از مخلوط میتوکندری‌های ایزوله شده را در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با افزودن محلول MTT زرد رنگ (۰/۲ میلی گرم/میلی لیتر) به محیط به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید. پس از اتمام سانتریفیوژ، محلول رویی را دور ریخته و بافر تریس به لوله‌ها اضافه شد و دوباره با شرایط قبل سانتریفیوژ گردید و در پایان به بلورهای بنفش رنگ فورمازان، دی متیل سولفو کسید اضافه و نمونه را تکان داده تا خوب حل شود. ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول بنفش رنگ را به چاهک‌های پلیت

۹۶ خانه منتقل گردید و جذب محلول با استفاده از پلیت ریدر در ۵۸۷ نانومتر سنجش شد (۱۲).

سنجش پراکسید/سیون لیپیدی

این شاخص بر پایه روش تیوبایتوریک اسید اندازه گیری شد. به طور خلاصه، به ۰/۲ میلی لیتر از سوپانسیون بافتی، ۰/۱ میلی لیتر از معرف تیوبایتوریک اسید حاوی اسید کلریدریک ۰/۵ نرمال، تری کلرواستیک اسید ۱۵ درصد و تیوبایتوریک اسید ۰/۳ درصد اضافه شد و به خوبی مخلوط و در حمام آب گرم به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. بعد از سرد شدن، به این محلول ۰/۲ میلی لیتر از pH -بوتانل اضافه کرده و خوب تکان داده شد. سپس، محلول را در دور ۳۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده تا لایه pH -بوتانل جهت سنجش در طول موج ۵۳۲ نانومتر جدا شده و مقدار ترکیبات واکنش دهنده با تیوبایتوریک اسید از روی منحنی استاندارد محاسبه گردید (۱۳).

سنجش گلوکوتایون

یک میلی لیتر از بافت همگنی از تخمدان را برداشته و به آن ۰/۲۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد افزوده و بعد از ورتکس به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد. یک میلی لیتر از محلول شفاف رویی را برداشته و به آن ۲ میلی لیتر دی سدیم هیدروژن فسفات ۰/۳ مولار و ۰/۳ میلی لیتر از معرف المان اضافه و ورتکس کرده و ۱۵ دقیقه انکوبه شد تا واکنش کامل شود. سپس، میزان جذب در طول موج ۴۱۲ نانومتر خوانده شد. غلظت گلوکوتایون از روی منحنی استاندارد گلوکوتایون بر حسب نانومول بر میلی لیتر به دست آمد (۱۴).

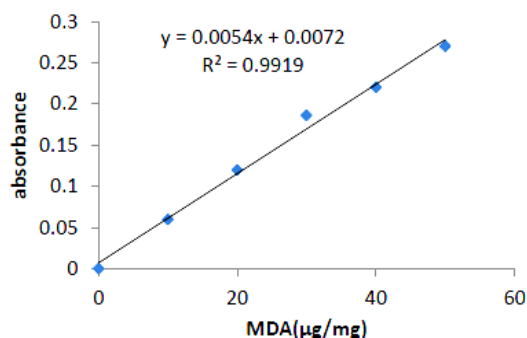
سنجش میزان رادیکال های آزاد اکسیژن (ROS)

میزان ROS با استفاده از دی کلروفلورسین دی استات (DCFH-DA) اندازه گیری شد. بعد از تعیین پروتئین بافت، ۲۰ میکرولیتر از معرف DCFH-DA به

۲۰۰۰ میکرولیتر از نمونه اضافه شده و در ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شد. سپس، شدت فلوروسانس با استفاده از روش فلورومتري و در دو طول موج تحریک ۴۸۵ و نشر ۵۲۵ نانومتر اندازه گیری شد (۱۵).

