

بررسی اثر حفاظتی عصاره هیدروالکلی میوه تمشک بر سمیت کلیوی ایجاد شده توسط متوترکسات در رت نر نژاد ویستار

*هما محسنی کوچصفهانی: گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران (*نویسنده مسئول). kouchesfehani@yahoo.com

سعیده خوشنود: گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

محمد نبیونی: گروه علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۴

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: متوترکسات یک داروی شیمی درمانی ضد متابولیت است که بطور متداول در انواع سرطان ها و بیماری های خود ایمن استفاده می شود. علیرغم اثرات درمانی قابل ملاحظه این دارو مصرف آن سمیت کلیوی را به دنبال خواهد داشت. میوه تمشک قادر است سیستم های بیولوژیک را از مضرات رادیکال های آزاد حفظ کند. هدف از این مطالعه بررسی اثر حفاظتی عصاره هیدروالکلی میوه تمشک بر سمیت کلیوی ناشی از مصرف متوترکسات است. **روش کار:** ۵۴ رت نر نژاد ویستار به ۹ گروه تقسیم شدند: گروه اول کنترل، گروه دوم شم (نرمال سالین ۰/۳ml/day)، گروه سوم تک دوز متوترکسات (۲۰mg/kg BW) را در روز سوم، گروه ۴-۶ عصاره تمشک (به ترتیب ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰) را به مدت ده روز پیاپی و گروه ۷-۹ تک دوز متوترکسات (۲۰mg/kg BW) را در روز سوم و یک ساعت پس از تزریق عصاره ها (به ترتیب ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰) دریافت نمودند. تمامی تزریقات به صورت درون صفاقی انجام گرفت. در روز ۱۱ رت ها کشته شدند و سرم خون و بافت کلیه به منظور بررسی تغییرات هیستولوژیک و سرولوژیک جمع آوری شد. به منظور تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار INSTAT3 و آزمون ANOVA یک طرفه استفاده و نمودارها از طریق برنامه نرم افزاری EXCEL رسم گردید.

یافته ها: افزایش معنی داری در سطوح اوره، کراتینین و اسیداوریک سرم خون به همراه آسیب بافت کلیه در گروه دریافت کننده متوترکسات مشاهده شد. درحالی که تیمار رت های دریافت کننده داروی متوترکسات با عصاره میوه تمشک سبب بهبود علائم مذکور گردید. **نتیجه گیری:** با توجه به نتایج، عصاره هیدروالکلی تمشک خصوصاً در دوز ۲۰۰ mg/kg BW دارای اثرات محافظتی در برابر سمیت کلیوی ناشی از مصرف متوترکسات می باشد.

کلیدواژه ها: تمشک، سمیت کلیوی، متوترکسات

مقدمه

رشد سلول های سرطانی برخلاف رشد اکثر بافت های طبیعی بدن تحت مکانیسم های کنترلی نرمال نبوده و این سلول ها به منظور رشد و سنتز RNA و DNA نیاز بیشتری به پیش سازهای نوکلئوتیدی دارند. در نتیجه عموماً بیش از سلول های طبیعی به مهارکننده های بیوسنتز نوکلئوتیدها حساس هستند؛ بنابراین بسیاری از عوامل شیمی درمانی بر روی آنزیم های مسیر بیوسنتز نوکلئوتیدها عمل می کنند. متوترکسات ابتدا در ۱۹۴۰ به عنوان یک آنتاگونیست خاص از فولیک اسید و به منظور مهار دی هیدروفولات رداکتاز (DHFR) معرفی شد (۱). بدین طریق که با اتصال به DHFR مانع از تبدیل دی هیدروفولات به تتراهیدروفولات شده که به منظور ساخت

طبیعی پورین و پیریمیدین و در نتیجه RNA و DNA نیاز است. به این ترتیب چرخه همانند سازی DNA و به تبع آن متیلاسیون با نقص مواجه شده و سبب مهار تکثیر سلولی خواهد شد (۲-۴). متوترکسات از جمله داروهایی است که استفاده گسترده ای در شیمی درمانی سرطان هایی همچون ریه، گردن رحم، تخمدان، مثانه، سر و گردن، پروستات، بیضه، استخوان و بیماری های خود ایمنی چون آرتریت روماتوئید و سوریاژیس دارد (۱ و ۵). علیرغم استفاده گسترده این دارو، مصرف آن در طیف های درمانی وسیع، خصوصاً در دوزهای بالا سمیت کبدی، کلیوی، مغز استخوان، معده ای-روده ای و سیستم عصبی مرکزی را در پی خواهد داشت (۶). از سویی دیگر مصرف گیاهان دارویی در ایران با

آسیب ریوی ناشی از متوترکسات ثابت شده است (۱۷-۲۰) و چون کاهش سمیت متوترکسات استفاده گسترده تر از فواید درمانی این دارو را ممکن می سازد (۲۱)؛ لذا در تحقیق حاضر اثر حفاظتی عصاره هیدروالکلی میوه تمشک بر سمیت کلیوی ایجاد شده توسط متوترکسات در رت نژاد ویستار مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

در این مطالعه تجربی از ۵۴ رت نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی ۱۷۰-۲۰۰ گرم استفاده شده است که در شرایط محیطی مناسب (دمای ۲۰-۲۴ درجه سانتی گراد) و سیکل تاریکی و روشنایی منظم ۱۲ ساعته و دسترسی آزاد به غذا و آب در مرکز تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه خوارزمی نگهداری شدند.

