Quarterly of the Horizon of Medical Sciences
Volume 22, Issue 1, Winter 2016
Pages: 13-20
Type: Original Research

Effect of Hydroalcholic Extract of *Nigella sativa* on Doxorubicin-Induced Functional Damage of Kidney in Rats

Mohebbati R.[1] *MSc*, Abbsnezhad A.[2] *PhD*, Khajavi Rad A.* *MD*, *PhD*, Mousavi S.M.[1] *MSc*, Haghshenas M.[1] *MSc*

*Physiology Department, Medicine Faculty, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[1]Physiology Department, Medicine Faculty, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[2]Basic Sciences Department, Medicine Faculty, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran

Abstract

Aims: Doxorubicin is an important anti-cancer drug which can cause renal toxicity. *Nigella sativa* has anti-inflammatory and antioxidant effects. The aim of this study was to determine the effects of hydroalcoholic extract of *Nigella sativa* on doxorubicin-induced functional damage of kidney in rats.

Materials & Methods: This experimental study was implemented, using 32 male Wistar rats which were divided randomly into 4 groups; control, doxorubicin (5mg/kg), *Nigella sativa* extract (200mg/kg) and *Nigella sativa* plus doxorubicin. The groups were treated for 5 consecutive weeks and on days 0, 6, 10, 14, 21, 28, 35; the 24-hour urine samples and serum were collected to measure the levels of serum and urine glucose, serum urea, urea clearance and Glomerular Filtration Rate. Statistical analyses were made using one-way ANOVA followed by the Tukey's test and paired T test.

Findings: The mean of serum urea on day 10 in doxorubicin group was significantly increased compared to the pre-injection state. The mean of urine glucose on day 28 in *Nigella sativa* plus doxorubicin group was significantly decreased compared to doxorubicin group. The means of GFR on days 21 and 35 in doxorubicin group were significantly decreased compared to control day. The means of GFR on days 21, 28, 35 in *Nigella sativa* plus doxorubicin group were significantly increased compared to doxorubicin group. The means of glucose on days 21 and 28 in doxorubicin group were significantly decreased compared to control day.

Conclusion: The hydroalcoholic extract of *Nigella sativa* reduces the doxorubicin-induced functional damage of kidney in rats and helps improve the Glomerular Filtration Rate rate and decreases the glucosuria.

Keywords
Nigella sativa [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68031881];
Renal Insufficiency [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68051437];
Doxorubicin [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68004317];
Glomerular Filtration Rate [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68005919];
Glucosuria [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68006029]

*Corresponding Author
Tel: +985138828565
Fax: +985138828564
Address: Department of Physiology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Azadi Square, Mashhad, Iran. Postal Code: 917794-8564
khajavirada@mums.ac.ir
Received: May 30, 2015 Accepted: October 31, 2015 ePublished: December 15, 2015

اثر عصاره آبی- الکلی سیاه‌دانه بر آسیب عملکرد کلیوی ناشی از دوکسوروبیسین در موش‌های صحرایی

رضا محبتی MSc
گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
عباسعلی عباس‌نژاد PhD
گروه علوم پایه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران
ابوالفضل خواجوی‌راد* MD, PhD
گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
سیدمجتبی موسوی MSc
گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
میلاد حق‌شناس MSc
گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

اهداف: دوکسوروبیسین از داروهای مهم ضدسرطان است که باعث سمیت کلیوی می‌شود. سیاه‌دانه دارای اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی است. هدف این مطالعه، تعیین اثرات عصاره آبی- الکلی تخم سیاه‌دانه بر آسیب عملکرد کلیوی ناشی از دوکسوروبیسین در موش‌های صحرایی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به‌طور تصادفی ساده به ۴ گروه ۸تایی تقسیم شدند؛ گروه شاهد، گروه دوکسوروبیسین (۵میلی‌گرم بر کیلوگرم)، گروه عصاره سیاه‌دانه (۲۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم) و گروه عصاره سیاه‌دانه به‌همراه دوکسوروبیسین. گروه‌ها به‌مدت ۵ هفته تیمار شدند و در روزهای صفر، ۶، ۱۰، ۱۴، ۲۱، ۲۸ و ۳۵ نمونه سرم و ادرار ۲۴ساعته آنها جمع‌آوری شد. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه، تعقیبی توکی و Tزوجی تحلیل شدند.

یافته‌ها: میانگین اوره سرم در روز ۱۰ در گروه دوکسوروبیسین در مقایسه با قبل از تزریق، افزایش معنی‌داری داشت. میانگین غلظت گلوکز ادرار در روز ۲۸ در گروه سیاه‌دانه به‌همراه دوکسوروبیسین در مقایسه با گروه دوکسوروبیسین کاهش معنی‌داری یافت. میانگین GFR در روزهای ۲۱ و ۳۵ در گروه دوکسوروبیسین در مقایسه با روز کنترل کاهش معنی‌داری داشت. میانگین GFR در روزهای ۲۸، ۲۱ و ۳۵ در گروه سیاه‌دانه به‌همراه دوکسوروبیسین در مقایسه با گروه دوکسوروبیسین افزایش معنی‌داری داشت. میانگین گلوکز سرم در روزهای ۲۱ و ۲۸ در گروه دوکسوروبیسین در مقایسه با روز کنترل کاهش معنی‌داری داشت.

نتیجه‌گیری: عصاره آبی- الکلی تخم سیاه‌دانه، آسیب عملکرد کلیوی ناشی از دوکسوروبیسین در موش‌های صحرایی را کاهش داده و سبب بهبود میزان GFR و کاهش گلوکوزوری می‌شود.

