

ORIGINAL ARTICLE

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

Parisa Saberi-Hasanabadi¹

Alireza Naeiji²

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 تخدمان ناشی از پاراکوآت در موش‌های صحرایی نژاد ویستان

پریسا صابری حسن آبادی^۱علیرضا نائیجی^۲همیدرضا محمدی^۳

چکیده

سابقه و هدف: پاراکوات از جمله علف‌کش‌های 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 سوم کشاورزی از مسائل مهمی به شمار می‌رود که توجه محققان را در این حوزه به خود جلب نموده است. کوئرستین به عنوان فلاونوئیدی طبیعی به مقدار زیاد در میوه‌ها و سبزیجات یافت می‌شود. این ترکیب به عنوان نوعی آنتی اکسیدان طبیعی از قدرت زیادی در حذف رادیکال‌های آزاد برخوردار است. مطالعه حاضر، با هدف ارزیابی اثرات محافظتی کوئرستین بر سمیت تخدمان ناشی از پاراکوآت در موش‌های صحرایی، انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: جهت انجام این پژوهش تجربی، ۴۰ موش بالغ صحرایی نژاد ویستان 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 پاراکوآت (به میزان ۱/۲۵ میلی گرم بر کیلو گرم) و گروه کنترل منفی نرمال سالین دریافت کردند. کوئرستین در دوزهای مختلف (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم/کیلو گرم) به صورت داخل صفاقی به حیوانات دچار سمیت حاد تزریق شد. بعد از ۲۴ ساعت، حیوانات قربانی شده و تخدمان 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<0.001)، ۱۰۰ (P<0.01) و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم (P<0.001) 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<0.001). با تجویز کوئرستین در غلظت‌های مختلف، کاهش تولید لیپید پراکسیداسیون مشاهده شد. از لحاظ آماری، کوئرستین در غلظت (mg/kg) ۵۰ دارای اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل مثبت بود (P<0.01) و در غلظت‌های (mg/kg) ۱۰۰ و ۲۰۰ نیز این اختلاف معنی‌داری مشهود بود (P<0.001). در غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم از کوئرستین، بیشترین اثر گذاری در کاهش تولید لیپید پراکسیداسیون مشاهده گردید.

استنتاج: نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد که کوئرستین می‌تواند به عنوان ترکیبی مؤثر و آنتی اکسیدانی مفید در بهبود شاخص‌های استرس اکسیداتیو و بافت تخدمان موش مفید واقع شود. کوئرستین به صورت وابسته به دوز می‌تواند آسیب اکسیداتیو ناشی از پاراکوآت را در بافت‌های تخدمان موش کاهش دهد. کوئرستین به طور بالقوه می‌تواند جهت کنترل سمیت تخدمان، تعدیل و یا مهار عوامل اکسیداتیو، تقویت سیستم آیمنی و تقویت سیستم آنتی اکسیدانی در مدل‌های حیوانی استفاده شود. احتمالاً می‌توان از آن به عنوان نوعی مکمل بی خطر در ترکیب با سایر داروهای تأثیرگذار بر سیستم آیمنی استفاده کرد. با این حال، این فرضیه همراه با اثر سایر تداخلات دارویی باید با استفاده از مطالعات *in vivo* مناسبی تأیید شود. در ک فرآیند مرگ سلولی ناشی از پاراکوآت و اثر مهار کنندگی آنتی اکسیدان‌های طبیعی بر آن، نقشه راه جدیدی را برای مطالعات آتی به منظور توسعه استراتژی‌های درمانی جدید ارائه می‌کند.