جمع آوری و عصاره گیری از گیاه: تمشک از استان مازندران (بابل) جمع آوری گردید. میوه های این گیاه بعد از جدا شدن از شاخه با تهویه مناسب در سایه خشک شدند و جهت عصاره گیری مقدار ۵۰۰ گرم از پودر میوه گیاه در یک لیتر اتانول ۸۰٪ حل گردید. پس از ۴۸ ساعت بوسیله کاغذ صافی محلول صاف شده به بالن منتقل گردید و حلال آن با استفاده از دستگاه روتاری در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد با دور متوسط خارج گردید. مایع غلیظ خارج شده حاصل در آن با دمای ۴۵ درجه به مدت دو روز قرار داده شد که در نتیجه آن تمام حلال الکلی محلول های غلیظ بخار شده و در نهایت عصاره خشک حاصل گردید. حدود ۵۰ گرم عصاره خشک از مجموع ۵۰۰ گرم پودر میوه گیاه عصاره تمشک بدست آمد. غلظتی از عصاره تمشک که باعث مرگ ۵۰٪ از رت ها شده به عنوان LD₅₀ در نظر گرفته شد که در این آزمایش غلظت ۱۵۰۰ میلی گرم عصاره تمشک به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به عنوان LD₅₀ انتخاب شد.

حیوانات به نه گروه تقسیم شدند: گروه اول کنترل، گروه دوم شم (نرمال سالیین ۰/۳ml/day)، گروه سوم آسیب دیده با تک دوز متوترکسات (۲۰mg/kg BW تنها در روز سوم)، گروه ۴، ۵ و

توجه به قدمت فراوان طب گیاهی، کم هزینه بودن تهیه آن نسبت به داروهای شیمیایی و عوارض بسیار کم ناشی از آن ها جایگاه خاصی دارد و از سال ها قبل به منظور درمان بسیاری از بیماری ها کاربرد داشته است. از جمله این گیاهان، گیاه تمشک از خانواده گل سرخیان و جنس *Rubus* می باشد (۷). این خانواده از حدود ۲۵۰ گونه تشکیل شده است که در طب سنتی در گروه گیاهانی با طبع خشک و سرد جای گرفته است و به عنوان دارویی ملین و مدر، رقیق کننده خون، تب بر و با خاصیت ضد عفونی کننده شناخته شده است. اثرات مفید آن در کنترل فشارخون و تقویت قلب نیز به اثبات رسیده است و علاوه بر این به بیماران قندی نیز توصیه شده است. میوه تمشک حاوی طیف گسترده ای از ترکیبات فعال زیستی از جمله ویتامین ها (A، C و E)، فولیک اسید، کلسیم، سلنیوم و فنول ها (فلاونوئید، آنتوسیانین ها و الاژیتانین ها) می باشد (۸ و ۹). فلاونوئیدها و آنتوسیانین ها رنگ دانه هایی هستند که رنگ مشخصه ی تمشک از آن ها می باشد. خواص ضد التهابی، ضد اکسیدانی، ضد آنژیوژنز و ضد سرطانی این گیاه به محتوای پلی فنل های آن باز می گردد (۱۰-۱۴). خاصیت آنتی اکسیدانی تمشک به ویتامین C، آنتوسیانین ها و الاژیتانین نسبت داده شده است. ترکیبات فنولی بدن را در برابر بیماری های قلبی-عروقی، سرطان ها، التهابات، چاقی و سایر بیماری های متابولیکی حفظ می کند. مطالعات اثر مهار کننده شیمیایی میوه تمشک را در برابر مواد شیمیایی القا کننده ی سرطان مری در *in-vitro* نشان داده است (۷). علاوه بر این برگ و ریشه جنس *Rubus* نیز در پزشکی کاربرد فراوان دارد بطوریکه اثر حفاظتی برگ گیاه تمشک بر سنگ کلیه به اثبات رسیده است (۶، ۸). فعالیت بیولوژیک این گیاه بر علیه سرطانهای کلون، دهان و مری نیز به ثبت رسیده است (۱۶). با توجه به اینکه در مطالعات پیشین اثرات حفاظتی کورکومین (ماده موثره زردچوبه)، Nitrous Oxide و pentoxyfilline بر نفروتوکسیسیته ناشی از مصرف متوترکسات و اثر حفاظتی اریتروپویتین و ان استیل سیستئین بر

بافت شناسی با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌های ۵ میکرونی تهیه و به روش هماتوکسیلین-ئوزین رنگ آمیزی شدند. به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزار INSTAT3 SPSS و از آزمون ANOVA یکطرفه استفاده شد همچنین به منظور محاسبه اختلاف معنی دار بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی Tukey بهره گرفته شد و P Value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی و نمودارهای مربوطه از طریق برنامه Excel رسم گردید.

یافته‌ها

مقادیر اوره، اسیداوریک و کراتینین سرم خون در گروه‌های مختلف در جداول ۱ تا ۳ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌گردد متوترکسات سبب افزایش معنی داری ($p < 0/001$) در شاخص‌های عملکردی مذکور نسبت به گروه کنترل شده است که از نشانه‌های نفروتوکسیسیتی متوترکسات محسوب می‌شود. تجویز دوزهای گوناگون عصاره تمشک به تنهایی هیچگونه تغییر معناداری را در سطوح کراتینین خون در مقایسه با گروه کنترل ایجاد نکرد اما دوز ۱۰۰ mg/kg BW از عصاره (گروه ۴) باعث افزایش معناداری در میزان اوره خون و کاهش معناداری در میزان اوریک اسید در مقایسه با گروه کنترل شد ($p < 0/001$). دوزهای mg/kg BW ۲۰۰ و ۴۰۰ از عصاره (گروه‌های ۵ و ۶) نیز

۶ عصاره تمشک (محلول در سالین) را به ترتیب با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ mg/kg BW به مدت ده روز پیاپی دریافت کردند و گروه ۷، ۸ و ۹ تک دوز متوترکسات (۲۰ mg/kg BW) را همانند گروه سوم در روز سوم و یکساعت پس از تزریق عصاره‌ها (به ترتیب ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ mg/kg BW) دریافت نمودند. تمامی تزریقات بصورت درون صفاقی انجام شد و در روز ۱۱ پس از شروع آزمایش حیوانات تمامی گروه‌ها با استفاده از تنفس کلروفرم کشته شدند و با استفاده از سرنگ ۵ سی سی به منظور سنجش اوره، کراتینین و اسیداوریک خونگیری از قلب آن‌ها بعمل آمد و کلیه راست نیز به منظور مطالعات بافت شناسی در فیکساتیو بوئن قرار گرفت.