کلیدواژه‌ها: سیاه‌دانه، سمیت کلیوی، دوکسوروبیسین، میزان فیلتراسیون گلومرولی، گلوکوزوری

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۳/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۸/۰۹

*نویسنده مسئول: khajavirada@mums.ac.ir

مقدمه

نفروپاتی یکی از علل مرگ‌ومیر بوده که شیوع آن در جهان در حال افزایش است. نفروپاتی عبارت است از کاهش نسبی عملکرد کلیه که با سندروم نفرتیک، نکروز گلومرولی، آلبومینوری، گلوکوزوری، کاهش میزان فیلتراسیون گلومرولی (GFR)، افزایش فشار خون و احتباس مایع همراه است[1]. نفروپاتی با آسیب پودوسیت‌ها به دنبال نکروز گلومرولی، التهاب توبولی و فیبروز مشخص می‌شود[2].

یکی از مدل‌های ایجاد نفروپاتی در حیوانات استفاده از دوکسوروبیسین (Doxorubicin) یا آدریامایسین (Adriamycin) است. دوکسوروبیسین از آنتی‌بیوتیک‌های ضدسرطان بوده و در بسیاری از سرطان‌ها مانند سرطان مثانه، پستان، معده و تیروئید کاربرد دارد و یکی از عوارض مهم آن ایجاد نفروپاتی است[1].

دوکسوروبیسین سبب افزایش دفع N-استیل‌گلوکزآمین (NAG)، گلیکوزآمینوگلیکان (GAG) و فیبرونکتین از ادرار، کاهش سرعت فیلتراسیون گلومرولی (GFR)، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از قبیل گلوتاتیون و گلوتاتیون‌پراکسیداز، افزایش القای لیپیدپراکسیداسیون میکروزومی و میتوکندریایی و هیدروژن‌پراکسیداز می‌شود. افزایش میزان لیپیدپراکسیداسیون، هیدروژن‌پراکسیداز و کاهش میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از مهم‌ترین علل آسیب اکسیداتیو کلیوی هستند[3, 4].

سیاه‌دانه (*Nigella sativa*) از خانواده آلاله (*رانونکولاسه*)، گیاهی دارویی است که به‌طور وسیع برای مقاصد درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. مواد موثره اصلی در عصاره آبی- الکلی سیاه‌دانه، تیموکینون (بیشترین فعالیت فارماکولوژیک را دارد)، دی‌تیموکینون، تیموهیدروکینون و تیمول هستند. ۳۶ تا ۳۸٪ وزن سیاه‌دانه را چربی تشکیل می‌دهد و علاوه بر چربی، پروتئین، ویتامین‌ها، مواد معدنی و کربوهیدرات‌ها نیز در دانه سیاه‌دانه وجود دارد[5, 6]. سیاه‌دانه دارای اثرات فارماکولوژیک متعددی است که می‌توان به اثر آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدآپوپتوزی، تنظیم‌کننده سیستم ایمنی و ضدسرطان اشاره نمود[5, 7]. پیامبر(ص) در حدیثی فرموده‌اند: "بر شما باد مصرف سیاه‌دانه که همانا علاج تمام بیماری‌ها به‌جز مرگ در آن وجود دارد"[8].

سیاه‌دانه سمیت کلیوی ناشی از سیس‌پلاتین را بهبود می‌بخشد و سطوح نیتروژن اوره و کراتینین خون را کاهش می‌دهد. تیموکینون که ماده موثره اصلی سیاه‌دانه است، خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی داشته و کلیه‌ها را در برابر نفروپاتی ناشی از دوکسوروبیسین و پروتئینوری، آلبومینوری و هایپرلیپیدمی همراه با سندروم نفرتیک محافظت می‌کند[9]. تجویز روغن سیاه‌دانه به موش‌های مصرف‌کننده سیکلوسپورین، موجب بهبود عملکرد شاخص‌های بافت‌شناسی کلیه می‌شود[10]. همچنین روغن سیاه‌دانه اثر نفروتوکسیک جنتامایسین در موش را مهار می‌کند[11].

به‌نظر می‌رسد با توجه به آسیب اکسیدانی دوکسوروبیسین بر کلیه و ایجاد استرس اکسیداتیو کلیوی، سیاه‌دانه با داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی قوی بتواند در بهبود عوارض اکسیداتیو دوکسوروبیسین بر کلیه نقش قابل توجهی ایفا نماید. در بررسی‌های صورت‌گرفته در رابطه با اثرات عصاره تام سیاه‌دانه بر آسیب عملکردی کلیوی ناشی از دوکسوروبیسین مطالعه‌ای مشاهده نشد. با توجه به دردسترس‌بودن سیاه‌دانه و نداشتن عوارض مربوط به استفاده داروهای شیمی‌درمانی، در صورت مثبت‌بودن نتایج حاصل از مطالعه کمک موثری به کاهش عوارض و آسیب عملکردی کلیوی ناشی از دوکسوروبیسین و هزینه‌های مرتبط با آن خواهد شد. لذا هدف از این مطالعه، تعیین اثرات عصاره آبی- الکلی تخم سیاه‌دانه بر آسیب کلیوی ناشی از دوکسوروبیسین و پارامترهای عملکردی کلیه در موش‌های صحرایی بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۳ در دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام و از ۳۲ سر موش صحرایی نر ویستار با وزن ۳۰۰-۲۲۰گرم که از اتاق حیوانات دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تهیه شده بودند، استفاده شد. در طول مدت آزمایش، موش‌های صحرایی تحت شرایط استاندارد، در دمای ۲۲±۲°C و سیکل ۱۲ساعته روشنایی و تاریکی در اتاق حیوانات دانشکده پزشکی نگهداری شدند. حقوق حیوانات در پژوهش براساس دستورالعمل کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی مشهد رعایت شد.