واژه‌های کلیدی: پاراکوآت، کوئرستین، سمیت، تخدمان، شاخص‌های استرس اکسیداتیو

مولف 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

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

مقدمه

مواجهه با این سم شد. مواجهه با سم پاراکوآت سبب اختلال در عملکرد میتوکندری و افزایش سطح گونه‌های اکسیژن فعال و آپوپتوز اولیه شد. در نتیجه، این محققین کاهش رشد اولیه جنین را در موش‌های مورد مطالعه گزارش کردند^(۷). امروزه استفاده از ترکیباتی با منشأ طبیعی به منظور بهبود یا کاهش اثرات مخرب سومون کشاورزی از مسائل مهمی بشمار می‌رود که توجه محققان را در این حوزه به خود جلب نموده است. کوئرسین به عنوان فلاونوئیدی طبیعی به مقدار زیاد در میوه‌ها و سبزیجات یافت می‌شود. این ترکیب به عنوان نوعی آنتی‌اکسیدان طبیعی از قدرت زیادی در حذف رادیکال‌های آزاد برخوردار است^(۸). در یک مطالعه، رادیکال‌های Saberi-Hasanabadi و همکاران^(۲۰۲۴)، به ارزیابی اثر محافظتی کوئرسین در برابر اختلال میتوکندری مغز ناشی از مواجهه با سم پاراکوآت در موش پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد که کوئرسین به روشنی وابسته به دوز دارای اثرات محافظت کننده عصبی است. سازوکار احتمالی اثر پاراکوآت در این مطالعه به وجود شکل گیری و تقویت اثر تخریبی رادیکال‌های آزاد در مقابل مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی موجود در میتوکندری مغز مرتبط دانسته شد. به نظر می‌رسد که کوئرسین می‌تواند اکسیداسیون پروتئین و چربی را تعدیل کند و آسیب اکسیداتیو ناشی از پاراکوات را در مراحل اولیه بهبود بیخشد^(۹). در یک مطالعه، Sun و همکاران^(۲۰۲۱) اظهار داشتند که پاراکوات با اختلال در بلوغ تخمک موجب کاهش باروری در موش‌های ماده می‌شود. در این مطالعه، قرار گیری در معرض پاراکوآت توزیع میتوکندری را مختل کرده و سطح گونه‌های اکسیژن فعال و آپوپتوز اولیه را افزایش داد که در نتیجه منجر به اختلال در رشد اولیه جنین شد. هم‌چنین، تجویز پاراکوآت توانست تغییراتی در روند اپیژنیکی مانند سطح H3K9me2 و H3K27me3 ایجاد کند. بنابراین، تجویز پاراکوآت با آسیب رساندن به بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک‌ها در موش، باروری جنس ماده را کاهش می‌دهد^(۷).

مسومومیت با علف‌کش‌ها 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 مسومومیت منجر به بستری و ۲۰۰۰۰ مرگ در اثر استفاده ناگاهانه از سومون کشاورزی گزارش می‌شود^(۱). دسته‌ای از علف‌کش‌ها مثل پاراکوآت (با نام تجاری گراماکسون) و فرمول شیمیایی ۱-۴-۴-۳-۱ دی متیل-۴-بای پیریدیلیوم دی کلرید با مکانیسم تأخیری مبتنی بر چرخه ردوکس و ایجاد استرس اکسیداتیو درون سلولی موجب بروز سمت مرجبار در انسان و حیوانات می‌شوند. 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 پاراکوآت از طریق دستگاه گوارش ظرف ۲ ساعت پس از هضم اتفاق می‌افتد^(۲). مکانیسم کامل سمت سلولی پاراکوات مبهم است. این احتمال مطرح است که پاراکوآت نوعی محرک قوی در شکل گیری آنیون‌های سوپراکسید باشد. این رادیکال‌ها به شدت سمی بوده و به سهولت با درشت مولکول‌های زیستی بدن جانداران ترکیب شده و منجر به آسیب شدید به ارگان‌های مختلف می‌شود. عملکرد سیستم ایمنی می‌تواند توسط مواد شیمیایی مختلفی چون آفت‌کش‌ها مختل شود^(۳). مطالعات تجربی بسیاری به ارزیابی اثرات سمی پاراکوات و نارسایی در عملکرد ارگان‌هایی چون کبد، کلیه، ریه و سیستم اعصاب مرکزی پرداخته‌اند. مطالعات قبلی هم چنین نشان داده که میتوکندری مهم ترین بافت هدف سمت پاراکوآت 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 پاراکوآت باعث کاهش قدرت باروری موش ماده بواسطه اختلال در بلوغ تخمک در طی ۲۱ روز پس از

تخدمان 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 به کوئرستین (۲۰۰ mg/kg, ip) بوده است.