بررسی شاخص‌های شیمیایی عملکرد کلیه: میزان اوره، کراتینین و اسیداوریک خون به عنوان معیاری جهت سنجش عملکرد کلیه و تعیین آسیب کلیوی در نظر گرفته می‌شود. در این مطالعه سنجش اوریک اسید بر اساس واکنش Toss و آنزیمی کلرومتریک، سنجش اوره بر اساس واکنش برتولت و کلرومتریک و سنجش کراتینین بر اساس روش ژافه صورت گرفت. بررسی‌های بافت شناسی: کلیه در فیکساتیو بوئن به مدت ۱۸ ساعت تثبیت شد. مراحل آبگیری و شفاف سازی به ترتیب با عبور از الک‌های با درجات صعودی و تولوئن انجام شد. سپس بافت‌ها قالب گیری شده و جهت مطالعات

جدول ۱- مقایسه سطوح اوره خون در گروه‌های مختلف در مقایسه با گروه کنترل (*) و مقایسه گروه‌های دریافت کننده داروی متوترکسات در ترکیب با عصاره هیدروالکلی تمشک با گروه دریافت کننده داروی متوترکسات (+)

Group	Urea mg/dl
Control	17.80±0.282
Sham	18.75±1.767
Methotrexate	40±1.414***
100 mg Raspberry	22.3±1.272***
200 mg Raspberry	20.35±0.777*
400 mg Raspberry	20.5±2.121*
100 mg Raspberry+MTX	26.3±1.272***(+++)
200 mg Raspberry+MTX	24.4±0.565***(+++)
400 mg Raspberry+MTX	31.5±2.121***(+++)

افزایش معنی دار اوره در گروه دریافت کننده متوترکسات مشاهده می‌گردد. استفاده از عصاره هیدروالکلی میوه تمشک باعث کاهش معنادار اوره خون در مقایسه با گروه دریافت کننده متوترکسات گردید. ($p < 0/001$ ، ***، $p < 0/05$ ، *، $n=5$ ، میانگین \pm انحراف معیار)

جدول ۲- مقایسه سطوح اوریک اسید خون در گروه های مختلف در مقایسه با گروه کنترل(*) و مقایسه گروه های دریافت کننده داروی متوترکسات در ترکیب با عصاره هیدروالکلی تمشک با گروه دریافت کننده داروی متوترکسات(+)

Group	Uric acid mg/dl
Control	1.30±0.155
Sham	1.45±0.070
Methotrexate	1.90±0.141***
100 mg Raspberry	0.98±0.169***
200 mg Raspberry	1.2±0.070
400 mg Raspberry	1.40±0.127
100 mg Raspberry+MTX	1.85±0.056***
200 mg Raspberry+MTX	1.01±0.120***(+++)
400 mg Raspberry+MTX	4.32±0.084***(+++)

افزایش معنی دار اوریک اسید در گروه دریافت کننده متوترکسات مشاهده میشود. استفاده از دوز ۱۰۰ mg/kg BW عصاره هیدروالکلی تمشک در گروه آسیب دیده با متوترکسات بر خلاف دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ mg/kg BW هیچگونه تغییر معناداری را به نسبت گروه دریافت کننده متوترکسات باعث نشد (**p<۰/۰۱ ، ***p<۰/۰۱ ، میانگین ± انحراف معیار) (n=۵)

جدول ۳- مقایسه سطوح کراتینین خون در گروه های مختلف در مقایسه با گروه کنترل(*) و مقایسه گروه های دریافت کننده داروی متوترکسات در ترکیب با عصاره هیدروالکلی تمشک با گروه دریافت کننده متوترکسات(+)

Group	Creatinine mg/dl
Control	0.60±0.014
Sham	0.62±0.028
Methotrexate	1.50±0.282***
100 mg Raspberry	0.735±0.0919
200 mg Raspberry	0.68±0.1555
400 mg Raspberry	0.605±0.035
100 mg Raspberry+MTX	0.535±0.063(+++)
200 mg Raspberry+MTX	0.715±0.120(+++)
400 mg Raspberry+MTX	0.49±0.070(+++)

افزایش معنی دار کراتینین در گروه دریافت کننده متوترکسات مشاهده می گردد. استفاده از عصاره میوه تمشک باعث کاهش معنادار سطح کراتینین خون در مقایسه با گروه دریافت کننده متوترکسات گردید بطوریکه تفاوت معناداری با گروه کنترل مشاهده نشد. (**p<۰/۰۰۱ ، ***p<۰/۰۰۱ ، میانگین ± انحراف معیار) (n=۵)

که دوز ۲۰۰ mg/kg BW عصاره میوه تمشک را دریافت کرده اند کاهش معناداری مشاهده شد (p<۰/۰۰۱). این کاهش در مقایسه با گروه کنترل نیز در (p<۰/۰۰۱) معنادار می باشد با مقایسه سطوح اوریک اسید در گروه ۷ با گروه ۳ تفاوت معناداری دیده نشد و در گروه ۹ افزایش معناداری در مقایسه با گروه ۳ مشاهده شد. بررسی های میکروسکوپی از مقاطع بافتی نمونه های رنگ آمیزی شده به روش هماتوکسیلین-ئوزین از بافت کلیه در گروه های مختلف، افزایش فضای ادراری و کاهش تعداد کپسول بومن را در گروه دریافت کننده داروی متوترکسات نسبت به گروه کنترل به اثبات می رساند (p<۰/۰۰۱). استفاده از عصاره در دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ mg/kgBW افزایش معناداری در قطر فضای ادراری در مقایسه