عصاره آبی- الکلی سیاه‌دانه به‌روش خیسانده تهیه شد. ابتدا تخم سیاه‌دانه از فروشگاه معتبر داروهای گیاهی در مشهد تهیه شد و توسط متخصصان گیاه‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد مورد تایید قرار گرفت. ۱۰۰گرم از تخم‌های سیاه‌دانه، وزن و آسیاب شدند و سپس در ۹۰۰میلی‌لیتر محلول الکل‌اتیلیک۷۰٪ به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۵°C انکوبه شدند. بعد از ۷۲ ساعت، محلول به‌دست‌آمده با استفاده از صافی‌هایی با سایزهای منافذ مختلف و در نهایت کاغذ صافی، صاف شد. به‌منظور حذف حلال، محلول به‌دست‌آمده در داخل آون در دمای ۴۰°C قرار داده شد تا حلال تبخیر شده و عصاره خشک به‌دست آید[12]. در این روش، بازده عصاره خشک ۳۰٪ بود. برای تهیه مقادیر مختلف به‌منظور استفاده در آزمایش، عصاره به‌دست‌آمده در آب مقطر حل شد.

موش‌های صحرایی به‌طور تصادفی به ۴ گروه ۸تایی تقسیم شدند:

۱- گروه شاهد: حیوانات با دسترسی آزاد به آب و غذا در روز هفتم مطالعه معادل حجم مورد نیاز برای تزریق دوکسوروبیسین، نرمال‌سالین به‌روش تزریق داخل ورید دمی دریافت کردند.

۲- گروه دوکسوروبیسین: مانند گروه شاهد، ولی تزریق تک‌دوز دوکسوروبیسین به‌میزان ۵میلی‌گرم بر کیلوگرم[13] به‌صورت داخل ورید دمی در روز هفتم مطالعه انجام شد.

۳- گروه سیاه‌دانه به‌همراه دوکسوروبیسین: درمان با عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه به‌میزان۲۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌مدت ۶ روز و سپس تزریق دوکسوروبیسین در روز هفتم و به‌دنبال آن به‌مدت ۲۸ روز روزانه به‌صورت خوراکی انجام شد.

۴- گروه عصاره سیاه‌دانه: حیوانات مشابه گروه ۳، عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه را به‌میزان۲۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم بدون تزریق دوکسوروبیسین دریافت کردند.

حیوانات تمام گروه‌ها دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند و تزریق دوکسوروبیسین برای همه گروه‌ها به‌روش داخل وریدی بود.

موش‌های صحرایی یک روز قبل از روز صفر و نیز در روزهای ۵، ۹، ۱۳، ۲۰، ۲۷ و ۳۴ مطالعه به‌مدت ۲۴ ساعت در داخل قفس متابولیک قرار گرفتند و ادرار ۲۴ساعته و همچنین نمونه خون از سینوس غاری چشم در روزهای فوق جمع‌آوری شد. حجم نمونه‌های به‌دست‌آمده ادرار توسط مزور اندازه‌گیری شد و نمونه‌های خون نیز به‌مدت ۳۰ دقیقه در هوای آزمایشگاه قرار گرفت و سپس توسط سانتریفوژ با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۱۰ دقیقه، سرم از لخته خون جدا شد. نهایتاً نمونه‌های ادرار و سرم برای انجام آزمایشات در داخل میکروتیوپ و در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند.

پس از پایان دوره مطالعه و کشتن حیوانات به‌روش اخلاقی، بدن و کلیه راست به‌منظور محاسبه ایندکس کلیه توزین شدند.

اندازه‌گیری غلظت اوره سرم و ادرار، به‌روش کالریمتریک براساس دستور کیت مربوطه (شرکت بتاژن؛ ایران) و توسط دستگاه فتومتر (Convergys 100؛ آلمان) در طول موج ۵۷۸نانومتر انجام شد. در روش مذکور، آمونیاک حاصل از هیدرولیز اوره، توسط آنزیم اوره‌آز با هیپوکلریت و سالیسیلات‌سدیم، تشکیل یک ترکیب سبزرنگ می‌دهد که شدت رنگ ایجادشده متناسب با مقدار اوره در نمونه است[12]. محلول‌ها طبق دستور شرکت سازنده (پارس‌آزمون؛ ایران) آماده شدند. برای بررسی نمونه‌های ادراری، ادرار به‌نسبت ۱+۵۰ با آب مقطر، رقیق و در نهایت عدد به‌دست‌آمده در ۵۱ ضرب شد. اندازه‌گیری غلظت اوره سرم بدون رقیق‌سازی انجام شد.

اندازه‌گیری غلظت کراتینین سرم و ادرار به‌روش JAFFE، براساس دستور کیت مربوطه (شرکت بتاژن؛ ایران) و توسط دستگاه فتومتر در طول موج ۵۰۵نانومتر انجام شد. در این روش، کراتینین با آلکالین‌پیکرات یک کمپلکس رنگی تشکیل می‌دهد که شدت رنگ ایجادشده متناسب با مقدار کراتینین در نمونه است[14]. محلول‌ها طبق دستور شرکت سازنده (پارس‌آزمون؛ ایران) آماده شدند. برای بررسی نمونه‌های ادراری، ادرار به‌نسبت ۱+۵۰ با آب مقطر، رقیق و در نهایت عدد به‌دست‌آمده در ۵۱ ضرب شد. اندازه‌گیری غلظت کراتینین سرم بدون رقیق‌سازی انجام شد.

اندازه‌گیری غلظت گلوکز سرم و ادرار به‌روش GOD-PAP، براساس دستور کیت مربوطه (شرکت بتاژن؛ ایران) و توسط دستگاه فتومتر در طول موج ۵۴۶نانومتر انجام شد. در این روش، آب اکسیژنه آزادشده از گلوکز در مجاورت آنزیم گلوکزاکسیداز با فنول و ۴-آمینوپیرین، در مجاورت آنزیم پراکسیداز تشکیل کینونیمین می‌دهد. میزان کینونیمین تشکیل‌شده که به‌صورت فتومتریک قابل اندازه‌گیری است، با مقدار گلوکز رابطه مستقیم دارد[12].