سنجهش شاخص‌های استرس اکسیداتیو جدا‌سازی میتوکندری از بافت تخدمان تخدمان جدا شده را در بافر خنک مانیتول شسته و به وسیله قیچی به تکه‌های ریزی تقسیم گردید. سپس، تکه‌های بافت تخدمان را به یک بشر حاوی ۲۰ میلی‌لیتر بافر خنک شده تریس منتقل کرده و لوله‌های حاوی تخدمان هموژنه 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 سپلیر منتقل شد. مخلوط به دست آمده حاوی میتوکندری‌های ایزوله تخدمان است که جهت آزمون‌های مورد نظر آماده شد (هر بار ۲۰۰ میکرولیتر از مخلوط میتوکندری جهت سنجهش 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،۰۵ 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 سولفوکسید اضافه و نمونه را تکان داده تا خوب حل شود. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول بنفش رنگ را به چاهک‌های پلیت

مطالعه دیگر، Feng و همکاران در سال (۲۰۲۳) اظهار داشتند که سولفورافان آسیب اکسیداتیو ناشی از پاراکوات Nrf2 را در تخمک‌های بالغ گاو از طریق مسیر انتقال 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 تخدمان 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 شیمیابی مورد استفاده هم دارای درجه آزمایشگاهی و از شرکت مرک (آلمان) تهیه شدند.

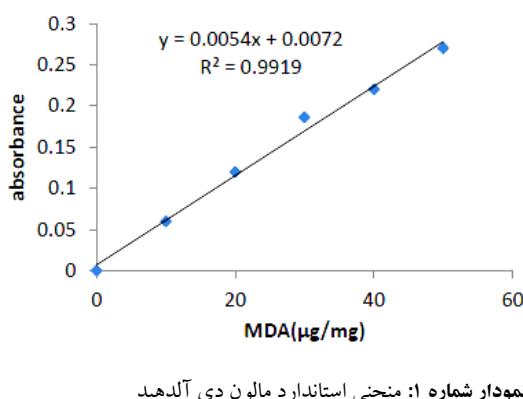
حیوانات آزمایشگاهی

جهت ارزیابی اثر محافظتی کوئرستین بر تخدمان 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 کیلو گرم تجویز گردید. مقداری تجویز شده از سم پاراکوات و کوئرستین برگرفته از مطالعات قبلی بود (۱۱، ۹، ۸). بعد از ۲۴ ساعت حیوانات قربانی شده،

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 فلورومتری و در دو طول موج تحریک ۴۸۵ و نشر ۵۲۵ نانومتر اندازه گیری شد.(۱۵).

سنچش مالون دی آلدید

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 می‌توان غلظت‌های 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 تیوباریتوريک اسید شامل اسید هیدروکلریک ۰/۵ نرمال، تری کلرواستیک اسید ۱۵ درصد و تیوباریتوريک 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 n-بوتانل اضافه کرده و خوب تکان داده شد. سپس، محلول را در دور ۳۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده تا لایه n-بوتانل جهت سنچش در طول موج ۵۳۲ نانومتر جدا شده و مقدار ترکیبات واکنش دهنده با تیوباریتوريک اسید از روی منحنی استاندارد محاسبه گردید(۱۳).