افزایش معناداری در میزان اوره خون را موجب شدند (p<۰/۰۵) اما تغییر معناداری در میزان اوریک اسید در مقایسه با کنترل مشاهده نشد (p>۰/۰۵). استفاده از عصاره تمشک در سه دوز ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ mg/kg BW کاهش معناداری را در سطح کراتینین سرم خون در مقایسه با گروه ۳ (گروه آسیب دیده با متوترکسات) موجب شد بطوریکه با مقایسه این گروه ها (گروه های ۷-۹) با گروه کنترل تفاوت معناداری دیده نشد. مقایسه سطوح اوره خون در گروه های ۷-۹ با گروه ۳ کاهش معناداری (p<۰/۰۰۱) را نشان داد. بهر حال با وجود کاهش قابل ملاحظه سطح اوره خون در این سه گروه هنوز تفاوت معناداری با گروه کنترل مشاهده می شود (p<۰/۰۰۱). با مقایسه سطوح اوریک اسید در گروه های ۷-۹ با گروه ۳ فقط در گروه ۸

جدول ۴- مقایسه قطر فضای ادراری در گروه‌های مختلف در مقایسه با گروه کنترل (*) و مقایسه گروه‌های دریافت کننده داروی متوترکسات همراه با عصاره هیدروالکلی تمشک با گروه دریافت کننده متوترکسات (+)

Group	dia urinary space um
Control	2.3±0.141
Sham	2.7±0.106
Methotrexate	7.3±0.212***
100 mg Raspberry	4.8±0.070***
200 mg Raspberry	6.4±0.0989***
400 mg Raspberry	4.61±0.247***
100 mg Raspberry+MTX	5.7±0.989***(+++)
200 mg Raspberry+MTX	3.3±0.282*(+++)
400 mg Raspberry+MTX	4.5±0.176***(+++)

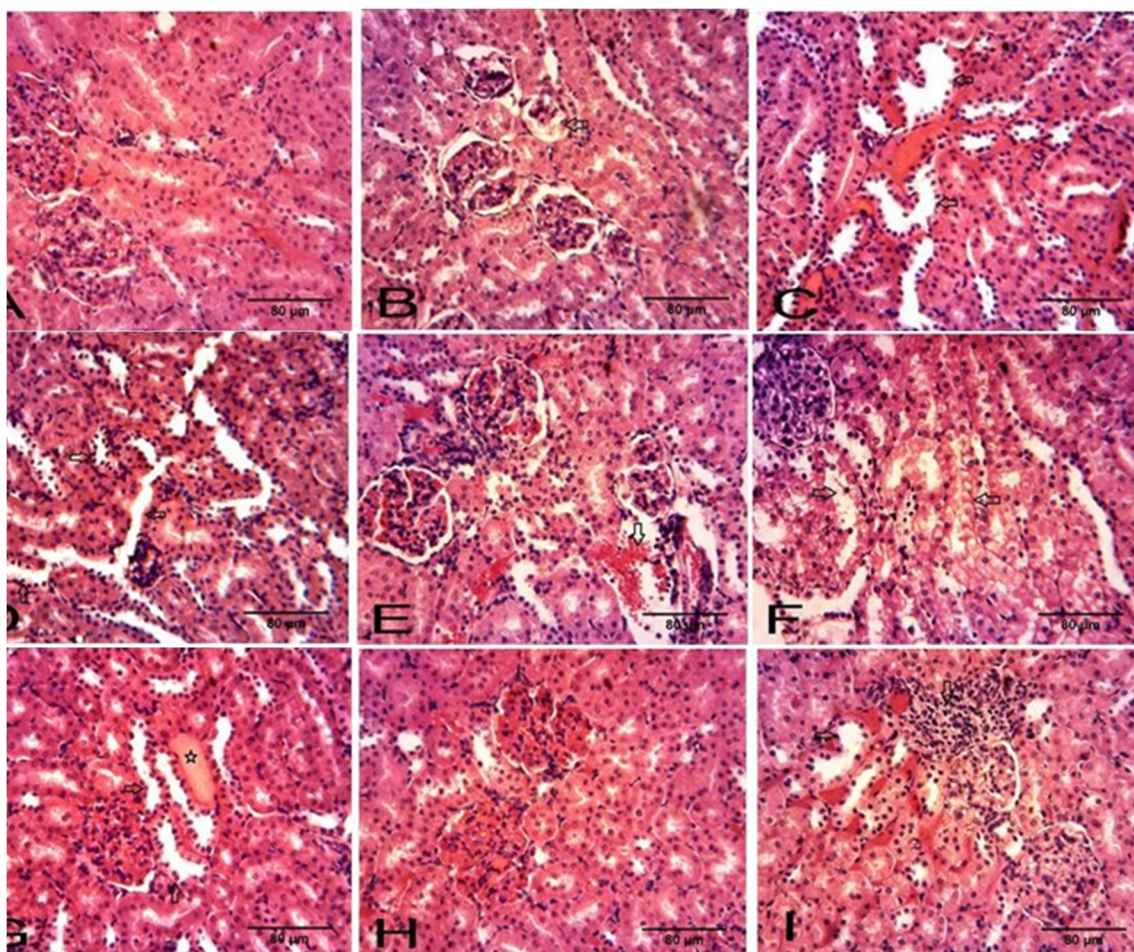
افزایش معنادر فضای ادراری در گروه‌های تیمار شده با عصاره هیدروالکلی میوه تمشک و گروه دریافت کننده داروی متوترکسات مشاهده می‌گردد ($p < 0.001$). در گروه‌های آسیب دیده با متوترکسات که با عصاره هیدروالکلی میوه تمشک تیمار شده‌اند نیز کاهش فضای ادراری در مقایسه با گروه دریافت کننده متوترکسات ($p < 0.001$) مشاهده می‌شود که این کاهش خصوصا در دوز ۲۰۰ mg/kgBW اختلاف کمتری را در مقایسه با گروه کنترل نمایان می‌سازد ($p < 0.05$). ($p < 0.001$ ، ***؛ $p < 0.01$ ، **؛ $p < 0.05$ ، * میانگین \pm انحراف معیار).