سنجش مالون دی آلدئید

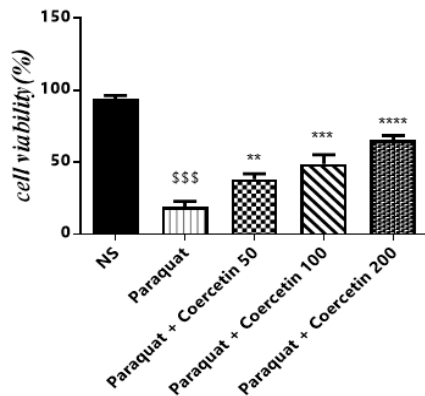
از محلول تترامتوکسی پروپان، ۱۶۴ میکرولیتر برداشته و با اتانول ۴۰ درصد به حجم ۱۰۰ سی سی رسانده شد (محلول ذخیره (۱)). سپس، ۱ میلی لیتر از محلول ذخیره (۱) برداشته و با اتانول ۴۰ درصد به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد (محلول ذخیره (۲)). غلظت این محلول برابر است با ۱۰۰ میکرومول بر لیتر که می توان غلظت های مختلف استاندارد را با استفاده از اتانول ۴۰ درصد از روی آن تهیه کرد. به ۰/۲ میلی لیتر از محلول استاندارد، ۰/۱ میلی لیتر از معرف تیوبایتوریک اسید شامل اسید هیدروکلریک ۰/۵ نرمال، تری کلرواستیک اسید ۱۵ درصد و تیوبایتوریک اسید ۰/۳ درصد اضافه شد و به خوبی مخلوط و در حمام آب گرم در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید و بعد از سرد شدن به آن ۰/۲ میلی لیتر pH -بوتانل اضافه و خوب تکان داده شد و سپس در دور ۳۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. لایه pH -بوتانل جهت سنجش در طول موج ۵۳۵ نانومتر جدا شده و میزان جذب آن در منحنی استاندارد رسم شد (نمودار شماره ۱) (۱۶، ۱۷).



نمودار شماره ۱: منحنی استاندارد مالون دی آلدئید

سنجش پروتئین کربونیل

بهبود یافت (غلظت‌های ۵۰ ($P<0/01$)، ۱۰۰ ($P<0/001$) و ۲۰۰ ($P<0/0001$) میلی گرم بر کیلو گرم از کوثرستین دارای اختلاف معنی داری در مقایسه با گروه کنترل مثبت بودند.



نمودار شماره ۲: سنجش میزان زنده مانی سلولی تحت تیمار با کوثرستین بر مہار سمیت ناشی از پاراکوات،
 \$\$\$: دارای تفاوت معنی دار با گروه کنترل منفی (نرمال سالین) ($P<0/001$),
 *: دارای تفاوت معنی دار با گروه کنترل مثبت ($P<0/05$),
 **: دارای تفاوت معنی دار با گروه کنترل مثبت ($P<0/01$),
 ***: دارای تفاوت معنی دار با گروه کنترل مثبت ($P<0/001$),
 ****: دارای تفاوت معنی دار با گروه کنترل مثبت ($P<0/0001$)

سنجش گلوکوتاتیون

گلوکوتاتیون یکی از مهم ترین آنتی اکسیدان های دفاع غیر آنزیمی در میتو کندری است که نقش مهمی را در خنثی سازی گونه های فعال اکسیژن تولید شده در میتو کندری ها را بر عهده دارد (۱۷). با سمیت ناشی از مواجهه با سم پاراکوات در بافت تخمدان، ذخایر گلوکوتاتیون مصرف و این امر باعث کاهش میزان گلوکوتاتیون بافتی شد. این کاهش از لحاظ آماری در مقایسه با گروه کنترل دارای اختلاف معنی داری است. در گروه های تحت تیمار با کوثرستین، با افزایش غلظت کوثرستین، احیای گلوکوتاتیون، مشاهده گردید و این بدان معناست که کوثرستین از توان مناسبی در مہار سمیت پاراکوات برخوردار است (نمودار شماره ۳). از لحاظ آماری، کوثرستین در غلظت ۵۰ (mg/kg) دارای اختلاف معنی داری با گروه کنترل مثبت است ($P<0/01$)

میزان پروتئین کربونیل با استفاده از معرف DNPH (۲،۴- دینیترو فنیل هیدرازین) اندازه گیری شد. بعد از تعیین پروتئین بافت، ۵۰۰ میکرو لیتر از تری کلرو استیک اسید به ۲۵۰ میکرو گرم از نمونه اضافه کرده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری گردید. سپس، پروتئین های رسوب داده شده با دور ۶۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی دور ریخته شد. رسوب زیرین کاملاً در ۵۰۰ میکرو لیتر از هیدروکسید سدیم ۰/۱ مولار پراکنده شد و ۵۰۰ میکرو لیتر از معرف DNPH (۱۰ میلی مولار) حل شده در اسید کلریدریک ۲ مولار به نمونه ها اضافه گردید. رسوب پروتئین نهایی در ۲۰۰ میکرو لیتر از محلول گوانین هیدروکلراید ۶ مولار پراکنده شد. میزان پروتئین کربونیل در ۳۶۵ نانومتر و با استفاده از ضریب جذب مشخص ارزیابی شد (۱۸).