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

سنچش پراکسید/اسیون لیپیدی

این شاخص بر پایه روش تیوباریتوريک اسید اندازه گیری شد. به طور خلاصه، به ۰/۲ میلی لیتر از سوپاپانسیون بافی، ۱/۰ میلی لیتر از معرف تیوباریتوريک اسید حاوی اسید کلریدریک ۰/۵ نرمال، تری کلرواستیک اسید ۱۵ درصد و تیوباریتوريک 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 n-بوتانل اضافه کرده و خوب تکان داده شد. سپس، محلول را در دور ۳۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده تا لایه n-بوتانل جهت سنچش در طول موج ۵۳۲ نانومتر جدا شده و مقدار ترکیبات واکنش دهنده با تیوباریتوريک اسید از روی منحنی استاندارد محاسبه گردید(۱۳).

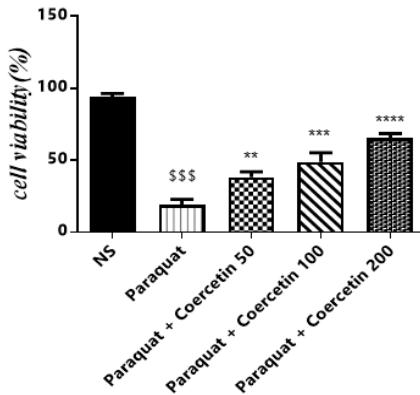
سنچش گلوتاتیون

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 ورتكس 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 ورتكس کرده و ۱۵ دقیقه انکوبه شد تا واکنش کامل شود. سپس، میزان جذب در طول موج ۴۱۲ نانومتر خوانده شد. غلظت گلوتاتیون از روی منحنی استاندارد گلوتاتیون بر حسب نانومول بر میلی لیتر به دست آمد(۱۴).

سنچش میزان رادیکال‌های 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

بهبود یافت (غلظت‌های ۵۰ (P<0/001)، ۱۰۰ (P<0/01) و ۲۰۰ (P<0/0001) میلی گرم بر کیلوگرم از کوئرستین دارای اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل مثبت بودند.



نمودار شماره ۲: سنجش میزان زنده‌مانی سلولی تحت تیمار با کوئرستین بر مهار سمیت ناشی از پاراکوات، (**): دارای تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل مثبت (نرمال سالین) (P<0/001)، (****): دارای تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل مثبت (نرمال سالین) (P<0/0001)، (***): 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<0/0001).

سنجش گلوتاتیون

گلوتاتیون یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های دفاع غیر آنزیمی در میتوکندری است که نقش مهمی را در خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در میتوکندری‌ها را بر عهده دارد^(۱۷). با سمیت ناشی از مواجهه با سم پاراکوآت در بافت تخمدان، ذخایر گلوتاتیون مصرف و این امر باعث کاهش میزان گلوتاتیون بافتی شد. این کاهش از لحاظ آماری در مقایسه با گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری است. در گروه‌های تحت تیمار با کوئرستین، با افزایش غلظت کوئرستین، احیای گلوتاتیون، مشاهده گردید و این بدان معناست که کوئرستین از توان مناسبی در مهار سمیت پاراکوات برخوردار است (نمودار شماره ۳). از لحاظ آماری، کوئرستین در غلظت (mg/kg) ۵۰ دارای اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل مثبت است (P<0/01).

سنجش پروتئین کربونیل

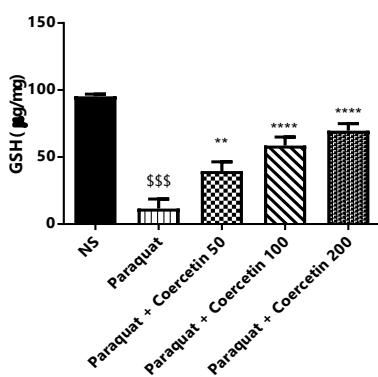
میزان پروتئین کربونیل با استفاده از معرف (DNPH)-۲،۴-دینیتروفنیل هیدرازین) اندازه‌گیری شد. بعد از تعیین پروتئین بافت، ۵۰۰ میکرولیتر از تری کلرواستیک اسید به ۲۵۰ میکروگرم از نمونه اضافه کرده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری گردید. سپس، پروتئین‌های رسوب داده شده با دور ریخته شد. رسوب زیرین کاملاً در ۵۰۰ میکرولیتر از هیدروکسید سدیم ۰/۱ مولار پراکنده شد و ۵۰۰ میکرولیتر از معرف (DNPH) (۱۰ میلی مولار) حل شده در اسید کلریدریک ۲ مولار به نمونه‌ها اضافه گردید. رسوب پروتئین نهایی در ۲۰۰ میکرولیتر 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 نرم‌افزار Graphpad prism نسخه (۶)، روش آنالیز واریانس یک طرفه و اختلاف معنادار آن با تست توکی در حد معنی‌داری (P<0/05) تعریف شد.

