



دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی

عنوان:

# اثر پیشگیری عصاره آبی-الکلی سیاه دانه بر سمیت کلیوی و آسیب اکسیداتیو ناشی از سیس پلاتین در کلیه موش صحرایی

استاد راهنما:

دکتر ابوالفضل خواجوی راد

استاد مشاور:

دکتر موسی الرضا حاج زاده

دکتر نعمت محمدیان روشن

ارائه دهنده:

سارا حسینیان

شماره پایان نامه: ۳۱۳-آ

شهریور ماه ۱۳۹۰

«حق هرگونه انتشار و بهره‌برداری از نتایج این پایان نامه برای دانشکده پزشکی مشهد محفوظ است»

## چکیده

**مقدمه:** سیس پلاتین یکی از داروهای مهم ضد سرطان است که در درمان تومورها از جمله سرگردن، بیضه، تخمدان و ریه مفید است. عارضه جانبی مهم این دارو سمیت کلیوی است که محدودیت استفاده از آن را سبب گشته است. استرس اکسیداتیو، استرس نیتروژاتیو، التهاب و آپوپتوز نقش مهمی در ایجاد سمیت کلیوی ناشی از سیس پلاتین ایفا می کنند. سیاه دانه گیاهی علفی و یک ساله است که بطور سنتی در درمان بسیاری از بیماری ها از جمله سردرد، برونشیت، آگزما و آنفلوانزا استفاده می شده است و دارای خواص فارماکولوژیکی زیادی مانند اثر ضد دیابتی، ضد التهابی، آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد سرطان می باشد و در این بررسی از سیاه دانه بدلیل اثرات ضد التهابی و آنتی اکسیدانی و نیز ارزان و در دسترس بودن آن استفاده شده است. در این مطالعه در ادامه مطالعه قبلی که اثرات درمانی سیاه دانه را بررسی کرده است، اثرات پیشگیری و پیشگیری-درمان عصاره آبی-الکلی سیاه دانه و ویتامین E بر سمیت کلیوی ایجاد شده توسط سیس پلاتین بررسی شد.

**روش کار:** ۱۱۰ موش صحرایی نر نژاد ویستار بطور تصادفی به یازده گروه تقسیم شدند: ۱- کنترل، ۲- سیس پلاتین (۶ mg/kg)، ۳- ویتامین E (100 mg/kg)، ۴- سیاه دانه ۱۰۰ mg/kg، ۵- سیاه دانه ۲۰۰ mg/kg، ۶- پیشگیری ویتامین E (100 mg/kg) به همراه سیس پلاتین، ۷- پیشگیری سیاه دانه ۱۰۰ mg/kg به همراه سیس پلاتین، ۸- پیشگیری سیاه دانه ۲۰۰ mg/kg به همراه سیس پلاتین، ۹- پیشگیری-درمان ویتامین E (100 mg/kg) به همراه سیس پلاتین، ۱۰- پیشگیری-درمان عصاره سیاه دانه ۱۰۰ mg/kg به همراه سیس پلاتین، ۱۱- پیشگیری-درمان عصاره سیاه دانه ۲۰۰ mg/kg به همراه سیس پلاتین. مدت زمان مطالعه یازده روز و تمام تجویزها به شکل داخل صفاقی بود. در تمام گروه ها تزریق داخل صفاقی سیس پلاتین در روز ششم آزمایش انجام شد. تجویز عصاره در گروه های پیشگیری از روز صفر تا روز پنج و در گروه های پیشگیری-درمان از روز صفر تا روز یازده انجام شد. در روزهای صفر و دوازده نمونه سرم و ادرار و نیز در پایان تحقیق کلیه های حیوان جمع آوری شد. غلظت های سرمی اوره، کراتینین، گلوکز، آلبومین، سدیم، پتاسیم، اسمولاریته، مالون دی آلدئید و میزان تام گروه های تیول و همچنین غلظت های ادراری گلوکز، آلبومین و اسمولاریته، برون ده ادراری، میزان فیلتراسیون گلومرولی، کلیرانس اوره و دفع ادراری گلوکز، آلبومین، سدیم، پتاسیم و اسمولاریته تعیین شد. کلیه از نظر ایندکس کلیوی، آسیب شناسی و مارکهای اکسیداسیون-احیا نیز بررسی شد.

**نتایج:** در مقایسه با روز دوازده گروه شاهد، غلظت های سرمی اوره، کراتینین و اسمولاریته پلاسما، گلوکز ادرار، دفع ادراری گلوکز و سدیم، برون ده ادراری، ایندکس کلیوی و آسیب بافتی کلیه در روز دوازده گروه سیس پلاتین افزایش معنی دار داشت. میزان فیلتراسیون گلومرولی، کلیرانس اوره، آلبومین سرم، اسمولاریته ادرار، دفع ادراری اسمولاریته و میزان تام گروه های تیول سرم و بافت کلیه در روز دوازده گروه سیس پلاتین، نسبت به روز دوازده گروه شاهد کاهش معنی دار نشان داد. دفع ادراری اسمولاریته، سدیم و گلوکز در گروه های پیشگیری دریافت کننده عصاره به همراه سیس پلاتین، کراتینین سرم، دفع ادراری سدیم و گلوکز، برون ده ادراری و ایندکس کلیه در گروه های پیشگیری-درمان دریافت کننده عصاره به همراه سیس پلاتین، اوره و کراتینین سرم، کلیرانس اوره و کراتینین، دفع ادراری اسمولاریته و ایندکس کلیه در گروه پیشگیری-درمان ویتامین E به همراه سیس پلاتین نسبت به گروه سیس پلاتین بهبود نشان داد. همچنین آسیب شناسی کلیه در تمام گروه های دریافت کننده عصاره و ویتامین E همراه با سیس پلاتین نسبت به گروه سیس پلاتین بهبود قابل ملاحظه ای نشان داد.