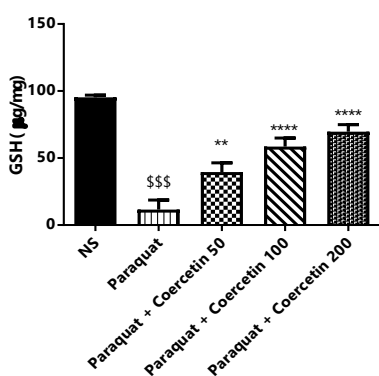
ارزیابی آماری

نتایج بر حسب میانگین $\pm$ انحراف معیار حاصل از سه تکرار گزارش شد. ارزیابی آماری با استفاده از نرم افزار Graphpad prism نسخه (۶)، روش آنالیز واریانس یک طرفه و اختلاف معنادار آن با تست توکی در حد معنی داری ($P<0/05$) تعریف شد.

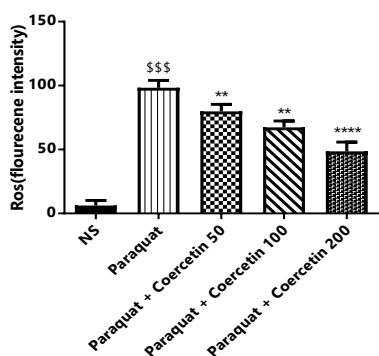
یافته ها

تست زنده مانی و سمیت سلولی (MTT)

اساس تست MTT مبتنی بر ارزیابی فعالیت و سلامت میتو کندری و تعیین زنده مانی سلول است (۱۶). همان طور که در نمودار شماره ۲ مشخص است، پاراکوات در دوز آسیب زا باعث کاهش زنده مانی سلول های بافت تخمدان شد و این کاهش از لحاظ آماری در مقایسه با گروه کنترل مثبت (نرمال سالین) اختلاف معنی داری داشت ($P<0/001$). در بررسی اثر محافظتی کوثرستین مشاهده گردید که با افزایش غلظت کوثرستین، مہار سمیت پاراکوات در بافت تخمدان



نمودار شماره ۳: سنجش میزان گلو تایتون و اثر کوئرستین در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم بر مهار سمیت ناشی از پاراکوات، \$\$\$ دارای تفاوت معنی دار با گروه کنترل منفی (نرمال سالین) ($P < 0.001$)، *: دارای تفاوت معنی دار با گروه کنترل مثبت ($P < 0.05$)، **: دارای تفاوت معنی دار با گروه کنترل مثبت ($P < 0.01$)، ***: دارای تفاوت معنی دار با گروه کنترل مثبت ($P < 0.001$)، ****: دارای تفاوت معنی دار با گروه کنترل مثبت ($P < 0.0001$)



نمودار شماره ۴: سنجش میزان تولید ROS و اثر کوئرستین در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم بر مهار سمیت پاراکوات، \$\$\$ دارای تفاوت معنی دار با گروه کنترل منفی (نرمال سالین) ($P < 0.001$)، *: دارای تفاوت معنی دار با گروه کنترل مثبت ($P < 0.05$)، **: دارای تفاوت معنی دار با گروه کنترل مثبت ($P < 0.01$)، ***: دارای تفاوت معنی دار با گروه کنترل مثبت ($P < 0.001$)، ****: دارای تفاوت معنی دار با گروه کنترل مثبت ($P < 0.0001$)

سنجش پروتئین کربونیل

پروتئین کربونیل یکی از مهم‌ترین زیست نشانگرهای اکسیداسیون پروتئین‌ها بوده و از نظر شیمیایی پایدار است. گروه‌های پروتئین کربونیل از طریق اکسیداسیون مستقیم اسیدهای آمینه یا در اثر واکنش ثانویه با محصولات اکسیداسیون اولیه قندها و لیپیدها ایجاد

و در غلظت‌های (mg/kg) ۱۰۰ و ۲۰۰ نیز این اختلاف معنی داری مشهود بود ($P < 0.0001$).

سنجش رادیکال‌های آزاد اکسیژن

شدت تولید گونه‌های فعال اکسیژن در بافت تخمدان موش در مواجهه با پاراکوات به شکل معنی داری در مقایسه با گروه کنترل منفی افزایش یافت ($P < 0.001$). تجویز کوئرستین در غلظت‌های متفاوت از شدت تولید ROS کاست. افزودن کوئرستین در غلظت‌های ۵۰ ($P < 0.01$)، ۱۰۰ ($P < 0.01$) و ۲۰۰ ($P < 0.0001$) از لحاظ آماری اختلاف معنی داری با گروه کنترل مثبت داشت (نمودار شماره ۴).