یافته‌ها

تست زنده‌مانی و سمیت سلولی (MTT) اساس تست MTT مبتنی بر ارزیابی فعالیت و سلامت میتوکندری و تعیین زنده‌مانی سلول است^(۱۶). همان طور که در نمودار شماره ۲ مشخص است، پاراکوآت در دوز آسیب زا باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌های بافت تخمدان شد و این کاهش از لحاظ آماری در مقایسه با گروه کنترل مثبت (نرمال سالین) اختلاف معنی‌داری داشت (P<0/001). در بررسی اثر محافظتی کوئرستین مشاهده گردید که با افزایش غلظت کوئرستین، مهار سمیت پاراکوات در بافت تخمدان

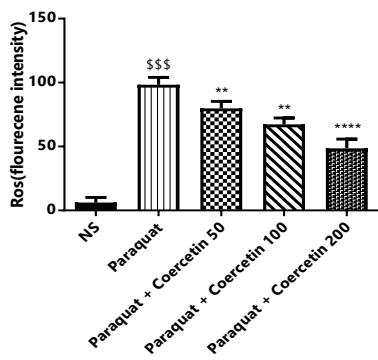


نمودار شماره ۳: سنجش میزان گلوتاپیون و اثر کوئرستین در غلاظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم بر مهار سمیت ناشی از پاراکوات،
دارای تفاوت معنی دار با گروه کنترل منفی (زممال سالین) ($P<0.001$),
دارای تفاوت معنی دار با گروه کنترل مثبت ($P<0.05$),
دارای تفاوت معنی دار با گروه کنترل مثبت ($P<0.01$),
دارای تفاوت معنی دار با گروه کنترل مثبت ($P<0.001$),
دارای تفاوت معنی دار با گروه کنترل مثبت ($P<0.001$).

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

سنجش رادیکال های 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 غلاظت‌های متفاوت از شدت تولید ROS کاست. افزودن کوئرستین در غلاظت‌های ۵۰ (۱۰۰)، ۱۰۰ (۲۰۰) و ۲۰۰ (۵۰) از لحاظ آماری اختلاف معنی داری با گروه کنترل مثبت داشت (نمودار شماره ۴).



نمودار شماره ۴: سنجش میزان تولید ROS و اثر کوئرستین در غلاظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم بر مهار سمیت پارکوات،
دارای تفاوت معنی دار با گروه کنترل منفی (زممال 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 ($P<0.001$).

سنجش مالون دی آلدھید

یکی از مهم ترین اثرات تخریبی رادیکال‌های آزاد، شروع پراکسیداسیون لیپیدها است که به تخریب غشاء‌های 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. عمله آلدید تولید شده در جریان این واکنش‌ها، مالون دی آلدید است. مالون دی آلدید، شاخص پراکسیداسیون لیپیدها محسوب می‌شود (۱۷، ۱۶). نتایج نشان داد که غلاظت‌های 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 غلاظت‌های مختلف، کاهش تولید لیپید پراکسیداسیون مشاهده گردید. در غلاظت ۲۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم از کوئرستین، بیش ترین اثرگذاری در کاهش تولید لیپید پراکسیداسیون مشاهده شد (نمودار شماره ۵).