تجمع مواد ائوزینوفیل در لومن برخی از لوله‌ها قابل مشاهده است (تصویر G). تیمار با دوز ۴۰۰ mg/kg BW عصاره هیدروالکلی تمشک در گروه آسیب دیده با متوترکسات (گروه ۹) حضور لنفوسیت‌ها را علاوه بر اتساع توبولی نمایان می‌سازد (تصویر I). در حالیکه در گروه تیمار شده با دوز ۲۰۰ mg/kg BW از عصاره هیدروالکلی تمشک تمامی اجزا بافتی به مانند گروه کنترل سالم بوده و تغییر محسوسی به چشم نمی‌خورد (تصویر H). در گروه‌هایی که تنها عصاره دریافت کرده‌اند خصوصا در دوز ۴۰۰ mg/kg BW تغییرات جزئی از قبیل اتساع توبول و حضور لنفوسیت‌ها در برخی از لام‌ها مشاهده می‌گردد.

بحث و نتیجه‌گیری

سرطان هنگامی رخ می‌دهد که سلول‌ها به یک روش کنترل نشده به سرعت رشد می‌کنند. به منظور رشد و تکثیر، سلول‌های سرطانی نیازمند ساخت DNA جدید هستند. متوترکسات دارویی است که در جهت درمان سرطان‌های مشخصی نظیر ریه، گردن رحم، تخمدان، مثانه، سروگردن، پروستات، بیضه، استخوان و بیماری‌های خود ایمنی چون آرتریت روماتوئید و سوریاژیس استفاده می‌شود. با استفاده از متوترکسات سلول‌های سرطانی توانایی ساخت DNA جدید را نداشته و می‌میرند (۲۲). با وجود اثرات مفید این

با گروه کنترل شد ($p < 0.001$). استفاده از عصاره تمشک در دوز ۱۰۰ و ۴۰۰ mg/kgBW همراه با داروی متوترکسات سبب کاهش معنادار ($p < 0.001$) در قطر فضای ادراری در مقایسه با گروه ۳ (گروه دریافت کننده متوترکسات) شد ولی با اینحال باز تفاوت معناداری در مقایسه با گروه کنترل مشاهده می‌گردد ($p < 0.001$). این در حالیکه در دوز ۲۰۰ mg/kgBW از عصاره (گروه ۸) نیز کاهش معناداری در قطر فضای ادراری نسبت به گروه دریافت کننده متوترکسات ایجاد کرد ($p < 0.001$) که اختلاف کمتری را در مقایسه با گروه کنترل نمایان می‌سازد ($p < 0.05$). در تصویر ۱ (A) نمایی از کلیه سالم در گروه کنترل (دست نخورده) مشاهده می‌شود. همانطور که ملاحظه می‌گردد تمامی بخش‌های نفرون از جمله گلومرول، لوله‌های پروکسیمال و دیستال سالم هستند. در گروه دریافت کننده سالین نیز تغییرات قابل ملاحظه‌ای به چشم نمی‌خورد. در گروه دریافت کننده متوترکسات تغییراتی از قبیل آپوپتوز، بهم ریختگی، اتساع، واکوئل و پوسته پوسته شدن توبول، همورژی و آتروفی گلومرول به چشم می‌خورد (B-F). تیمار با دوز ۱۰۰ mg/kg BW عصاره هیدروالکلی تمشک در گروه آسیب دیده با متوترکسات (گروه ۷) سبب تقلیل آسیب‌های بافتی ایجاد شده توسط متوترکسات می‌گردد به‌رحال در این گروه نیز اتساع توبولی و



تصویر ۱- فتومیکروگراف برش طولی کلیه گروه کنترل (A)، دریافت کننده متوترکسات (B-F) و دریافت کننده متوترکسات که به ترتیب با ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ mg/kg BW عصاره هیدروالکلی میوه تمشک تیمار شده است (H, G و I). در تصویر A و H تمامی اجزا آناتومیکی از قبیل توبول پروکسیمال، دیستال و گلومرول سالم به نظر می رسد. پیکان ها در B (آتروفی گلومرول و افزایش فضای ادراری)، (آپوپتوز و بهم ریختگی توبول ها)، E (هموراژی) و F (واکنش و پوسته پوسته شدن توبول ها)، آسیب ناشی از مصرف متوترکسات را نمایان می سازند. تنها اتساع توبولی، تجمع مواد ائوزینوفیل و حضور لنفوسیت ها در گروه ۷ و ۹ (گروه آسیب دیده با متوترکسات که به ترتیب با ۱۰۰، ۴۰۰ mg/kg BW عصاره هیدروالکلی تمشک تیمار شده است. تصویر G و I) به چشم می خورد در حالیکه تیمار این گروه ها با عصاره هیدروالکلی تمشک خصوصا دوز ۲۰۰ mg/kg BW (H) سبب بهبود علائم مذکور می گردد. رنگ آمیزی H&E (بزرگنمایی ۱۰۰X).