فیلتراسیون گلومرولی معادل کلیرنس کراتینین در نظر گرفته و با فرمول "کراتینین پلاسما (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)/کراتینین ادرار (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) × برون‌ده ادراری (میلی‌لیتر در دقیقه)" محاسبه شد. کلیرانس اوره با فرمول "اوره پلاسما (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)/اوره ادرار (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) × برون‌ده ادراری (میلی‌لیتر در دقیقه)" محاسبه شد. ایندکس کلیه براساس وزن بدن حیوان در روز ۳۵ و وزن کلیه راست آنها، طبق فرمول "وزن بدن (گرم) × ۱۰۰/وزن کلیه (گرم)" محاسبه شد.

داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS 16 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به‌منظور مقایسه متغیرها پس از بررسی نرمال‌بودن آنها، تفاوت با گروه کنترل و گروه دوکسوروبیسین با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی و تفاوت بین روزهای مختلف در داخل گروه با استفاده از آزمون T زوجی بررسی شد.

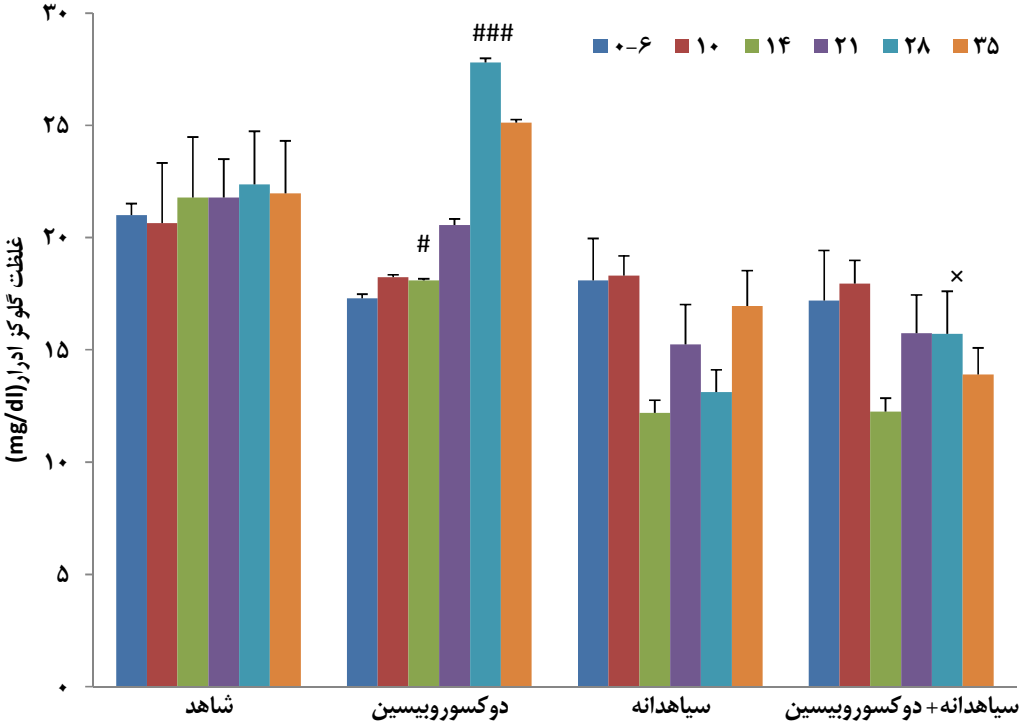
یافته‌ها

میانگین اوره سرم در روز ۱۰ مطالعه در گروه دوکسوروبیسین در مقایسه با میانگین روزهای قبل از تزریق دوکسوروبیسین در همان گروه افزایش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵). میانگین اوره سرم در روزهای مختلف سایر گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. کلیرنس اوره در گروه دوکسوروبیسین در روز ۲۸ نسبت به سایر روزها افزایش یافت، ولی میانگین کلیرنس اوره در روزهای مختلف سایر گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. میانگین گلوکز سرم در روز ۲۱ (p<۰/۰۰۱) و روز ۲۸ (p<۰/۰۵) مطالعه در گروه دوکسوروبیسین در مقایسه با میانگین روزهای قبل از تزریق دوکسوروبیسین در همان گروه کاهش معنی‌داری نشان داد. میانگین گلوکز سرم در روزهای مختلف سایر گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۱).

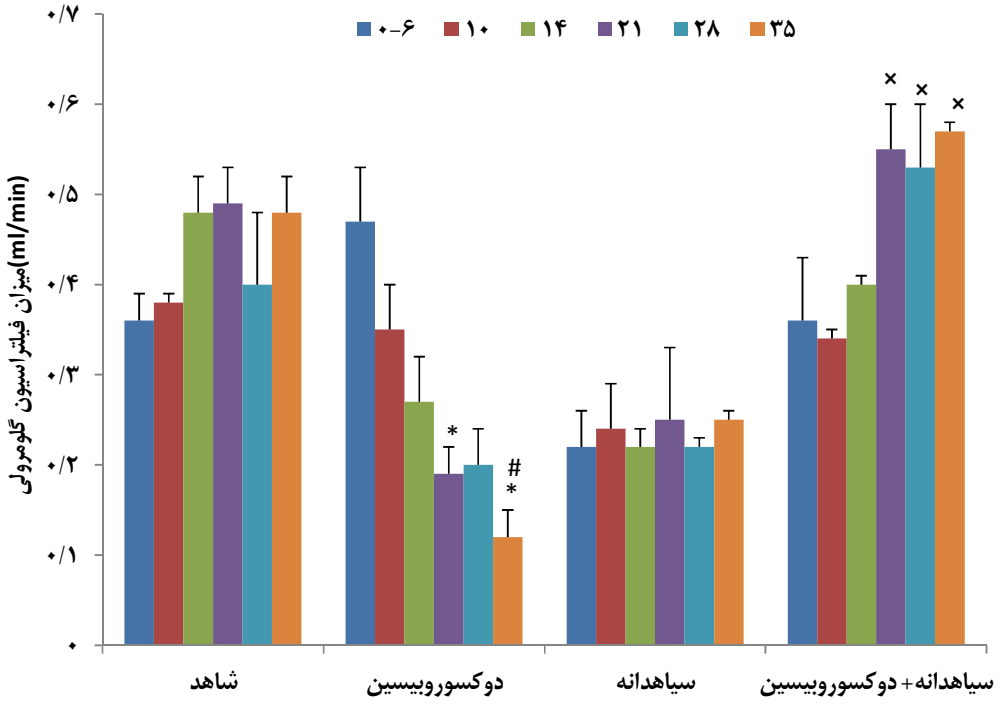
جدول ۱) میانگین اوره سرم، کلیرنس اوره و گلوکز سرم در گروه‌های مختلف مورد مطالعه (تعداد هر گروه ۸سر) تحت تیمار عصاره آبی- الکلی تخم سیاه‌دانه (۲۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم)