سنجش مالون دی آلدئید

یکی از مهم‌ترین اثرات تخریبی رادیکال‌های آزاد، شروع پراکسیداسیون لیپیدها است که به تخریب غشاهای سلولی منجر می‌گردد. در این فرآیند، رادیکال‌های آزاد الکترون‌ها را از زنجیره هیدروکربنی غیر اشباع لیپیدها بیرون کشیده شد و باعث تخریب لیپید و تولید ترکیبات فعال گردید. این ترکیبات فعال (رادیکال‌های ایجاد شده) پس از تخریب باندهای کربنی، سبب تولید طیف وسیعی از ترکیباتی چون کتون‌ها، اترها و آلدئیدها می‌شوند. عمده آلدئید تولید شده در جریان این واکنش‌ها، مالون دی آلدئید است. مالون دی آلدئید، شاخص پراکسیداسیون لیپیدها محسوب می‌شود (۱۶، ۱۷). نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف کوئرستین توانایی مهار واکنش پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از سمیت پاراکوات را داشته و گروه کنترل مثبت از لحاظ آماری در مقایسه با گروه کنترل منفی دارای اختلاف معنی دار بود ($P < 0.001$). با تجویز کوئرستین در غلظت‌های مختلف، کاهش تولید لیپید پراکسیداسیون مشاهده گردید. در غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از کوئرستین، بیش‌ترین اثرگذاری در کاهش تولید لیپید پراکسیداسیون مشاهده شد (نمودار شماره ۵).

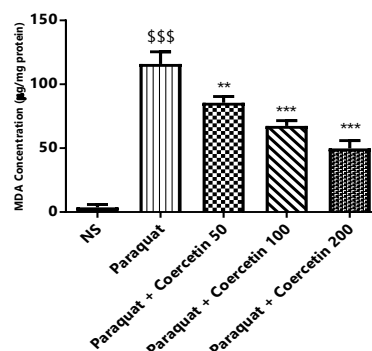
بحث

سمومی مثل پاراکوات با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن سبب آسیب به میتوکنندری، اختلال در عملکرد و خروج فاکتورهای پروآپتوتیک از آن می‌شود که منتهی به مرگ سلولی و در نهایت آسیب بافتی خواهد شد.

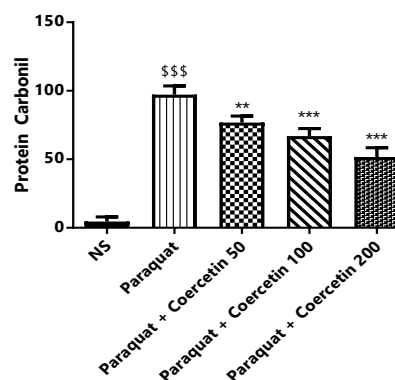
سیستم ایمنی نقش مهمی در حفظ سلامت انسان بر عهده دارد و تحت تأثیر اثرات سمی ترکیبات شیمیایی گسترده‌ای قرار می‌گیرد. فتوسیستم‌های گیاهی به مواد شیمیایی از جمله پاراکوات حساس هستند. پاراکوات به عنوان نوعی علف کش رایج در چین به عنوان «آب مرگ» شناخته می‌شود و آمار مسمومیت حاد در مواجهه با این ترکیب سمی به مرز هشدار رسیده است. از پاراکوات هنوز هم در بسیاری از کشورها استفاده می‌شود که خطر قرارگیری و مواجهه تصادفی یا عمدی انسان با این سم را در بسیاری از گروه‌های هدف افزایش می‌دهد (۱۹، ۱۱). با وجود فراوانی مطالعات مختلف *in vivo* و *in vitro* مکانیسم دقیق عمل پاراکوات کاملاً مشخص نیست (۲۱، ۲۰). سمیت حاد ایجاد شده در اثر مواجهه با پاراکوات همراه با عوارضی چون ادم ریوی، آسیب کبدی، نارسایی اندام‌های متعدد در عرض چند ساعت تا چند روز ممکن است با مصرف حاد بیش از ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم از این سم مرتبط باشد. بر این اساس، مراحل پایانی سمیت سلولی مانند مرگ سلولی، استرس اکسیداتیو و پیامدهای آن، آسیب میتوکنندری، لیزوزومی و بیان ژن مرتبط با آپوپتوز در لنفوسیت‌های محیطی پس از تیمار با پاراکوات مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۳، ۲۲).