(۵). سمیت کلیوی طی رسوب متوترکسات یا متابولیت های نامحلول آن در توبول های کلیه یا اثرات سمی مستقیم متوترکسات بر توبول ها القا می شود. نکته قابل توجه طی درمان با متوترکسات در بیماران سنجش و کنترل آن ها از نظر سمیت ارگان هایی چون کبد، ریه، کلیه و مغز استخوان است. آسیب کلیوی القا شده توسط متوترکسات منجر به تاخیر افتادن و حفظ متوترکسات در کلیه و در نتیجه افزایش اثرات مضر آن می گردد (۲۱ و ۲۵). یکی از نشانه های تکوین نقص کلیوی ایجاد شده توسط متوترکسات افزایش سطوح اوره، کراتینین و اسیداوریک سرم

دارو در نابودی سلول های سرطانی، سمیت سلولی بالای متوترکسات مرگ سلول های طبیعی بدن را نیز در پی خواهد داشت و استفاده از آن خصوصا برای مدت طولانی و در دوزهای بالا خطر سمیت را افزایش می دهد. کبد و کلیه ها به عنوان اندام های اصلی بدن که در دفع مواد سمی نقش ایفا می کنند خود تحت تاثیر این سمیت قرار می گیرند (۲۲ و ۲۳). در واقع کلیه ها حدود ۱/۴ خروجی قلبی را دریافت می کنند و انتقال دهنده، متابولیزه کننده و متمرکز کننده سموم گوناگون هستند (۲۱ و ۲۴). بیش از ۹۰٪ متوترکسات بطور اولیه طی ترشح از کلیه ها پاک می شود

بخش های کلیه مشهود است چون این لوله ها جایگاه اولیه باز جذب و انتقال فعال می باشند که منجر به غلظت بالاتری از دارو در آستر اپی تلیالی این لوله ها می شود (۲۶). آسیب های مشاهده شده از قبیل بهم ریختگی و آپوپتوز توبولی، آتروفی گلومرول، اتساع لوله های پروکسیمال، اینفیلتراسیون سلول های التهابی منونوکلئر (لنفوسیت ها)، هموراژی و تجمع مواد ائوزینوفیلی در لومن برخی لوله ها با استفاده از دوز 200 mg/kg BW از عصاره هیدروالکلی میوه تمشک بهبود یافت. در کلیه مرگ از طریق آپوپتوز فرآیندی فیزیولوژیک است که در حفظ هومئوستاز حائز اهمیت است. آپوپتوز نه تنها نقش اصلی را در فرآیندهایی چون رشد و ترمیم کلیه ایفا می کند بلکه در بیماری های کلیوی انسان و سمیت کلیوی القا شده توسط داروها نیز نقش بسزایی دارد. همانطور که اشاره شده است اغلب داروهای نفروتوکسیک در کلیه ها متمرکز شده و دفع می شوند بنابراین طبیعی است که سلول های اپی تلیوم کلیه در سطوح بالا درگیر در فرآیند مرگ سلولی شوند. دو مسیر داخلی و خارجی می تواند درگیر در شروع آپوپتوز باشد تحقیقات این امر را ثابت کرده است که نفروتوکسین ها عمدتاً از طریق مسیر داخلی عمل میکنند. سیگنال های ایجاد شده توسط این داروها سرانجام در مسیر میتوکندریایی همگرا شده و سبب وقوع چندین فرآیند فیزیولوژیک همچون آزاد شدن کاسپازها (خصوصاً کاسپاز ۳ و ۹) می شوند که مقدمه ای برای وقوع مرگ سلولی است (۲۷).

در رابطه با مکانیسم آسیب های ایجاد شده باید به نقش رادیکال های آزاد اشاره کرد. رادیکال های آزاد طی متابولیسم طبیعی سلول های بدن تولید می شوند. تولید رادیکال های آزاد بیش از ظرفیت تدافعی آنتی اکسیدان ها موجب بروز استرس اکسیداتیو می گردد و سلامتی وابسته به تعادل میان استرس اکسیداتیو و دفاع آنتی اکسیدانی است (۲۰). مطالعات نشان داده که متوترکسات سبب کاهش آنزیم های آنتی اکسیدانی از جمله

خون است که خود می تواند موجب افزایش تمرکز متوترکسات در پلاسما و افزایش سمیت گردد (۵ و ۱۸).

آمونیاک در بدن از متابولیسم پروتئین ها حاصل و به منظور سم زدایی در کبد به اوره تبدیل می شود. میزان اوره در خون از طرفی به جیره غذایی و از طرف دیگر به وضعیت کارکرد کلیه ها وابسته است. این پروتئین ها لزوماً از پروتئین های رژیم غذایی نیستند بلکه می توانند از پروتئین های خود بدن نیز باشند زیرا به هنگام التهاب بافتی میزان اوره در بدن افزایش می یابد. علاوه بر این کاهش نرخ فیلتراسیون گلومرول نیز سبب افزایش اوره در خون خواهد شد. کراتینین بیشتر از ماهیچه اسکلتی مشتق و از راه کلیه دفع می گردد. چون حجم توده عضلانی هر فرد کم و بیش ثابت است زدایش کراتینین در جریان خون بدست کلیه ها صورت می گیرد و بنابراین اندازه گیری کراتینین در خون می تواند نشان دهنده کارکرد کلیه ها باشد بدین صورت که هرگاه کارکرد کلیه ها کاهش یابد میزان کراتینین در خون افزایش می یابد. اسیداوریک نیز همچون کراتینین توسط کلیه ها دفع می شود لذا در نارسایی کلیه میزان آن در خون افزایش می یابد بنابراین افزایش این فاکتورها طی مصرف متوترکسات نشانه ای از التهاب و آسیب کلیوی است و کاهش آن ها توسط عصاره هیدروالکلی میوه تمشک خصوصاً در دوز 200 mg/kg BW تاییدی بر نقش حفاظتی عصاره در برابر آسیب ایجاد شده توسط متوترکسات است (۵ و ۱۸). تغییرات بافتی مشاهده شده در کلیه تیمار شده با متوترکسات نیز کاملاً با تغییرات سطوح شاخص های عملکرد کلیه مطابقت نشان می دهد. کراتینین عموماً به عنوان یکی از قابل اطمینان ترین معرف های کارایی عملکرد کلیه در نظر گرفته می شود که سطح آن در تیمار با متوترکسات بطور معناداری ($p < 0.001$) افزایش یافت. این افزایش کراتینین و سایر شاخص های عملکرد کلیه با آسیب ساختمانی مشخص کلیه همراه بود که در مقاطع میکروسکوپی از بافت کلیه به خوبی مشخص می باشد. این آسیب

بهبود نفروپاتی حاصل از متوترکسات موثر است (۸، ۱۸).