شاخص	گروه شاهد	گروه دوکسوروبیسین	گروه عصاره سیاه‌دانه	گروه عصاره سیاه‌دانه+دوکسوروبیسین
میانگین اوره سرم (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)				
میانگین روز صفر و ۶	۵۰/۴۰±۱/۵۱	۴۳/۰۶±۰/۶۳	۵۶/۲۲±۳/۱۶	۵۵/۳۵±۲/۸۸
روز ۱۰	۵۲/۴۵±۲/۳۶	۶۲/۰۸±۰/۷۵*	۵۳/۳۸±۱/۴۹	۵۱/۸۶±۱/۱۸
روز ۱۴	۴۶/۸۵±۲/۲۹	۴۷/۳۲±۰/۷۴	۵۱/۶۶±۱/۵۹	۵۳/۵۳±۱/۹۰
روز ۲۱	۵۱/۸۲±۳/۳۴	۴۵/۱۰±۰/۹۰	۴۸/۵۹±۱/۸۱	۴۳/۸۶±۲/۲۱
روز ۲۸	۵۴/۴۰±۳/۶۷	۴۶/۴۰±۱/۲۴	۵۰/۹۱±۱/۶۴	۵۷/۴۹±۲/۰۶
روز ۳۵	۴۶/۹۳±۳/۴۲	۴۸/۸۱±۰/۴۴	۴۳/۷۳±۰/۸۸	۵۴/۱۹±۴/۲۳
میانگین کلیرنس اوره (میلی‌لیتر در دقیقه)				
میانگین روز صفر و ۶	۰/۴۷±۰/۰۶	۰/۶۳±۰/۱۴	۰/۲۹±۰/۰۲	۰/۲۸±۰/۰۸
روز ۱۰	۰/۴۲±۰/۱۵	۰/۳۰±۰/۰۶	۰/۳۰±۰/۰۵	۰/۳۸±۰/۰۳
روز ۱۴	۰/۴۵±۰/۰۸	۰/۷۳±۰/۱۷	۰/۲۹±۰/۰۵	۰/۲۹±۰/۰۴
روز ۲۱	۰/۶۰±۰/۱۷	۰/۹۲±۰/۱۷	۰/۳۸±۰/۰۷	۰/۶۳±۰/۰۹
روز ۲۸	۰/۴۸±۰/۱۲	۱/۰۳±۰/۲۰	۰/۲۸±۰/۰۳	۰/۵۲±۰/۰۱
روز ۳۵	۰/۵۳±۰/۰۶	۰/۹۷±۰/۱۰	۰/۳۹±۰/۱۲	۰/۵۷±۰/۰۷
میانگین گلوکز سرم (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)				
میانگین روز صفر و ۶	۱۲۹/۳۰±۷/۴۲	۱۳۰/۴۰±۰/۵۳	۱۲۲/۷۰±۵/۶۰	۱۳۰/۸۰±۵/۴۵
روز ۱۰	۱۴۵/۸۰±۵/۷۷	۱۲۸/۲۰±۱/۳۵	۱۳۲/۲۰±۸/۶۷	۱۲۰/۷۰±۳/۳۵
روز ۱۴	۱۴۶/۴۰±۳/۱۲	۱۲۳/۸۰±۱/۳۲	۱۳۱/۲۰±۴/۴۳	۱۴۵/۳۰±۳/۸۹
روز ۲۱	۱۴۳/۱۰±۹/۴۸	۱۰۷/۹۰±۰/۶۳***	۱۲۴/۹۰±۴/۶۷	۱۳۰/۸۰±۷/۳۷
روز ۲۸	۱۴۹/۰۰±۱۰/۹۲	۱۱۲/۶۰±۰/۹۱**	۱۳۳/۶۰±۳/۳۷	۱۳۰/۵۰±۶/۱۸
روز ۳۵	۱۴۰/۰۰±۶/۹۷	۱۳۷/۱۰±۲/۰۲	۱۳۸/۴۰±۱۲/۸۱	۱۲۰/۵۴±۳/۳۶

*p<۰/۰۵ تفاوت با روز کنترل در همان گروه؛ **p<۰/۰۵ تفاوت با میانگین روزهای صفر تا ۶ در داخل گروه؛ ***p<۰/۰۰۱ تفاوت با میانگین روزهای صفر تا ۶ در داخل گروه



نمودار ۱) اثر عصاره آبی- الکلی تخم سیاه‌دانه (۲۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر سطح گلوکز ادرار در مقایسه با گروه کنترل و گروه دوکسوروبیسین ($p<۰/۰۵^{\#}$ تفاوت با گروه شاهد، $p<۰/۰۰۱^{\#\#\#}$ تفاوت با گروه شاهد، $p<۰/۰۵^{\times}$ تفاوت با گروه دوکسوروبیسین، $p<۰/۰۵^{*}$ تفاوت با میانگین روزهای صفر تا ۶ در داخل گروه، $p<۰/۰۰۱^{***}$ تفاوت با میانگین روزهای صفر تا ۶ در داخل گروه).