در مطالعه حاضر، موش‌های تحت تیمار با تمامی غلظت‌های کوئرستین شامل ۵۰ ($P < 0.01$)، ۱۰۰ ($P < 0.001$) و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم ($P < 0.0001$) اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل مثبت داشتند. با افزایش غلظت کوئرستین، بهبود عملکرد مهار سمیت پاراکوات در این دسته از حیوانات مشاهده گردید. نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد که کوئرستین

می‌شوند (۱۸). با توجه به تصویر شماره ۶، با تجویز کوئرستین در غلظت‌های متفاوت، کاهش میزان آسیب وارده به پروتئین‌ها مشاهده گردید و با افزایش غلظت کوئرستین، شدت آسیب وارده کم‌تر شد. تجویز غلظت‌های ۵۰ ($P < 0.01$)، ۱۰۰ و ۲۰۰ ($P < 0.001$) از کوئرستین به موش‌ها منجر به اختلاف آماری معنی‌داری با گروه کنترل مثبت شد (نمودار شماره ۶).



تصویر شماره ۵: سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی و اثر کوئرستین در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در مهار سمیت پاراکوات. \$\$\$: دارای تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل منفی (نرمال سالین) ($P < 0.001$), *: دارای تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل مثبت ($P < 0.05$), **: دارای تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل مثبت ($P < 0.01$), ***: دارای تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل مثبت ($P < 0.001$), ****: دارای تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل مثبت ($P < 0.0001$)



تصویر شماره ۶: میزان پروتئین کربونیل و اثر کوئرستین در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در مهار سمیت پاراکوات. \$\$\$: دارای تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل منفی (نرمال سالین) ($P < 0.001$), *: دارای تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل مثبت ($P < 0.05$), **: دارای تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل مثبت ($P < 0.01$), ***: دارای تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل مثبت ($P < 0.001$), ****: دارای تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل مثبت ($P < 0.0001$)

می تواند به عنوان ترکیبی مؤثر و آنتی اکسیدانی مفید در بهبود شاخص های استرس اکسیداتیو و بافت تخمدان موش مفید واقع شود. در همین راستا و در یک مطالعه، Sabbagh و همکاران در سال (۲۰۱۶) به ارزیابی تغییرات هیستوپاتولوژیک جسم سیاه پس از مسمومیت با پاراکوات در موش های صحرایی پرداختند. افزایش معنی دار تعداد نوروهای تیره در جسم سیاه موش های صحرایی دچار مسمومیت با ۱۵ و ۲۵ میلی گرم/کیلوگرم از سم پاراکوات مشاهده شد. یافته های آن ها حاکی از اثرات مضر پاراکوات بر نوروهای جسم سیاه بود. این پژوهشگران پیشنهاد کردند که سمیت پاراکوات به عنوان یک عامل خطر برای اختلالات عصبی مانند بیماری پارکینسون مطرح شود (۲۱). در مطالعه دیگر، zohrabi و همکاران (۲۰۱۷)، اثر کوئرستین بر بافت تخمدان موش های صحرایی ماده از نژاد ویستار تحت تیمار با سیلوفسفامید را ارزیابی نمودند. هر دو دوز کوئرستین باعث افزایش تعداد فولیکول های ثانویه، افزایش قطر فولیکول های اولیه، کاهش تعداد فولیکول های گراف آترتی، افزایش عروق خونی، افزایش توان زاد و ولد و شاخص های رشد آن ها به صورت معنی دار شد. کوئرستین در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم سبب افزایش معنادار قطر فولیکول های ثانویه در مقایسه با گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید شد. آن ها نتیجه گرفتند که کوئرستین می تواند باعث کاهش عوارض داروی سیکلوفسفامید بر بافت تخمدان و بهبود شاخص های باروری شود (۲۴). هیچ مطالعه فراگیری به ارزیابی نقش محافظتی کوئرستین و مکانیسم آن در سمیت تخمدان موش با پاراکوات نپرداخته است. در مطالعه حاضر، با افزایش غلظت کوئرستین، مهار سمیت پاراکوات در بافت تخمدان بهبود یافت و از لحاظ آماری تمامی غلظت های کوئرستین، شامل غلظت های ۵۰ ($P < 0.01$)، ۱۰۰ ($P < 0.001$) و ۲۰۰ mg/kg ($P < 0.0001$) دارای اختلاف معناداری در مقایسه با گروه کنترل مثبت بودند. تشدید این سمیت همزمان با افزایش تشکیل ROS و پراکسیداسیون لیپیدی همراه