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از عصاره هفتاد درصد آبی-الکلی سیاه دانه و همچنین ویتامین E با مقادیر مورد استفاده در این مطالعه موجب بهبود نسبی تست های عملکردی کلیه، آسیب شناسی و آسیب اکسیداتیو کلیه می شود. البته مکانیسم و نحوه تاثیر عصاره سیاه دانه در کاهش ضایعات سمی سیس پلاتین روی کلیه نیازمند مطالعات بیشتر است.

**کلمات کلیدی:** سیس پلاتین، سیاه دانه، ویتامین E، نارسایی کلیه، استرس اکسیداتیو، سمیت کلیوی.



دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی

عنوان:

**بررسی اثر توام عصاره های آبی-الکلی زردچوبه و سیاه دانه بر پروتئینوری و آسیب اکسیداتیو ناشی از آدریامایسین در کلیه موش صحرایی**

استاد راهنما:

**دکتر ابوالفضل خواجوی راد**

استاد مشاور:

**دکتر محمد ناصر شافعی**

**دکتر محمد سوختانلو**

ارائه دهنده:

**رضا محبتی**

شماره پایان نامه:

بهمن ماه ۱۳۹۳

## چکیده

**مقدمه:** آدریامایسین یکی از داروهای مهم ضد سرطان است که در درمان تومورها از جمله سرگردن، بیضه، پروستات و مثانه استفاده می شود. از عوارض مهم این دارو پروتئینوری و سمیت کلیوی است که محدودیت استفاده از آن را سبب گشته است. استرس اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز نقش مهمی در ایجاد پروتئینوری و سمیت کلیوی ناشی از آدریامایسین ایفا می کنند. زردچوبه و سیاه دانه گیاهانی علفی و یک ساله اند که بطور سنتی در درمان بسیاری از بیماری ها استفاده می شده اند و دارای خواص فارماکولوژیکی زیادی مانند اثرات ضد دیابتی، ضد التهابی، آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد سرطان می باشند. در این مطالعه اثر عصاره هیدروالکلی زردچوبه و سیاه دانه بصورت جداگانه و توأم بر پارامترهای سرمی وادراری، پروتئینوری، استرس اکسیداتیو و آسیب کلیوی ناشی از آدریامایسین بررسی شده است.

**روش کار:** ۸۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار بطور تصادفی به ده گروه تقسیم شدند: ۱- شاهد، ۲- آدریامایسین (mg/kg) 5، 3- ویتامین C (100 mg/kg)، 4- سیاه دانه 200 mg/kg، 5- زردچوبه 1000 mg/kg، 6- ویتامین C (100 mg/kg) + آدریامایسین، 7- سیاه دانه 200 mg/kg + آدریامایسین، 8- زردچوبه 1000 mg/kg + آدریامایسین، 9- عصاره توأم زردچوبه و سیاهدانه به ترتیب 1000 mg/kg و 200 mg/kg و 10- عصاره توأم زردچوبه و سیاهدانه به ترتیب 1000 mg/kg و 200 mg/kg + آدریامایسین. مدت زمان مطالعه ۳۵ روز بود بدین صورت که حیوانات به مدت ۶ روز عصاره ها را بصورت خوراکی دریافت و در روز ۷ آدریامایسین بصورت داخل وریدی تجویز و بعد از آن نیز به مدت بیست و هشت روز عصاره ها تجویز شدند. در روزهای ۱۰، ۱۴، ۲۱، ۲۸ و ۳۵ نمونه سرم و ادرار جمع اوری و غلظت های سرمی اوره، کراتینین، گلوکز، آلبومین، اسمولاریته و همچنین غلظت های ادراری گلوکز، آلبومین و اسمولاریته، برون ده ادراری، میزان فیلتراسیون گلومرولی (GFR)، کلیرانس اوره و دفع ادراری گلوکز، آلبومین و اسمولاریته تعیین شد. در پایان مطالعه کلیه های حیوان برداشته و از نظر ایندکس کلیوی، آسیب کلیوی و مارکرهای اکسیداسیون- احیا شامل گروههای تیول (-SH)، مالون دی آلدئید (MDA) و سوپر اکسید دسموتاز مورد بررسی قرار گرفتند.