نمودار ۲) اثر عصاره آبی- الکلی تخم سیاه‌دانه (۲۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر میزان فیلتراسیون گلومرولی (میلی‌لیتر در دقیقه) در مقایسه با گروه کنترل و گروه دوکسوروبیسین ($p<۰/۰۵^{\#}$ تفاوت با گروه شاهد، $p<۰/۰۵^{\times}$ تفاوت با گروه دوکسوروبیسین، $p<۰/۰۵^{*}$ تفاوت با میانگین روزهای صفر تا ۶ در داخل گروه).

میانگین غلظت گلوکز ادرار در روز ۲۸ (p<۰/۰۰۱) و روز ۳۵ (p<۰/۰۵) مطالعه در گروه دوکسوروبیسین در مقایسه با میانگین روزهای قبل از تزریق دوکسوروبیسین در همان گروه افزایش معنی‌داری نشان داد. میانگین غلظت گلوکز ادرار در روز ۱۴ مطالعه در گروه سیاه‌دانه در مقایسه با میانگین روزهای قبل از تزریق دوکسوروبیسین در همان گروه کاهش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵). میانگین غلظت گلوکز ادرار در روز ۲۸ مطالعه در گروه دوکسوروبیسین در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۰۱). میانگین غلظت گلوکز ادرار در روز ۲۸ مطالعه در گروه سیاه‌دانه+دوکسوروبیسین در مقایسه با گروه دوکسوروبیسین کاهش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵؛ نمودار ۱).

میانگین GFR در روزهای ۲۱ و ۳۵ مطالعه در گروه دوکسوروبیسین در مقایسه با روز کنترل در همان گروه کاهش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵). میانگین GFR در روز ۳۵ مطالعه در گروه دوکسوروبیسین در مقایسه با گروه شاهد نیز کاهش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵). میانگین GFR در روزهای ۲۱، ۲۸ و ۳۵ مطالعه در گروه سیاه‌دانه+دوکسوروبیسین در مقایسه با گروه دوکسوروبیسین افزایش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵؛ نمودار ۲).

درصد ایندکس کلیه در گروه دوکسوروبیسین (۵۰/۲±۷/۵) در مقایسه با گروه شاهد (۳۴/۶±۳/۹) افزایش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵) ولی این افزایش در گروه‌های سیاه‌دانه (۳۸/۱±۸/۲) و سیاه‌دانه+دوکسوروبیسین (۵۲/۷±۵/۷) معنی‌دار نبود.

بحث

نتایج مطالعه حاضر به‌طور مشخصی نشان داد که در گروه دوکسوروبیسین، از هفته‌های ابتدایی پس از تزریق، افزایش در میزان گلوکز ادرار وجود داشت که احتمالاً افزایش میزان گلوکز ادرار در هفته‌های انتهایی پس از تجویز دوکسوروبیسین مربوط به دفع گلوکز در ادرار به‌دنبال نفروپاتی ایجادشده ناشی از دوکسوروبیسین است. تجویز عصاره سیاه‌دانه به‌همراه دوکسوروبیسین موجب کاهش میزان گلوکز ادرار در هفته‌های انتهایی پس از تجویز دوکسوروبیسین نسبت به روزهای مشابه در گروه دوکسوروبیسین شد که عصاره سیاه‌دانه به‌دلیل دارابودن اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی، نقش موثر در بهبوددهندگی میزان گلوکز افزایش‌یافته به‌دنبال گلوکوزوری ناشی از نفروپاتی در موش‌های صحرایی تیمارشده با دوکسوروبیسین داشت.

میانگین GFR در گروه دوکسوروبیسین در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت که این نتایج همسو با نتایج سایر مطالعات انجام‌شده در این زمینه است. در یکی از مطالعات نشان داده شد که دوکسوروبیسین باعث کاهش GFR می‌شود[15]. مطابق با مطالعات قبلی، در این مطالعه نشان داده شد که دوکسوروبیسین موجب سمیت کلیوی می‌شود. مکانیزم‌های متعددی در این زمینه مطرح شده است که از آن جمله می‌توان به افزایش دفع N-استیل‌گلوکزآمین (NAG)، گلیکوزآمینوگلیکان (GAG)، گلوکز و فیبرونکتین از ادرار، کاهش سرعت فیلتراسیون گلومرولی (GFR) و افزایش میزان لیپیدپراکسیداسیون، هیدروژن‌پراکسیداز و کاهش میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، اشاره نمود[16].

در مطالعه دیگری نیز تزریق داخل وریدی دوبار دوکسوروبیسین به‌فاصله ۱۴ روز به‌مدت ۲۰ روز موجب نکروز توبولی و ازهم‌گسیختگی غشای گلومرولی و افزایش سطح مالون‌دی‌آلدئید و کاهش میزان گروه‌های تام تیول در بافت کلیه شد[17]. دانشمندان نشان دادند تزریق داخل وریدی دوکسوروبیسین به‌میزان ۶میلی‌گرم بر کیلوگرم موجب ایجاد التهاب و ازهم‌گسیختگی غشایی گلومرول، افزایش سطح مالون‌دی‌آلدئید و کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در بافت کلیه می‌شود[18]. همچنین در مطالعه دیگری تجویز دوکسوروبیسین موجب ایجاد اسکلروز گلومرولی و آسیب و یکنواختی پدوسیت‌ها شد[19]. تحقیقات نشان داد تجویز داخل وریدی دوکسوروبیسین موجب ازهم‌گسیختگی و کاهش تعداد زواید پایی پدوسیت‌ها به‌واسطه کاهش در بیان پروتئین‌های پدوسیتی نفرین و پدوسین شد[20]. مطالعات بافت‌شناسی کلیه، تخریب کلیوی را در گروه دوکسوروبیسین تایید می‌کنند. مطالعات بافت‌شناسی متعدد، واکوئولیزه‌شدن گلومرولی، التهاب، تخریب و ریزش سلول اپی‌تلیالی، اتساع و هیالین‌کست در توبول‌های کلیوی را در گروه دوکسوروبیسین نشان دادند[21]. نتایج پاتولوژی فوق می‌تواند تاییدی بر بروز نفروپاتی و ازهم‌گسیختگی غشا در گلومرول‌های کلیه باشد.