بود. وقوع استرس اکسیداتیو ممکن است در تسهیل انتشار سمیت و القای پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب اندامک درون سلولی مؤثر باشد. مطالعات در مدل های حیوانی دچار مسمومیت با پاراکوات، محققان را قادر ساخت تا برخی از مکانیسم های دخیل در آسیب بافتی را تعیین کنند. یکی از مهم ترین مکانیسم های مطرح شده برای سمیت پاراکوات، استرس اکسیداتیو است. پاراکوات در بدن به رادیکال کاتیونی تبدیل می شود که از طریق ایجاد فرآیند احیای تک-الکترونی وابسته به NADPH منجر به تولید رادیکال های آزاد شده و این رادیکال های آزاد در برخورد با مولکول های اکسیژن، تولید آنیون های سوپراکسید می کنند. رادیکال های آزاد اکسیژن از یک سو سبب پراکسیداسیون لیپیدهای غشای غشای و از سویی دیگر موجب آسیب به میتوکندری و خروج فاکتورهای پروآپتیک از آن می شوند که منجر به مرگ سلولی از طریق آپتوز و در نهایت آسیب بافتی خواهد شد (۲۵،۲۲،۱۱). آنتی اکسیدان های طبیعی دارای خواص زیستی متعددی از جمله اثرات ضد سرطانی، محافظت از کبد، ضد التهابی و تعدیل کننده ایمنی هستند که این نتایج در کشت سلولی و حیوانی مشاهده شده است (۲۰،۱۹،۱۱). نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که کوئرستین می تواند آسیب اکسیداتیو ناشی از پاراکوات را در بافت تخمدان کاهش دهد. پاراکوات سطح ROS را افزایش داد و منجر به افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و سطح پروتئین کربونیل در میتوکندری سلول های تخمدان شد. این در حالی است که کوئرستین از تشکیل ROS و پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از پاراکوات جلوگیری کرده و متعاقباً سطوح MDA را کاهش داد. به علاوه، افزایش گلو تاتیون در بافت تخمدان ممکن است به منظور از بین بردن رادیکال های آزاد توسط کوئرستین پس از مسمومیت با پاراکوات مفید واقع شود. چنین اثراتی می تواند ناشی از کاهش تشکیل رادیکال های آزاد با تجویز کوئرستین باشد. درمان مناسب مسمومیت با آنتی اکسیدان باید شامل محافظت درون و برون

سلولی در برابر تجزیه پراکسید هیدروژن، آنیون سوپراکسید، تولید رادیکال هیدروکسیل و پراکسیداسیون لیپیدی غشایی باشد (۱۱). در یک مطالعه، اثرات کوثرستین بر آسیب سلولی ناشی از پاراکوات با استفاده از رده سلولی سرطان دهانه رحم انسانی (HeLa) در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. نتایج ارزیابی در برابر رادیکال‌های ضد DPPH نشان داد که کوثرستین قادر است تولید رادیکال‌های DPPH را در شرایط آزمایشگاهی مهار کند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی و رادیکال آزاد در شرایط آزمایشگاهی نسبت به اسیداسکوربیک و N-استیل سیستمین برتری داشت. بر پایه نتایج حاصل از روش MTT، انکوباسیون سلول‌های HeLa تحت تیمار با کوثرستین از این رده‌های سلولی در برابر سمیت ناشی از پاراکوات محافظت کرد. نتایج این مطالعه ثابت کرد که کوثرستین در غلظت کم‌تر از ۱۰۰ میکرومولار اثر مهارکنندگی بر مرگ سلولی ناشی از پاراکوات نشان می‌دهد. اما، در غلظت‌های بیش از ۱۰۰ میکرومولار، اثرات محافظتی در برابر آسیب سلولی ناشی از پاراکوات به دلیل آپوپتوز کاهش یافت (۲۲). این نتایج مثبت درمانی در سایر مطالعات حاصل از افزودن ترکیبات طبیعی با منشأ گیاهی حتی در ابعاد نانو در پیشگیری از سمیت سلولی سموم مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۶). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که تجویز کوثرستین به موش‌ها به طور مؤثری از ایجاد آسیب تخمدان ناشی از پاراکوات به احتمال زیاد از طریق فعالیت آنتی‌اکسیدانی جلوگیری کرد. پاسخ تخمدان به چالش سمیت پاراکوات شامل توسعه سریع استرس اکسیداتیو بود که با افزایش سطح MDA در ترکیب با کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و احتمالاً القای بیان HO^{-1} در بافت‌های تخمدان نشان داده شده است. این تغییرات با عملکرد مناسب