**نتایج:** این مطالعه نشان داد که آدریامایسین اثر معنی داری بر کراتینین، اوره و اسمولاریته سرمی نداشته ولی باعث کاهش غلظت سرمی البومین، افزایش کلسترول سرم، کاهش گلوکز سرم و کاهش GFR نسبت به روز صفر شده است. تجویز هر دو عصاره باعث بهبود آلبومین سرم نسبت به آدریامایسین شده و اثر توأم بیشتر بوده است. غلظت کلسترول سرمی توسط عصاره کاهش نیافته و نسبت به قبل از تزریق افزایش معنی داری داشته است. در بررسی ادراری آدریامایسین اثر بارزی بر گلوکز، کلیرانس، اوره، برونده ادراری نداشته است. عصاره زردچوبه باعث افزایش برونده ادراری نسبت به قبل از تزریق شده است. افزایش پروتئین ادراری ناشی از آدریامایسین توسط عصاره ها کاهش یافته و این اثر در تجویز توأم عصاره ها موثرتر بوده است. میزان GFR ایندکس کلیه توسط آدریامایسین افزایش یافته که عصاره ها تاثیری بر آن نداشته اند. آسیب کلیوی ناشی از آدریامایسین نیز توسط عصاره ها بهبود یافته است. میزان تام گروه های تیول، مالون دی آلدئید و فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز در بافت کلیه در روز سی و پنج گروه آدریامایسین، نسبت به همان روز گروه شاهد کاهش معنی دار نشان داد. آسیب کلیوی در تمام گروه های آدریامایسینی دریافت کننده عصاره ها و ویتامین C نسبت به گروه آدریامایسین بطور معنی داری کاهش نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از عصاره های آبی- الکلی سیاهدانه و زردچوبه موجب بهبود تست های عملکردی کلیه، آسیب کلیوی و آسیب اکسیداتیو ناشی از آدریامایسین در کلیه می شوند. مکانیسم این گیاهان روی کاهش اثرات کلیوی ناشی از آدریامایسین مشخص نیست و نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

**کلمات کلیدی:** آدریامایسین، سیاه دانه، زردچوبه، ویتامین C، پروتئینوری، استرس اکسیداتیو.

## Abstract

**Background:** Adriamycin (ADR) is one of the important anti-cancer drugs that use in treatment of head and neck, testis, prostate and bladder tumors. Proteinuria and nephrotoxicity are important side effects of Adriamycin that develop by Oxidative stress, inflammation and apoptosis. Curcuma Longa (C. Longa) and nigella sativa (N. sativa) are annual herbaceous plants traditionally have been used in the treatment of many diseases. Several pharmacological effects such as anti-diabetes, anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-bacterial and anti-cancer also have been reported for these plants. In the current study the effects of hydroalcoholic extracts of C. Longa and N Sativa on ADR-induced proteinuria and oxidative stress and tissue injuries of the kidney have been investigated.

**Method:** 80 male Wistar rats were randomly divided into 10 groups: 1-control 2-Adriamycin(5 mg/kg,IV) 3-Vit C(100mg/kg) 4-N. Sativa(200 mg/kg) 5- C. Longa(1000mg/kg) 6-Vit C (100 mg/kg) + ADR(5 mg/kg) 7-N. Sativa 200mg/kg + ADR 8- C. Longa 1000mg/kg + Adriamycin 9- C. Longa1000mg/kg + N. Sativa 200mg/kg 10- C. Longa1000mg/kg +N. Sativa 200mg/kg+ ADR .

Extracts were given orally for 35 days and ADR was administered intravenously on day 7. The extract administrated in 6 days before and 28 days after the injection of ADR. On days 0,6,10,14,21,28 and 35, serum and urine samples were collected and at the end of the experiments the kidneys were removed. Serum concentration of urea, creatinine, glucose, albumin and osmolarity and the urine concentration of glucose, albumin and osmolarity, urine output, GFR, urea clearance and urinary excretion of glucose, albumin and osmolarity were determined. In end of experiment kidneys were removed for renal index, pathology and oxidative stress markers including malon dialdehyde, total thiol groups and superoxide dismutase were evaluated.

**Results:** Serum concentration of Cr, urea and osmolarity did not changed compare to control group. However, serum albumin concentration decreased, cholesterol level increased, serum glucose and GFR decreased compare to control group. Both C. Longa and N. Sativa extracts increased albumin concentration compare to the day 0 and this effect is higher in co-administration of extracts. Cholesterol concentration increased by both extract compare to ADR group. The glucose of urine, clearance of urea did not changed in ADR group. Proteinuria due to ADR decreased by both extracts and this effect potentiate by co-administration of extracts. Tissue injuries of the kidney significantly were decreased by extracts. The MDA, total thiol and

superoxide dismutase activity in kidney on day 35 in Adriamycin group was significantly decreased compared to day 35 in control group .

**Conclusion:** The results of present study showed that the hydro-alcoholic extracts of *C. Longa* and *N. Sativa* improved renal functional test, pathological and oxidative stress dysfunction tests induced by ADR administration. Mechanism(s) of the effects these plants on decreasing the renal ADR toxic effect is not clarified and requires further investigations.