سنجش پروتئین کربونیل

پروتئین کربونیل یکی از مهم ترین 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

بحث

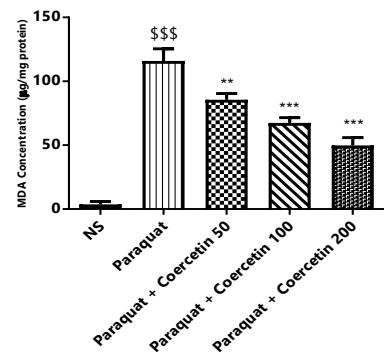
سومی مثل پاراکوات با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن سبب آسیب به میتوکندری، اختلال در عملکرد و خروج فاکتورهای پروآپوپتوتیک از آن می‌شود که منتهی به مرگ سلولی و در نهایت آسیب بافتی خواهد شد.

سیستم اینمنی نقش مهمی در حفظ سلامت انسان بر عهده دارد و تحت تأثیر اثرات سمی ترکیبات شیمیابی گسترده‌ای قرار می‌گیرد. فتوسیستم‌های گیاهی به مواد شیمیابی از جمله پاراکوت آت حساس هستند. پاراکوت آت 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 پاراکوت آت هنوز هم در بسیاری از کشورها استفاده می‌شود که خطر قرار گیری و مواجهه تصادفی یا عدمی انسان با این سم را در بسیاری از گروه‌های هدف افزایش می‌دهد (۱۹، ۲۱).

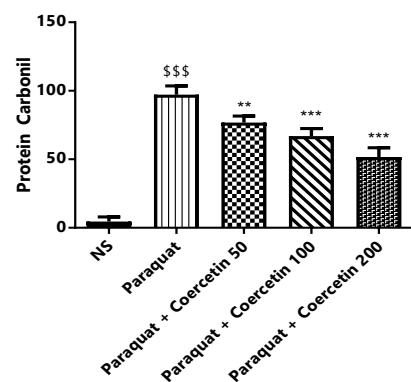
با وجود فراوانی مطالعات مختلف *in vivo* و *in vitro* مکانیسم دقیق عمل پاراکوت آت کاملاً مشخص نیست (۲۰). سمیت حاد ایجاد شده در اثر مواجهه با پاراکوت آت همراه با عوارضی چون ادم ریوی، آسیب کبدی، نارسایی اندام‌های متعدد در عرض چند ساعت تا چند روز ممکن است با مصرف حاد بیش از ۳۰ میلی‌گرم بر کیلو گرم از این سم مرتبط باشد. بر این اساس، مراحل پایانی سمیت سلولی مانند مرگ سلولی، استرس اکسیداتیو و پیامدهای آن، آسیب میتوکندری، لیزوزومی و بیان ژن مرتبط با آپوپتوز در لنفوسيت‌های محیطی پس از تیمار با پاراکوت آت مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۲، ۲۳).

در مطالعه حاضر، موش‌های تحت تیمار با تمامی غلظت‌های کوئرستین شامل ۵۰ (P<0.01)، ۱۰۰ (P<0.01) و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلو گرم (P<0.001) اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل مثبت داشتند. با افزایش غلظت کوئرستین، بهبود عملکرد مهار سمتی پاراکوات در این دسته از حیوانات مشاهده گردید. نتایج به دست 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 واردہ به پروتئین‌ها مشاهده گردید و با افزایش غلظت کوئرستین، شدت آسیب واردہ کم شد. تجویز غلظت‌های ۵۰ (P<0.01)، ۱۰۰ (P<0.01) و ۲۰۰ (P<0.01) از کوئرستین به موش‌ها منجر به اختلاف آماری معنی‌داری با گروه کنترل مثبت شد (نمودار شماره ۶).



تصویر شماره ۶: سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی و اثر کوئرستین در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلو گرم در مهار سمتی 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 ۷: میزان پروتئین کربونیل و اثر کوئرستین در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلو گرم در مهار سمتی 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).