کوثرستین مسدود شد. بنابراین، با توجه به مکانیسم سمیت پاراکوات، رژیم غذایی سرشار از آنتی‌اکسیدان ممکن است عوارض جانبی مواجهه با ترکیبات سمی محیطی را کاهش دهد. با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که کوثرستین به صورت وابسته به دوز می‌تواند آسیب اکسیداتیو ناشی از پاراکوات را در بافت‌های تخمدان موش کاهش دهد. کوثرستین به طور بالقوه می‌تواند جهت کنترل سمیت تخمدان، تعدیل و با مهار عوامل اکسیداتیو، تقویت سیستم ایمنی و تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی در مدل‌های حیوانی استفاده شود. احتمالاً می‌توان از آن به عنوان نوعی مکمل بی‌خطر در ترکیب با سایر داروهای تأثیرگذار بر سیستم ایمنی استفاده کرد. با این حال، این فرضیه همراه با اثر سایر تداخلات دارویی باید با استفاده از مطالعات *in vivo* مناسبی تأیید شود. درک فرآیند مرگ سلولی ناشی از پاراکوات و اثر مهارکنندگی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بر آن، نقشه راه جدیدی را برای مطالعات آتی به منظور توسعه استراتژی‌های درمانی جدید ارائه می‌کند. نتایج مطالعه حاضر تأیید کرد که علاوه بر نقش محافظتی کوثرستین، فعالیت مهار رادیکال در بافت تخمدان موش هم تحت تیمار با کوثرستین به عنوان نوعی ترکیب درمانی مکمل ایمن با منشأ گیاهی افزایش یافت.

سپاسگزاری

این مقاله، حاصل پایان نامه آقای علیرضا نائیجی با کد اخلاقی مصوب به شماره IR.MAZUMS.REC.1399.6786 از دانشگاه علوم پزشکی مازندران است. بنابراین، نویسندگان مراتب تشکر و سپاسگزاری خود را از کارکنان واحدهای دخیل در انجام این پروژه اعلام می‌دارند.

References

1. Stevens AJ, Campbell Jr JL, Travis KZ, Clewell HJ 3rd, Hinderliter PM, Botham PA, et al. Paraquat pharmacokinetics in primates and extrapolation to humans. *Toxicol Appl*