**Keywords:** Adriamycin, *Nigella Sativa*, *Curcuma Longa*, Vitamin C. Proteinuria, Oxidative Stress



دانشکده پزشکی

## پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد فیزیولوژی

عنوان:

بررسی اثرات عصاره الکلی سیاهدانه بر مدل

ایسکمی - رپرفیوژن در کلیه رت

اساتید راهنما:

دکتر ابوالفضل خواجوی راد

دکتر موسی الرضا حاج زاده

اساتید مشاور :

دکتر نعما محمدیان

دکتر حمیدرضا صادق نیا

ارائه دهنده :

شهرزاد هواخواه

شهریور ماه ۱۳۸۹

شماره پایان نامه :

## چکیده

آسیب ایسکمی - رپرفیوژن کلیوی باعث ایجاد نارسایی حاد کلیوی می شود. هیپوکسی، التهاب و استرس اکسیداتیو در فرایند پیچیده پاتوفیزیولوژیک آسیب کلیوی نقش دارند. ثابت شده که سیاهدانه دارای اثرات فارماکولوژیک متعددی از جمله فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد التهابی است. مطالعات محدودی از اثر سیاهدانه بر آسیب ایسکمی - رپرفیوژن کلیوی وجود دارد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثرات احتمالی سیاهدانه بر آسیب ایسکمی - رپرفیوژن کلیوی در رت می باشد.

### روش کار

۴۸ رت نر از نژاد ویستار بطور تصادفی به گروه های زیر تقسیم شدند: کنترل، ایسکمی - رپرفیوژن، پیشگیری ۱۵۰ ((عصاره ۱۵۰ mg/kg) + ایسکمی - رپرفیوژن)، پیشگیری ۳۰۰ ((عصاره ۳۰۰ mg/kg) + ایسکمی - رپرفیوژن)، درمان ۱۵۰ ((عصاره ۱۵۰ mg/kg) + ایسکمی - رپرفیوژن) و درمان ۳۰۰ ((عصاره ۳۰۰ mg/kg) + ایسکمی - رپرفیوژن). در تمام گروه ها مراحل زیر بترتیب انجام شد: ۱) فاز کنترل (بدون بستن شریان های کلیوی - ۶۰ دقیقه، ۲) فاز ایسکمی (بستن دوطرفه شریان های کلیوی - ۴۰ دقیقه)، ۳) رپرفیوژن ۱ (باز کردن شریان های کلیوی - ۹۰ دقیقه) و ۴) رپرفیوژن ۲ (در ادامه فاز قبل - ۹۰ دقیقه). در گروه کنترل بستن شریان ها انجام نشد. نمونه های سرم و ادرار در انتهای هر فاز جمع شد. در انتها رت ها کشته و کلیه ها برداشته شد. اوره، کراتینین، گلوکز، آلبومین، سدیم و پتاسیم سرم اندازه گیری شد. GFR و آزمایشات بیوشیمیایی ادرار مثل غلظت و کسر تصفیه اوره، گلوکز، پروتئین، سدیم و پتاسیم ادرار اندازه گیری و محاسبه شد. میزان استرس اکسیداتیو بافت و فشارخون متوسط شریانی اندازه گیری شده و بررسی بافت شناسی و آزمون کامت نیز انجام شد.

### نتایج

اوره و کراتینین سرم در گروه ایسکمی بیشتر از کنترل و در گروه های پیشگیری و درمان کمتر از ایسکمی بود. تست های عملکرد کلیوی (GFR) در گروه ایسکمی کمتر از کنترل و در سایر گروه ها بیشتر از ایسکمی بود. میزان گروه های تام تیول در تمام گروه ها بخصوص پیشگیری ۱۵۰ کمتر از ایسکمی بود. همچنین غلظت MDA بافت در گروه های پیشگیری کمتر از ایسکمی، اما در گروه درمان ۳۰۰ بیشتر از ایسکمی بود.

ظاهر بافت شناسی در گروه ایسکمی آسیب بافتی شدیدی را نشان داد، در حالیکه گروه هایی که عصاره دریافت کرده بودند ظاهر نزدیک به نرمالی داشتند، اما آسیب بافتی در گروه پیشگیری ۳۰۰ از ایسکمی هم بیشتر بود. آزمون کامت نیز اثر محافظتی سیاهدانه را بر آسیب ژنومی نشان داد. در هر دو مطالعه فوق در گروه درمان ۱۵۰ اثر بهتری دیده شد.

### بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درمان با سیاهدانه قبل و بعد از ایسکمی اثر محافظتی بر بافت کلیه دارد که احتمالاً با مقدار، زمان و راه تجویز آن مرتبط است. این اثرات ممکن است ناشی از خصوصیات آنتی اکسیدانی آن باشد.