یافته های این مطالعه نشان می دهد که مواجهه با متوترکسات منجر به تغییرات شیمیایی قابل ملاحظه در شاخص های عملکرد کلیه در خون و نیز آسیب مشخص بافت کلیه می شود و استفاده از عصاره هیدروالکلی میوه تمشک بخصوص در دوز ۲۰۰ mg/kg BW میتواند نقش حفاظتی در مقابل سمیت کلیوی ایجاد شده توسط متوترکسات ایفا کند.

تقدیر و تشکر

این تحقیق در مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه خوارزمی انجام شده و از حمایت دانشکده علوم زیستی در این دانشگاه برخوردار بوده است؛ لذا بدین وسیله از ریاست محترم دانشکده و تمامی عزیزانی که ما را در این طرح یاری رساندند تقدیر و تشکر بعمل می آوریم.

منابع

1. Al-Turkmani MR, Law T, Narla A, Kellogg M. D. Difficulty Measuring Methotrexate in a Patient with High-Dose Methotrexate-Induced Nephrotoxicity. *Clinical Chemistry*. 2010; 56(12):1792-1796.
2. Smolenska Z, Kaznowska Z, Zarowny D, Simmonds HA, Smolenski RT. effect of methotrexate on blood purin and pyrimidin levels in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 1999;38:997-1002.
3. Chan ESL, Cronstein BN. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Res*. 2002; 4:266-273.
4. Cutolo M, Sulli A, Pizzo C, Serio B, Straub R. Anti-inflammatory mechanisms methotrexate in rheumatoid Arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2001; 60:729-735.
5. Widemann BC, Adamson PC. Understanding and Managing Methotrexate Nephrotoxicity. *The Oncologist*. 2006; 11:694-703.
6. Uzkesera H, Senerb E, Bakanc E, Hacimuftuoglu A. Preventive role of mirtazapine in methotrexate induced nephrotoxicity in rats. *ScienceAsia*. 2012;38 :129-135.
7. Ghalayini IF, Al-Ghazo MA, Harfeil MNA. Prophylaxis and Therapeutic Effects of Raspberry (*Rubus idaeus*) on Renal Stone Formation in

کاتالاز، سوپراکسید دسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و همچنین گلوتاتیون شده و در عوض سبب افزایش مالونیل دی آلدئید (MDA) شده که یک مارکر استرس اکسیداتیو است و در طول پراکسید شدن لیپید غشای سلولها از بافت خارج می گردد و در نتیجه مانع از کارکرد صحیح کلیه شده و غلظت فاکتورهای دفعی کلیه در سرم خون افزایش می یابد؛ بنابراین استرس اکسیداتیو توسط اندازه گیری سطوح MDA سنجش می گردد (۷ و ۱۸). آنتوسیانین ها مهارکننده قوی فعالیت رادیکال های آزاد در مقایسه با سایر فلاونوئیدها هستند، مطالعات گذشته رادیکال های آزاد را در نفروتوکسیسیتی ایجاد شده توسط متوترکسات عامل بسیار مهمی قلمداد کرده اند (۲۸). موازی با این امر اثرات حفاظتی آنتوسیانین ها بر علیه کارسینوژن ها در محیط *in-vivo* و *in-vitro* به اثبات رسیده است (۸). توت و تمشک حاوی مقادیر بالایی از آنتوسیانین ها هستند که میتواند اثرات مفیدی بر سلامتی داشته باشد. این امر در ارتباط با ویژگی های آنتی اکسیدانی، ضدالتهابی و فعالیت پیشگیری دارویی آنهاست (۲۹). آنتوسیانین ها اگر در دوز ایده آل مصرف شوند کاهش تکثیر سلولی، التهاب، آنژیوژن و همچنین القای آپوپتوز را در پی خواهند داشت در واقع طی مطالعات گذشته مشخص شده است که فعالیت ضد سرطانی و ضد التهابی آنتوسیانین ها ممکن است ناشی از بلوکه کردن مسیر پروتئین کیناز و مسیر NF- κ B و بیان ژن سیکلواکسیژناز در سلولها باشد و علاوه بر این آنتوسیانین ها توسط فعال کردن رادیکال های آزاد آپوپتوز را در سلول های سرطانی القا می کنند (۱۴ و ۲۹). مطالعات نشان داده که متوترکسات سبب افزایش مارکرهای استرس اکسیداتیو از جمله کاهش آنزیم های آنتی اکسیدانی میشود به نظر می رسد که عصاره هیدروالکلی تمشک با دارا بودن آنتی اکسیدان های فراوان از جمله cyanidin-3-O-glucoside و cyanidin-3-O-rutinoside و از طریق مهار استرس اکسیداتیو مانع از پراکسید شدن لیپید غشای سلول و تخریب بافتی کلیه شده است و بدین طریق در