بود. وقوع استرس اکسیداتیو ممکن است در تسهیل انتشار سمیت و القای پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب اندامک درون سلولی مؤثر باشد. مطالعات در مدل‌های حیوانی دچار مسمومیت با پاراکوآت، محققان را قادر ساخت تا برخی از مکانیسم‌های دخیل در آسیب بافتی را تعیین کنند. یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مطرح شده برای سمیت پاراکوآت، استرس اکسیداتیو است. پاراکوآت در بدن به رادیکال کاتیونی تبدیل می‌شود که از طریق ایجاد فرآیند احیای تک-الکترونی وابسته به NADPH منجر به تولید رادیکال‌های آزاد شده و این رادیکال‌های آزاد در برخورد با مولکول‌های اکسیژن، تولید آئیون‌های سوپراکسید می‌کنند. رادیکال‌های آزاد اکسیژن از یک‌سو سبب پراکسیداسیون لیپیدهای غیراشباع و از سویی دیگر موجب آسیب به میتوکندری و خروج فاکتورهای پروآپوتیک از آن می‌شوند که منجر به مرگ سلولی از طریق آپتوzu و درنهایت آسیب بافتی خواهد شد(۱۱،۲۲،۲۵). آنتی اکسیدان‌های 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(۱۱،۱۹،۲۰). نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که کوئرستین می‌تواند آسیب اکسیداتیو ناشی از پاراکوات را در بافت تحمدان کاهش دهد. پاراکوات سطح ROS را افزایش داد و منجر به افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و سطح پروتئین کربونیل در میتوکندری سلول‌های تحمدان 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 گلوتاتیون در بافت تحمدان ممکن است به منظور از بین بردن رادیکال‌های آزاد توسط کوئرستین پس از مسمومیت با پاراکوآت مفید واقع شود. چنین اثراتی می‌تواند ناشی از کاهش تشکیل رادیکال‌های آزاد با تجویز کوئرستین باشد. درمان مناسب مسمومیت با آنتی اکسیدان باید شامل محافظت درون و برون

می تواند به عنوان ترکیبی مؤثر و آنتی اکسیدانی مفید در بهبود شاخص‌های استرس اکسیداتیو و بافت تحمدان موش مفید واقع شود. در همین راستا و در یک مطالعه، و همکاران در سال (۲۰۱۶) به ارزیابی تغییرات هیستوپاتولوژیک جسم سیاه پس از مسمومیت با پاراکوآت در موش‌های صحرایی پرداختند. افزایش معنی دار تعداد نورون‌های تیره در جسم سیاه موش‌های صحرایی دچار مسمومیت با ۱۵ و ۲۵ میلی گرم/کیلو گرم از سم پاراکوآت مشاهده شد. یافته‌های آن‌ها حاکی از اثرات مضر پاراکوآت بر نورون‌های جسم سیاه بود. این پژوهشگران پیشنهاد کردند که سمیت پاراکوآت 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 تحمدان موش‌های صحرایی ماده از نژاد ویستان تحت تیمار با سیلوفسفامید را ارزیابی نمودند. هر دو دوز کوئرستین باعث افزایش تعداد فولیکول‌های ثانویه، افزایش قطر فولیول‌های اولیه، کاهش تعداد فولیکول‌های گراف آتری، افزایش عروق خونی، افزایش توان زاد و ولد و شاخص‌های رشد آن‌ها به صورت معنی دار شد. کوئرستین در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم سبب افزایش معنادار قطر فولیکول‌های ثانویه در مقایسه با گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید شد. آن‌ها نتیجه گرفتند که کوئرستین می‌تواند باعث کاهش عوارض داروی سیکلوفسفامید بر بافت تحمدان و بهبود شاخص‌های باروری شود(۲۴). هیچ مطالعه فرآگیری به ارزیابی نقش محافظتی کوئرستین و مکانیسم آن در سمیت تحمدان موش با پاراکوآت نپرداخته است. در مطالعه حاضر، با افزایش غلظت کوئرستین، مهار سمیت پاراکوات در بافت تحمدان بهبود یافت و از لحاظ آماری تمامی غلظت‌های کوئرستین، شامل غلظت‌های $P<0.01$ ($P<0.001$) و 200mg/kg با $P<0.001$ ($P<0.0001$) دارای اختلاف معناداری در مقایسه با گروه کنترل مثبت بودند. تشدید این سمیت همزمان با افزایش تشکیل ROS و پراکسیداسیون لیپیدی همراه