**کلمات کلیدی:** ایسکمی - رپرفیوژن کلیوی، کلیه، سیاهدانه، عصاره اتانولی، رت.



## **Abstract**

**Background:** *Renal ischemia followed by reperfusion leads to acute renal failure. Hypoxia, inflammation and oxidative stress are involved in complex pathophysiologic processes of renal damage. Nigella sativa (NS) has been subjected to several pharmacological investigations that have revealed its antioxidant and anti-inflammation activities in different conditions. There are a few previously reported studies about NS effect on ischemia- reperfusion (I/R) injury of kidneys. The aim of this study was to investigate the possible acute effects of NS seeds on I/R-induced renal injury in rats.*

**Methods: Extract preparation?** *Forty eight male Wistar rats were randomly assigned to one of the following groups: control, I/R, Preventive 150 ((NS extract 150 mg/kg Bw) + I/R), Preventive 300 ((NS extract 300 mg/kg) +I/R), Treatment 150 (I/R + (NS extract 150 mg/kg)), Treatment 300 (I/R + (NS extract 300 mg/kg)). Each group went through 4 phases: 1) control phase (without ligation of renal arteries; 60 min), 2) Ischemic phase (bilateral ligation of renal arteries; 40 min), 3) Reperfusion 1 (release of renal arteries ligation; 90 min) and 4) Reperfusion 2 (following of reperfusion 1 phase; 90 min). Duration of experimental phases in control group was as the same as other groups except ligation of renal arteries. Urine and serum samples were collected at the end of each phase. All rats were then killed and kidneys were removed. Serum urea, creatinine, glucose, albumin, sodium, potassium were determined. GFR and urine biochemicals e.g. urine concentration of urea, glucose, protein, sodium, potassium and urinary excretion rate were also determined. Tissue oxidants and antioxidants also were determined*

for all groups. Histopathological study, comet assay and mean arterial pressure (MAP) measurement were also carried out.

**Results-**mention which data had significant difference? -: Serum urea and creatinine concentrations in ischemic group were higher than control group but in preventive and treatment groups were lower than ischemic group. Renal function tests (GFR) in ischemic group were lower than control group while, in preventive and treatment groups were higher than ischemic group. Tissue total sulphhydryl (-SH) was lower in all groups than Ischemic group, specially in preventive 150. MDA concentration in preventive groups was also lower than Ischemic group but in treatment 300 was more than Ischemic group. In histopathological study, the kidneys of untreated ischemic rats had a higher histopathological score, while pre- and post-treatment with NS extract nearly preserved the normal morphology of the kidneys, although there was a reverse effect in preventive group with high dose (300). Comet assay also showed protective effect of NS extract against genomic injury. In both histopathological examination and comet assay, the effect of treatment with 150 mg/kg ( ) was significant.

**Conclusions:** The results of present study shows that pre- and post- treatment with NS seeds extract has acute protective effects against renal ischemic-reperfusion injury which is probably dose and time-dependent. These effects are probably mediated via antioxidant and immunomodulatory properties of the NS seeds extract.

**Keyword:** Renal ischemia-reperfusion, Kidney, *Nigella sativa*, Ethanolic extract, Rat, comet assay, renal clearance study.



دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی

عنوان:

اثر عصاره آبی - الکلی بارهنگ بر سمیت کلیوی و آسیب اکسیداتیو ناشی از سیسی پلاتین در کلیه موش  
صحرائی

استاد راهنما:

دکتر ابوالفضل خواجوی راد

استاد مشاور:

دکتر موسی الرضا حاج زاده

دکتر محمد سوختانلو

ارائه دهنده:

صغری پرهیزگار

شماره پایان نامه: .....

اسفند ماه ۱۳۹۲

«حق هرگونه انتشار و بهره‌برداری از نتایج این پایان نامه برای دانشکده پزشکی مشهد محفوظ است»

## چکیده

**مقدمه:** سیس پلاتین<sup>۱</sup> یکی از مهم ترین داروهای شیمی درمانی است که به طور وسیعی در درمان انواع سرطان ها مانند کانسر بیضه، تخمدان، سر و گردن، مثانه و ریه کاربرد دارد. اگرچه استفاده از آن به علت سمیت کلیوی محدود شده است. سیس پلاتین توسط مکانیسم های مختلفی شامل هایپوکسی، تولید رادیکال های آزاد، التهاب و آپوپتوز موجب آسیب توبولی می شود. بارهنگ گیاهی یک ساله از تیره پلانٹاژیناسه<sup>۲</sup> است. بارهنگ بطور سنتی در درمان بسیاری از بیماری ها از جمله بیماریهای پوستی، عفونی، اختلالات گوارشی، تنفسی، گردش خون و سیستم تولید مثل استفاده می شود. از فعالیت های بیولوژیکی بارهنگ می توان به اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد دردی، آنتی هیستامینی، تنظیم کننده سیستم ایمنی، ضد میکروب، ضد تومور، ضد زخم اشاره کرد. هدف از این مطالعه بررسی اثر حفاظتی عصاره ابی الکلی بارهنگ بر نارسایی کلیه ناشی از سیس پلاتین در موش صحرایی است.