نتایج مطالعه ما نشان داد که میانگین غلظت گلوکز ادرار در گروه سیاه‌دانه به‌همراه دوکسوروبیسین در مقایسه با گروه دوکسوروبیسین کاهش معنی‌داری داشت. همچنین میانگین GFR در گروه سیاه‌دانه به‌همراه دوکسوروبیسین در مقایسه با گروه دوکسوروبیسین افزایش معنی‌داری نشان داد که همسو با سایر نتایج به‌دست‌آمده در این زمینه است. در مطالعه انجام‌شده توسط *الشربینی* و *الشربینی* در سال ۲۰۱۴، تجویز خوراکی تیموکینون به‌میزان ۵۰میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌مدت سه هفته سبب بهبود آسیب توبولی و گلومرولی در بافت کلیه آسیب‌دیده توسط دوکسوروبیسین شد[22].

در مطالعات گوناگون به خواص ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی سیاه‌دانه و تیموکینون به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مواد موثره سیاه‌دانه اشاره شده است که می‌تواند سبب بهبود وضعیت آسیب بافتی شود. از آنجا که تیموکینون دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است و از طرفی سیاه‌دانه نیز دارای ترکیبات پلی‌فنولی است، ممکن است به‌علت خواص آنتی‌اکسیدانی که دارد موجب بهبود تخریب بافتی در نفروپاتی ناشی از سمیت ایجادشده توسط دوکسوروبیسین شود که هماهنگ با یافته‌های ما در پژوهش حاضر است.

در بررسی حاضر، افزایش معنی‌دار ایندکس کلیه در گروه دوکسوروبیسین نسبت به گروه شاهد، به‌علت افزایش وزن کلیه و کاهش تقریبی وزن بدن ایجاد شد. کاهش وزن بدن می‌تواند به‌علت کاهش مصرف و جذب غذا ناشی از سمیت گوارشی به‌شکل تهوع، استفراغ و اسهال ایجاد شود. افزایش وزن کلیه می‌تواند ناشی از ادم بافتی و تجمع مایع در فضای میان‌بافتی کلیه به‌دلیل افزایش فشار اسمزی- کلوئیدی مایع میان‌بافتی باشد. احتمالاً دوکسوروبیسین با اثرات اکسیداتیو خود موجب آسیب سلول‌های اندوتلیال عروق در کلیه و نشت پروتئین‌ها از درون رگ به مایع میان‌بافتی می‌شود[23]. اثرات التهاب‌زای دوکسوروبیسین نیز می‌تواند منجر به ایجاد التهاب و افزایش وزن در بافت کلیه شده و از این طریق وزن کلیه را افزایش دهد[24]. اثرات مطلوب عصاره سیاه‌دانه بر افزایش ایندکس کلیوی ناشی از دوکسوروبیسین احتمالاً می‌تواند به‌دلیل اثرات متعدد آن از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، تنظیم‌کننده ایمنی و ضدآپوپتوزی باشد[25]. کاهش وزن بدن و کلیه در مدل‌های حیوانی تزریق دوکسوروبیسین در مطالعه انجام‌شده توسط محققان نشان داده شده است که تزریق داخل وریدی دوبار دوکسوروبیسین به‌فاصله ۱۴ روز به‌مدت ۲۰ روز موجب کاهش معنی‌داری در وزن حیوانات تیمارشده با دوکسوروبیسین شد[20]. در مطالعه‌ای که روی موش‌های صحرایی صورت گرفت مشخص شد که تجویز دوکسوروبیسین سبب کاهش در وزن حیوانات تحت تیمار با دوکسوروبیسین شد[26].

استرس اکسیداتیو نقش مهمی در نفروپاتی ناشی از دوکسوروبیسین ایفا می‌کند. این عامل به‌وسیله صدمه غشاهای گلومرولی از طریق صدمه سلول‌های اندوتلیال، سلول‌های پدوسیت و غیره باعث نفروپاتی می‌شود. مطالعات زیادی انجام شده که نشان می‌دهد دوکسوروبیسین روی آنزیم‌های استرس اکسیداتیو تاثیر دارد[27]. نتایج این مطالعه نشان‌دهنده تاثیر پیشگیرانه عصاره سیاه‌دانه بر فعالیت اکسیدانی دوکسوروبیسین در بافت کلیه بود. علت خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره سیاه‌دانه ممکن است مربوط به وجود مواد فعال در این گیاهان باشد[28]. محققان نشان دادند تجویز خوراکی تیموکینون به‌میزان ۵۰میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌مدت سه هفته سبب کاهش استرس اکسیداتیو و افزایش میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از قبیل سوپراکسیددیسموتاز و کاهش میزان التهاب بافتی از طریق کاهش تولید TNF-α (فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا) و اینترلوکین۶ در بافت کلیه آسیب‌دیده توسط دوکسوروبیسین شد[22].

از محدودیت‌های این مطالعه زمان‌بربودن تهیه عصاره سیاهدانه بود. پیشنهاد می‌شود که دوزهای دیگری از سیاهدانه با روش‌های تجویز و دوره‌های زمانی متفاوت نیز کار شود.

نتیجه‌گیری

عصاره آبی- الکلی تخم سیاه‌دانه، آسیب عملکرد کلیوی ناشی از دوکسوروبیسین در موش‌های صحرایی را کاهش داده و سبب بهبود میزان GFR و کاهش گلوکوزوری می‌شود.

تشکر و قدردانی: نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از حمایت‌های بی‌دریغ معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد سپاسگزاری نمایند.

تعارض منافع: توسط نویسندگان بیان نشده است.

تاییدیه اخلاقی: از کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد اخذ شده است.

منابع مالی: این مقاله حاصل یک طرح تحقیقاتی است و از حمایت‌های مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد برخوردار بوده است.