کوئرستین مسدود شد. بنابراین، با توجه به مکانیسم سمیت پاراکوآت، رژیم غذایی سرشار از آنتی اکسیدان ممکن است عوارض جانبی مواجهه با ترکیبات سمی محیطی را کاهش دهد. با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که کوئرستین به صورت وابسته به دوز می تواند آسیب اکسیداتیو ناشی از پاراکوآت را در بافت های تخدمان موش کاهش دهد. کوئرستین به طور بالقوه می تواند جهت کنترل سمیت تخدمان، تعدیل و یا مهار عوامل اکسیداتیو، تقویت سیستم ایمنی و تقویت سیستم آنتی اکسیدانی در مدل های حیوانی استفاده شود. احتمالاً می توان از آن به عنوان نوعی مکمل بی خطر 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. در کفر آیند مرگ سلولی ناشی از پاراکوآت و اثر مهار کنندگی آنتی اکسیدان های طبیعی بر آن، نقشه راه جدیدی را برای مطالعات آتی به منظور توسعه استراتژی های درمانی جدید ارائه می کند. نتایج مطالعه حاضر تأیید کرد که علاوه بر نقش محافظتی کوئرستین، فعالیت مهار رادیکال در بافت تخدمان موش هم تحت تیمار با کوئرستین 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 پزشکی مازندران است. بنابراین، نویسنده گان مراتب تشکر و سپاسگزاری خود را از کارکنان واحد های دخیل در انجام این پژوهه اعلام می دارند.

References

- Stevens AJ, Campbell Jr JL, Travis KZ, Clewell HJ 3rd, Hinderliter PM, Botham PA,

سلولی در برابر تجزیه پراکسید هیدروژن، آنیون سوپراکسید، تولید رادیکال هیدروکسیل و پراکسیداسیون لیپیدی غشایی باشد(۱۱). در یک مطالعه، اثرات کوئرستین بر آسیب سلولی ناشی از پاراکوات با استفاده از ردۀ سلولی سرطان دهانه رحم انسانی (HeLa) در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. نتایج ارزیابی در برابر رادیکال های ضد DPPH نشان داد که کوئرستین قادر است تولید رادیکال های DPPH را در شرایط آزمایشگاهی مهار کند. فعالیت آنتی اکسیدانی و رادیکال آزاد در شرایط آزمایشگاهی نسبت به اسیداسکوربیک و N-استیل سیستئین برتری داشت. بر پایه نتایج حاصل از روش MTT، انکوباسیون سلول های HeLa تحت تیمار با کوئرستین از این ردۀ های سلولی در برابر سمیت ناشی از پاراکوات محافظت کرد. نتایج این مطالعه ثابت کرد که کوئرستین در غلظت کم تر از ۱۰۰ میکرومولار اثر مهار کنندگی بر مرگ سلولی ناشی از پاراکوات نشان می دهد. اما، در غلظت های 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 سوموم مورد ارزیابی قرار گرفت(۲۶). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که تجویز کوئرستین به موش ها به طور مؤثری از ایجاد آسیب سلولی ناشی از پاراکوات به احتمال زیاد از طریق فعالیت آنتی اکسیدانی جلوگیری کرد. پاسخ تخدمان به چالش سمیت پاراکوآت شامل توسعه سریع استرس اکسیداتیو بود که با افزایش سطح MDA در ترکیب با کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی و احتمالاً القای HO^- در بافت های تخدمان نشان داده شده است. این تغییرات با عملکرد مناسب

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-κB/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, Kavetskyy 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 paraquatinduced 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.