**روش کار:** ۱۰۰ موش صحرایی نر نژاد ویستار بطور تصادفی به ده گروه تقسیم شدند: (۱) کنترل سالم (۲) سیس پلاتین (۳ 7mg/kg) کنترل مثبت ویتامین E 100mg/kg به همراه سیس پلاتین (۴) کنترل ویتامین E 100mg/kg بدون سیس پلاتین (۵) عصاره ۷۰٪ الکلی بارهنگ 300mg/kg به همراه سیس پلاتین (۶) عصاره ۷۰٪ الکلی بارهنگ 600mg/kg به همراه سیس پلاتین (۷) عصاره ۷۰٪ الکلی بارهنگ 1200mg/kg به همراه سیس پلاتین (۸) عصاره ۷۰٪ الکلی بارهنگ 300mg/kg بدون سیس پلاتین (۹) عصاره ۷۰٪ الکلی بارهنگ 600mg/kg بدون سیس پلاتین (۱۰) عصاره ۷۰٪ الکلی بارهنگ 1200mg/kg بدون سیس پلاتین. سیس پلاتین تک دوز به میزان 7mg/kg به صورت داخل صفاقی<sup>۴</sup> در روز ششم مطالعه تزریق شد. رت ها در گروه های عصاره، عصاره بارهنگ به صورت خوراکی به مدت ۲۱ روز و در گروه های ویتامین E به صورت داخل صفاقی به مدت ۲۱ روز ویتامین E دریافت کردند. تمام موش های صحرایی یک روز قبل از تزریق سیس پلاتین، سه روز و نه روز بعد از تزریق سیس پلاتین در قفس متابولیک<sup>۵</sup> قرار گرفته و ادرار ۲۴ ساعته جمع آوری و نمونه خون از طریق سینوس چشمی گرفته شد. شش روز و دوازده روز بعد از تزریق سیس پلاتین نیز نمونه خون از طریق سینوس چشمی گرفته شد. در پایان دوره آزمایش روز بیست و یکم مجدداً موش های صحرایی در تمام گروه ها وزن شده، در قفس متابولیک قرار گرفتند و ادرار ۲۴ ساعته جمع آوری شد و سپس موش های صحرایی با اتر بیهوش شده و پس از خون گیری از قلب، کلیه ها خارج شده و بررسی مارکهای استرس اکسیداتیو شامل گروههای تیول (SH-) و مالون دی آلدئید<sup>۶</sup> (MDA)، آنزیمهای کاتالاز<sup>۷</sup> و سوپراکسید دسموتاز<sup>۸</sup> و ایندکس کلیه مورد بررسی قرار گرفت. غلظت های اوره، کراتینین، گلوکز، آلومین، سدیم، پتاسیم و همچنین غلظت های گلوکز، اسمولاریته و پروتئین ادرار و نیز برون ده ادراری، میزان فیلتراسیون گلومرولی، کلیرانس اوره و دفع ادراری گلوکز، پروتئین، سدیم، پتاسیم و اسمولاریته تعیین شدند.

**نتایج:** غلظت های سرمی اوره، کراتینین، اسمولاریته، گلوکز ادرار، برون ده ادراری، ایندکس کلیوی و آسیب بافتی کلیه در گروه سیس پلاتین در مقایسه با گروه کنترل سالم افزایش معنی دار داشت. میزان فیلتراسیون گلومرولی، کلیرانس اوره، کراتینین و پتاسیم سرم، دفع ادراری اسمولاریته و پروتئین، آنزیم سوپراکسید دسموتاز بافت کلیه در گروه عصاره با دوز ۳۰۰ به همراه سیس پلاتین، میزان

<sup>۱</sup> -Cisplatin

<sup>۲</sup> -Plantago Major

<sup>۳</sup> - Plantaginacace

<sup>۴</sup> -Intra Peritoneal

<sup>۵</sup> -Metabolic cage

<sup>۶</sup> - Malonyl-di-Aldehyde

<sup>۷</sup> -Catalase

<sup>۸</sup> -Superoxide Dismotase

فیلتراسیون گلومرولی، کلیرانس اوره، اوره و گلوکز سرم، دفع ادراری پتاسیم، ایندکس کلیه و آسیب بافتی کلیه در گروه عصاره با دوز ۶۰۰ به همراه سیس پلاتین، دفع ادراری سدیم و پروتئین در گروه عصاره با دوز ۱۲۰۰ به همراه سیس پلاتین، پتاسیم سرم، گلوکز و پروتئین ادرار، آنزیم کاتالاز بافت کلیه، میزان تام گروه های تیول و مالون دی آلدئید بافت کلیه در گروه ویتامین E به همراه سیس پلاتین در مقایسه با گروه سیس پلاتین بهبود نشان دادند.

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از عصاره هفتاد درصد آبی-الکلی بارهنگ و همچنین ویتامین E با مقادیر مورد استفاده در این مطالعه موجب بهبود نسبی تست های عملکردی کلیه، آسیب شناسی و آسیب اکسیداتیو کلیه می شود. البته مکانیسم و نحوه تاثیر عصاره بارهنگ در کاهش ضایعات سمی سیس پلاتین روی کلیه نیازمند مطالعات بیشتر است. کلمات کلیدی: سیس پلاتین، بارهنگ، ویتامین E، نارسایی حاد کلیه<sup>۹</sup>، استرس اکسیداتیو، آسیب کلیوی

## ABSTRACT

**Background:** Cisplatin is one of the most important chemotherapeutic agents widely used in the treatment of a variety of malignancies, including testicular, ovarian, head and neck, bladder and lung. However clinical utility of these drug is limited by nephrotoxicity. Cisplatin causes tubular injury through multiple mechanisms, including hypoxia, the generation of free radicals, inflammation, and apoptosis. Plantago major (PM) is a perennial plant that belongs to the Plantaginaceae family. This plant respiratory is used as folk medicine for remedy of many diseases such as diseases related to the skin, organs, digestive organs, reproduction, the circulation, against cancer, for pain relief and against infections. A range of biological activities from plant extracts including wound healing activity, anti-analgesic, antioxidant, weak antibiotic, immuno modulating and antiulcerogenic activity inflammatory, have been studied. The aim of the present study was to determined the protective effect of aqueous – Plantago major extract on cisplatin induced nephrotoxicity. extracts of alcoholic