- Pharmacol 2021; 417: 115463.
2. Badibostan H, Eizadi-Mood N, Hayes AW, Karimi G. Protective effects of natural compounds against paraquat-induced pulmonary toxicity: The role of the Nrf2/ARE signaling pathway. *Int J Environ Health Res* 2024; 34(1): 611-624.
 3. Yang L, Chen Y, Liu Y, Xing Y, Miao C, Zhao Y, et al. The Role of Oxidative Stress and Natural Antioxidants in Ovarian Aging. *Front Pharmacol* 2021; 11: 617843.
 4. Yadav RK, Gurung S, Karki S, Lama S, Tamang S, Poudel M. Acute paraquat poisoning complicated by acute kidney injury and lung fibrosis: a case report from Nepal. *Ann Med Surg* 2023; 85(10): 5117-5119.
 5. Shabrina LS, Ahmad A, Fadrian F. Diagnosis and Management of Paraquat Intoxication. *Bioscientia Medicina: J Biomed Transl Res* 2023; 7(8): 3478-3499.
 6. Rafiee S, Nouri A, Heidarian E. Role of NF- κ B/IL-1 β Pathway and Caspase 3 in Mediating the Hepatoprotective Effect of Rutin against Paraquat-Induced Liver Toxicity in Male Rats. *Chem Biodivers* 2023; 20(4): 202200248.
 7. Sun YL, Wang XL, Yang LL, Ge ZJ, Zhao Y, Luo SM, et al. Paraquat reduces the female fertility by impairing the Oocyte maturation in Mice. *Front Cell Dev Biol* 2021; 8: 631104.
 8. Tarko A, Štochmalova A, Hrabovszka S, Vachanova A, Harrath AH, Alwasel S, et al. Can xylene and quercetin directly affect basic ovarian cell functions? *Res Vet Sci* 2018; 119: 308-312.
 9. Saberi-Hasanabadi P, Sedaghatnejad R, Mohammadi H. Protective Effect of Quercetin against Paraquat-induced Brain Mitochondrial Disruption in Mice. *Current Drug Safety* 2024; 19(1): 44-50.
 10. Feng Z, Wang T, Sun Y, Chen S, Hao H, Du W, et al. 2023. Sulforaphane suppresses paraquat-induced oxidative damage in bovine in vitro-matured oocytes through Nrf2 transduction pathway. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2023; 254: 114747.
 11. Ahmadian E, Eftekhari A, Kavetsky T, Khosroushahi AY, Turksoy VA, Khalilov R. Effects of quercetin loaded nanostructured lipid carriers on the paraquat-induced toxicity in human lymphocytes. *Pestic Biochem Physiol* 2020; 167: 104586.
 12. Mohammadi-Bardbori A, Najibi A, Amirzadegan N, Gharibi R, Dashti A, Omidi M, et al, Ghafarian-Bahreman A, Niknahad H. Coenzyme Q10 remarkably improves the bio-energetic function of rat liver mitochondria treated with statins. *Eur J Pharmacol* 2015; 762: 270-274.
 13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72(1-2): 248-254.
 14. Roušar T, Kučera O, Lotková H, Červinková Z. Assessment of reduced glutathione: comparison of an optimized fluorometric assay with enzymatic recycling method. *Analytical Biochemistry* 423; 423(2): 236-240.
 15. Hayashi I, Morishita Y, Imai K, Nakamura M, Nakachi K, Hayashi T. High-throughput spectrophotometric assay of reactive oxygen species in serum. *Mutat Res* 2007; 631(1): 55-61.
 16. Park HK, Kim SJ, Kwon DY, Park JH, Kim YC. Protective effect of quercetin against paraquat-induced lung injury in rats. *Life Sci* 2010; 87(5-6): 181-186.
 17. Altomare A, Baron G, Gianazza E, Banfi C, Carini M, Aldini G. Lipid peroxidation

- derived reactive carbonyl species in free and conjugated forms as an index of lipid peroxidation: limits and perspectives. *Redox Biol* 2021; 42: 101899.
18. Nakamura A, Goto S. Analysis of protein carbonyls with 2, 4-dinitrophenyl hydrazine and its antibodies by immunoblot in two-dimensional gel electrophoresis. *J Biochem* 1996; 119(4): 768-774.
 19. Blanco-Ayala T, Andérica-Romero AC, Pedraza-Chaverri J. New insights into antioxidant strategies against paraquat toxicity. *Free Radic Res* 2014; 48(6): 623-640.
 20. Nouri A, Heibati F, Heidarian E. Gallic acid exerts anti-inflammatory, anti-oxidative stress, and nephroprotective effects against paraquat-induced renal injury in male rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2021; 394(1): 1-9.
 21. Sabbagh A, Tavasoly A, Salar Amoli J, Mardjanmehr H. Histopathologic Changes in the Substantia Nigra Resulted by Paraquat Intoxication in Rat. *Shefaye Khatam* 2016; 4(4): 41-49.
 22. Kim H, Lee SW. The effects of quercetin on paraquat-induced cell damage. *J Korean Soc Emerg Med* 2007 18(1): 41-48.
 23. Ohno Y, Nakanishi T, Umigai N, Tsuruma K, Shimazawa M, Hara H. Oral administration of crocetin prevents inner retinal damage induced by N-methyl-D-aspartate in mice. *Eur J Pharmacol* 2012; 690(1-3): 84-89.
 24. Zohrabi D, Parivar K, Sanati MH, Hayati Roodbari N. The effect of Quercetin on ovarian tissue of Female Wistar Rats treated with cyclophosphamide and growth indexes of their offspring. *Cell Tissue Res* 2017; 8(3): 285-293.
 25. Yeh ST, Guo HR, Su YS, Lin HJ, Hou CC, Chen HM, et al. Protective effects of N-acetylcysteine treatment post acute paraquat intoxication in rats and in human lung epithelial cells. *Toxicol* 2006; 223(3): 181-190.
 26. Ebrahimnejad P, Ghazvini H, Hasanjani P, Saberi-Hasanabadi P, Akhtari J, Mohammadi H. The Synergistic Effect of Curcumin and Piperine Nanoparticles on Methamphetamine-induced Neurotoxicity, Oxidative Stress, and Memory Impairments in Mice Brain *Lett Drug Des Discov* 2023; 21(15): 3149-3160.