- Research. 1989;49:6337-6341.
20. Kahraman H, Bakan V, Kurutas E, Tokur M, Koksall N, Ciralik H. Effects of erythropoietin on methotrexate induced lung injury in rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012; 6(48):3280-3284.
 21. Dalaklioglu S, Sahin P, Gungor Ordueri E, Celik-Ozenci C, Tasatargil A. Potential Role of Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) Activation in Methotrexate-Induced Nephrotoxicity and Tubular Apoptosis. *International Journal of Toxicology*. 2012;31(5): 430-440.
 22. Chelab KG, Majeed SKH. Methotrexate-induced histopathological changes in the kidneys of mice., Supplement II. 2009; 23:219-222.
 23. Amin Ba, Hosseinzadeh H. Evaluation of aqueous and ethanolic extracts of saffron, *Crocus sativus* L., and its constituents, safranal and crocin in allodynia and hyperalgesia induced by chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. *Fitoterapia*. 2012;83(5):888-895.
 24. Loh AH, Cohen AH. Drug-induced Kidney Disease – Pathology and Current Concepts. *Ann Acad Med Singapore*. 2009;38:240-50.
 25. Abdul-Wahab FKH, Al-Shawi ND, Ismael DK. Effects of different concentrations of aqueous green tea extract against methotrexate-induced nephrotoxicity in rats. *Iraq J Pharm*. 2011;11(1):1-13.
 26. Alarifi S, Al-Doaiss A, Alkahtani S, Al-Farraj SA, Al-Eissa MS, Al-Dahmash B, et al. Blood chemical changes and renal histological alteration induced by gentamicin in rats. *saucijournal of biological sciences*. 2012;19:103-110.
 27. Servais H, Ortiz A, Devuyst O, Denamur S, Tulkens PM. Renal cell apoptosis induced by nephrotoxic drugs: cellular approaches to modulation. *Apoptosis*. 2008;13:11-32.
 28. Bowen-Forbes CS, Zhang Y, Nair MG. Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2010;23:554-560.
 29. Naghizadeh B, Mansouri SMT, Vahdati Mashhadian N. Crocin attenuates cisplatin-induced renal oxidative stress in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48:2650-2655.
 - Balb/c mice. *International Braz J Urol*. 2011;37:259-267.
 8. Zikri NN, Riedl KM, Wang L, Lechner JF, Schwartz SJ, et al. Black Raspberry Components Inhibit Proliferation, Induce Apoptosis and Modulate Gene Expression in Rat Esophageal Epithelial Cells. *Nutr Cancer*. 2009; 61(6): 816-826.
 9. Jean-Gilles D, Li L, Ma H, Yuan T, Chichester CO, Seeram NP. Inflammatory Effects of Polyphenolic-Enriched Red Raspberry Extract in an Antigen Induced Arthritis Rat Model. *J Agric Food Chem*. 2011;60(23):5755-62.
 10. Mishra KP, Ganju L, Sairam M, Banerjee PK, Sairam M. A review of high throughput technology for the screening of natural products. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2008; 62(2): 94-98.
 11. Dawidowicz AL, Wianowska D, Baraniak B. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). *Journal of LWT-Food Science and Technology*. 2006;39(3): 308-315.
 12. Marquina MA, Corao GM, Araujo L, Buitrago D, Sosa M. Hyaluronidase inhibitory activity from the polyphenols in the fruit of blackberry (*Rubus fruticosus* B.). *Journal of Fitoterapia*. 2002; 73(7-8): 727-729.
 13. Moyer RA, Hummer KE, Finn CE, Frei B, Wrolstad RE. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2002; 50: 519-525.
 14. Wang L, Hecht SS, Carmella SG, Yu N, Larue B, Henry C, et al. Anthocyanins in Black Raspberries Prevent Esophageal Tumors in Rats. *Cancer Prev Res*. 2009;2:84-93.
 15. Koca I, Karadeniz B. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea region of Turkey. *Journal of Scientia Horticulturae*. 2009; 121(4): 447-450.
 16. Liu Y, Liu M, Li B, Zhao J, Zhang CP, Lin LQ, et al. Fresh raspberry phytochemical extract inhibits hepatic lesion in a Wistar rat model. *Nutrition & Metabolism*. 2010; 7(84):1-8.
 17. Kahraman H, Kurutaş E, Tokur M, Bozkurt S, Ciralik H, Kabak B, et al. Protective Effects of Erythropoietin and N-Acetylcysteine on Methotrexate-Induced Lung Injury in Rats. *Balkan Med J*. 2013; 30: 99-104.
 18. Asvadi I, Hajipour B, Asvadi A, Asl NA, Roshangar L, Khodadadi A. Protective effect of pentoxifylline in renal toxicity after methotrexate administration. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2011;15:1003-1009.
 19. Ermens AM, Schoester M, Spijkers LM, Lindemans J, Abels J. Toxicity of Methotrexate in Rats Preexposed to Nitrous Oxide. *Cancer*

Evaluation of protective effect of hydro-alcoholic extract of raspberry fruit on the methotrexate-induced nephrotoxicity in male Wistar rats

***Homa Mohseni Kouchesfehani**, Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran (*Corresponding author). kouchesfehani@yahoo.com

Saeideh Khoshnoud, Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.

Mohammad Nabiuni, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.

Abstract

Background: Methotrexate (MTX) is an antimetabolite chemotherapeutic agent commonly prescribed for various cancers and autoimmune diseases. Despite its considerable therapeutic effects, nephrotoxicity is an important side-effect of treatment with MTX. Raspberry fruit is able to protect biological systems from the harmful effects of free radicals. The purpose of this study was to study the effect of hydro-alcoholic extract of raspberry fruit on the methotrexate-induced nephrotoxicity.

Methods: 54 male Wistar rats were divided into 9 groups: group 1 (control), group 2 sham (normal saline 0.3ml/day), group 3 received a single dose of methotrexate (20mg/kg BW) at the 3rd day, groups 4–6 received raspberry extract (100, 200, 400 mg/kg BW, respectively) for 10 consecutive days. Groups 7-9 received raspberry extract (100, 200, 400mg/kg BW, respectively) for 10 consecutive days and at the 3rd day 1h after injection of raspberry extract, a single dose of methotrexate (20mg/kg BW) was applied. All injections were performed intraperitoneally. At day 11, rats were killed and blood serum and kidney of all groups were collected in order to investigate the histological and serologic changes and for the statistical analysis from INSTAT3 and one-way ANOVA test were used and charts was drawn through the EXCEL software

Results: A significant increase in the levels of serum urea, creatinine and uric acid along with renal tissue damage in the group receiving methotrexate was observed. While treating with raspberry fruit extract ameliorated the symptoms in methotrexate treated rats.

Conclusion: According to the results of this study raspberry extract has protective effects against nephrotoxicity induced by methotrexate.

Keywords: Raspberry, Nephrotoxicity, Methotrexate.