**Method:** 100 Male Wistar rats were randomly divided into 10 equal groups of 10 animals: control, cisplatin (7 mg/Kg, BW, ip), Vit E + cisplatin (100 and 7 mg/kg, BW, ip) Vit E (100mg/kg, BW, ip), P.m extract ( 300 mg/kg BW, po), P.m extract (600 mg/kg, BW, po), , P.m extract (1200 mg/kg, BW, po), P.m 300 + cis ( 300 and 7 mg/kg BW, respectively po, ip), , P.m 600 + cis ( 600 and 7 mg/kg BW, respectively po, ip), P.m 1200 + cis ( 1200 and 7 mg/kg BW, respectively po, ip). Cisplatin group,

received cisplatin (7 mg/kg, BW, ip) on day 6. Rats in extract groups received aqueous- alcoholic extract of *P. major* orally and

for 21 days. 1 and 5 day prior to cisplatin treatment 3, 9 and 15 in vitamin E groups received vit E (ip) day after cisplatin treatment all animals were housed in metabolic cages for 24-h urine and blood samples were collected. 2, 6 and 12 days after cisplatin treatment also blood sample was taken. On day 21, all rats markers evaluations were then killed and their kidneys were removed for pathology and oxidative stress including MDA, total thiol groups, catalase and superoxide dismutase enzymes and also determination of kidney index. Serum concentrations of urea, creatinine, glucose, albumin, sodium, potassium, and also urine concentrations of glucose, albumin and osmolarity were measured. Also urine output, glomerular filtration rate (GFR), urea clearance and urine excretion rates of glucose, albumin, sodium, potassium and osmolarity were calculated.

**Results:** Serum concentrations of urea, creatinine, osmolarity, urine glucose, urine output, kidney index, and kidney tissue damage in the cisplatin group were significantly higher than control group. GFR, urea clearance, serum creatinin and potassium, urine excretion rates of osmolarity and protein, tissue SOD in P.m (300 mg/kg, BW) +cisplatin group; GFR, urea clearance, serum urea and glucose, urine enzyme excretion rates of potassium, kidney index tissue and percentage of tissue damage in P.m (600 mg/kg, BW) +cisplatin group; urine excretion rates of sodium and protein in P.m (1200 mg/kg, BW) +cisplatin group; Serum potassium, urine glucose and protein, tissue catalase enzyme, tissue total thiol groups, tissue malondi aldehyd in Vit E (100 mg/kg, BW) +cisplatin groupn showed remarkable improvement compared with cisplatin groups. Also, P.m was able to improve renal histopathology condition after cisplatin-induced nephrotoxicity.

**Conclusion:** In this study we have demonstrated that 70% aqueoue-alcoholic extract of plantago major (300, 600, 1200 mg/kg, BW) and vit E (100 mg/kg, BW) provide protection of cisplatin – induced nephrotoxicity. However, it nees more investigations to determine the exact mechanism of P.m action on cisplatin- induced kidney toxicity.

**Keywords:** Acute renal failure, Cisplatin, Plantago major, vitamin E, oxidative stress, renal toxicity.



دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی

عنوان:

بررسی اثر فراکسیون های عصاره آبی الکلی سیاه دانه و تیمو کینون بر آپوپتوز سلولهای سرطانی کلیه انسان رده

ACHN

استاد راهنما:

**دکتر ابولفضل خواجهوی راد**

**دکتر محمد ناصر شافعی**

استاد مشاور:

**دکتر محمود محمودی**

ارائه دهنده:

**سمیرا شهرکی**

شماره پایان نامه: .....

آبان ماه ۱۳۹۱

«حق هرگونه انتشار و بهره برداری از نتایج این پایان نامه برای دانشکده پزشکی مشهد محفوظ است»

## چکیده

**مقدمه:** سرطان کلیه ششمین علت مرگ ناشی از سرطان بوده و کارسینومای سلولهای کلیوی تقریباً ۳٪ سرطانهای بالغین و ۹۵-۹۰٪ تمام موارد تومورهای بدخیم اولیه کلیه را تشکیل می دهند. با وجود روشهای درمانی متعددی از جمله جراحی، ایمونوتراپی، شیمی درمانی و تعدیل کننده های پاسخ بیولوژیک استفاده از گیاهان دارویی نیز به علت ارزانی و عوارض کمتر در درمان سرطان کلیه مورد توجه واقع شده اند. سیاه دانه دارای اثرات مفید آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی است. لذا در این مطالعه اثر عصاره تام سیاه دانه، فراکسیونهای مختلف آن، سیس پلاتین و تیموکینون بر مورفولوژی سلولها، درصد سلولهای زنده و میزان آپوپتوز رده های سلولی آدنوکارسینوم کلیه انسان (ACHN) و سلول نرمال اپیتلیال کلیه انسان (GP-293) بررسی شدند.