منابع

1- Lee VW, Harris DC. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis. Nephrol. 2011;16(1):30-8.
2- Balakumar P, Chakkarwar VA, Kumar V, Jain A, Reddy J, Singh M. Experimental models for nephropathy. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2008;9(4):189-95.
3- Jeansson M, Björck K, Tenstad O, Haraldsson B. Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria. J Am Soc Nephrol. 2009;20(1):114-22.
4- Venkatesan N, Punithavathi D, Arumugam V. Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats. Br J Pharmacol. 2000;129(2):231-4.
5- Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of Nigella sativa. Phytother Res. 2003;17(4):299-305.
6- Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the Nigella sativa L. seed. Int Immunopharmacol. 2005;5(13-14):1749-70.
7- Boskabady MH, Shirmohammadi B, Jandaghi P, Kiani S. Possible mechanism(s) for relaxant effect of aqueous and macerated extracts from Nigella sativa on tracheal chains of guinea pig. BMC Pharmacol. 2004;4:3.
8- Randhawa MA. Black seed, Nigella sativa, deserves more attention. J Ayub Med Coll Abbottabad. 2008;20(2):1-2.
9- Gilani A-uH, Jabeen Q, Allah Khan MA. A review of medicinal uses and pharmacological activities of Nigella sativa. Pak J Biol Sci. 2004;7(4):441-51.
10- Uz E, Bayrak O, Kaya A, Bayrak R, Uz B, Turgut FH, et al. Nigella sativa oil for prevention of chronic cyclosporine nephrotoxicity: An experimental model. Am J Nephrol. 2008;28(3):517-22.
11- Yaman I, Balikci E. Protective effects of Nigella sativa against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. Exp Toxicol Pathol. 2010;62(2):183-90.
12- Burtis C, Ashwood E, Bruns D. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. New York: Elsevier Health Sciences; 2015.

13- Zima T, Tesar V, Crkovska J, Stejskalová A, Platenik J, Teminova J, et al. ICRF-187 (dexrazoxan) protects from adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats. Nephrol Dial Transplant. 1998;13(8):1975-9.
14- Chromý V, Rozkošná K, Sedlak P. Determination of serum creatinine by Jaffe method and how to calibrate to eliminate matrix interference problems. Clin Chem Lab Med. 2008;46(8):1127-33.
15- Montilla P, Tunez I, Munoz MC, Lopez A, Soria JV. Hyperlipidemic nephropathy induced by adriamycin: effect of melatonin administration. Nephron. 1997;76(3):345-50.
16- Di Marco A, Arcamone F, Zunino F. Daunomycin (daunorubicin) and adriamycin and structural analogues: biological activity and mechanism of action. In: Corcoran JW, Hahn FE. Mechanism of Action of Antimicrobial and Antitumor Agents Antibiotics. New York: Springer Science & Business Media; 2012.
17- Sarhan M, El Serougy H, Hussein AM, El-Dosoky M, Sobh MA, Fouad SA, et al. Impact of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells on adriamycin-induced chronic nephropathy. Can J Physiol Pharmacol. 2014;92(9):733-43.
18- Liang Cl, Wu Jb, Lai J, Ye S, Lin J, Ouyang H, et al. Protection effect of Zhen-Wu-Tang on Adriamycin-Induced Nephrotic syndrome via inhibiting oxidative lesions and inflammation damage. Evid Based Complement Altern Med. 2014;2014:1-11.
19- Zhu C, Xuan X, Che R, Ding G, Zhao M, Bai M, et al. Dysfunction of the PGC-1alpha-mitochondria axis confers adriamycin-induced podocyte injury. Am J Physiol Renal Physiol. 2014;306(12):1410-7.
20- Wang Z, Liu JT, Sun WS, Li RP, Wang Y. Effect of Qufeng Tongluo Recipe on expression of desmin and CD2AP proteins in adriamycin-induced nephropathy rats: An experimental research. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 2014;34(2):203-8.
21- Wei M, Sun W, He W, Ni L, Cai X, Cheng Z, et al. Qiguiyishen decoction reduced the accumulation of extracellular matrix in the kidneys of rats with adriamycin-induced nephropathy. J Tradit Chin Med. 2014;34(3):351-6.
22- Elsherbiny NM, El-Sherbiny M. Thymoquinone attenuates Doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats: Role of Nrf2 and NOX4. Chem Biol Interact. 2014;223C:102-8.
23- Hommel E, Mathiesen ER, Aukland K, Parving HH. Pathophysiological aspects of edema formation in diabetic nephropathy. Kidney Int. 1990;38(6):1187-92.
24- You H, Lu Y, Gui D, Peng A, Chen J, Gu Y. Aqueous extract of Astragali Radix ameliorates proteinuria in adriamycin nephropathy rats through inhibition of oxidative stress and endothelial nitric oxide synthase. J Ethnopharmacol. 2011;134(1):176-82.
25- Kawamori T, Lubet R, Steele VE, Kelloff GJ, Kaskey RB, Rao CV, et al. Chemopreventive effect of curcumin, a naturally occurring anti-inflammatory agent, during the promotion/progression stages of colon cancer. Cancer Res. 1999;59(3):597-601.
26- Franco R, Gut A, Ferrari-Spadotto A, Georgette J, Gavras I, Gavras H. Pressor mechanisms in adriamycin-induced nephropathy with hypertension in rats. Hypertens. 1994;23(1):246-9.
27- Koul A, Shubrant S, Gupta P. Phytomodulatory potential of lycopene from Lycopersicum esculentum against doxorubicin induced nephrotoxicity. Indian J Exp Biol. 2013;51(8):635-45.
28- Jadhav VB, Thakare VN, Suralkar AA, Naik SR. Ameliorative effect of Luffa acutangula Roxb. on doxorubicin induced cardiac and nephrotoxicity in mice. Indian J Exp Biol. 2013;51(2):149-56.