**روش کار:** در این مطالعه ابتدا عصاره تام آبی-الکلی سیاه دانه به روش خیسانده تهیه گردید و فراکسیون های N-هگزان، دی کلرومتان، اتیل استات، N-بوتانل و آبی از آن استخراج شدند. اثر عصاره تام سیاه دانه و فراکسیون های آن، سیس پلاتین و تیموکینون بر مورفولوژی سلولها، درصد سلولهای زنده و میزان آپوپتوز در دو رده سلولی ACHN و GP-293 به ترتیب توسط میکروسکوپ نوری معکوس، تست MTT و فلوسیتومتری ارزیابی گردید. زمانهای بررسی عوامل فوق در بررسی مورفولوژی سلولها و درصد سلولهای زنده ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و در آپوپتوز ۴۸ ساعت بود. بررسی آماری داده ها به روش One-Way ANOVA و تست تعقیبی Tukey انجام شد.

**نتایج:** نتایج نشان داد عصاره تام و فراکسیونهای اتیل استات، N-بوتانل و دی کلرومتان سیاه دانه به صورت وابسته به دوز و زمان باعث ایجاد تغییرات مورفولوژیک و کاهش معنی دار درصد سلولهای زنده در رده سلولی ACHN شدند و در میان آنها عصاره تام بیشترین سمیت را از خود نشان داد. این در حالی است که در رده سلولی GP-293 سمیت کمتری از آنها مشاهده شد. نتایج حاصل از فلوسیتومتری هم نشان دهنده القاء بیشتر آپوپتوز توسط عصاره تام و فراکسیون دی کلرومتان در رده سلولی ACHN می باشد.

**نتیجه گیری:** نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره تام سیاه دانه و فراکسیون های آن دارای اثرات آپوپتوتیک و سایتوتوکسیک بر رده سلولی ACHN در مقایسه با رده سلولی GP-293 است. تاثیر عصاره تام سیاه دانه و فراکسیون های اتیل استات، N-بوتانل و دی کلرومتان بر ایجاد تغییرات مورفولوژی، کاهش درصد زنده ماندن سلولها و القاء آپوپتوز می تواند پیشنهاد کننده توزیع مواد موثر ضد سرطان سیاه دانه در فراکسیون های مختلف باشد و لذا ترجیح عصاره تام سیاه دانه را نسبت به یک ماده یا فراکسیون خاص آن پیشنهاد می کند.

**کلمات کلیدی:** سیاه دانه، عصاره سیاه دانه، فراکسیون های سیاه دانه، رده سلولی ACHN و GP-293، سرطان کلیه، سیتوتوکسیک، آپوپتوز



## **ABSTRACT:**

**Introduction:** Kidney cancer is the sixth leading cause of death among cancers and renal cell carcinoma constitutes around 3% of adult cancers and 90-95% of all primary malignant renal tumors. Despite the various therapeutic methods available including surgery, immunotherapy, chemotherapy and biologic response modulators; the application of herbal drugs has been paid increasing attention due to the low cost and fewer side effects. *Nigella sativa* (*N. sativa*) or Black seed has beneficial antioxidant and anti-cancer effects. Therefore, in this study the effect of *N. sativa* total extract, its different fractions, cisplatin and thymoquinone was investigated on cell morphology, percentage of live cells and the rate of apoptosis in the human renal carcinoma cell line (ACHN) and normal human renal epithelial cells (GP-293).

**Method:** In this study initially the total hydro-alcoholic extract of *N. sativa* was prepared by the soaking method and then n-Hexane, dichloromethane, ethyl acetate, N-butanol and H<sub>2</sub>O fractions were extracted. The effect of the total *N. sativa* extract and its fractions, cisplatin and thymoquinone on cell morphology, percentage of live cells and the rate of apoptosis in the ACHN and GP-293 cell lines were evaluated by inverted optical microscope, MTT test and flow cytometry. The time intervals for studying the above mentioned indexes were 24, 48 and 72 hours in studying cell morphology and percentage of live cells and 48 hours in apoptosis. One-way ANOVA and Tukey tests were applied for the statistical analysis of the data.

**Results:** It was observed that the total extract and the fractions of ethyl acetate, N-butanol and dichloromethane of *N. sativa* cause morphologic changes and significant decrease in the percentage of live cells in the ACHN cell line in a dose- and time-dependent manner and among them the total extract showed the highest degree of toxicity. However, in the GP-293 cell line lower toxicity was observed. The results of flow cytometry revealed a higher rate of apoptosis induction by the total extract and the dichloromethane fraction in the ACHN cell line.

**Conclusion:** The results of this study showed apoptotic and cytotoxic effects for *N. sativa* and its components on the ACHN cell line in comparison to the GP-293 cell line. The effect of *N. sativa* and its ethyl acetate, N-butanol and dichloromethane fractions on morphology changes, decrease in the percentage of live cells and the induction of apoptosis indicates the distribution of anticancer agents in various components of this herb. Therefore, the current investigation recommends the application of the total extract of *N. sativa* instead of a certain , *N. sativa* extract and fractions.

**Keywords:** *Nigella sativa*, ACHN cell line, GP-293 cell line, kidney cancer, cytotoxicity, apoptosis