

مقاله تحقیقی

اثر عصاره هیدرو-اتانلی دانه زنیان (*Trachyspermum copticum* L.) بر جلوگیری از تشکیل کریستال‌های اگزالات کلسیم در بافت کلیه موش‌های صحرایی نر بالغ

علیرضا صادقی پور^{۱*}، علی مازوجی^۲

۱. گروه پاتولوژی، مرکز تحقیقات انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رودهن، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، رودهن، ایران

* مسوؤل مکاتبات: پست الکترونیکی: asadeghipour@yahoo.com

محل انجام تحقیق: گروه پاتولوژی، مرکز تحقیقات انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۹/۷/۸

تاریخ دریافت: ۹۹/۶/۶

چکیده

تشکیل سنگ‌های ادراری یک مشکل جهانی است و هیچ گروه نژادی، جغرافیایی و فرهنگی را در بر نمی‌گیرد. انواع متعددی از سنگ‌های ادراری بر اساس ترکیب شیمیایی وجود دارند. سنگ‌های آهکی معمول‌ترین سنگ‌های کلیه هستند که بیش از ۸۰٪ سنگ‌ها را تشکیل می‌دهند. سنگ‌های اگزالات کلسیم معمول‌ترند. در طب سنتی ایران، گیاهان دارویی بسیاری برای درمان سنگ‌های کلیوی استفاده می‌شوند. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر عصاره هیدرواتانلی بخش‌های هوایی گیاه زنیان بر کریستالیزاسیون اگزالات کلسیم در بافت کلیه موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار می‌باشد. در پژوهش تجربی حاضر در ابتدا، عصاره هیدرواتانلی گیاه در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تهیه شد. کریستالیزاسیون اگزالات کلسیم توسط اضافه‌نمودن کلرید آمونیوم و اتیلن گلیکول در آب آشامیدنی به ترتیب به مدت ۳ و ۳۸ روز القاء شد. گروه کنترل توسط آب آشامیدنی تیمار شدند. گروه‌های تجربی علاوه بر آب آشامیدنی حاوی کلرید آمونیوم و اتیلن گلیکول توسط غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره گیاه به روش درون‌صفاقی به مدت ۴۱ روز تیمار شدند. بعد از ۴۱ روز، حیوانات توسط اتر بیهوش شده و کلیه سمت چپ آنها خارج شده و در فیکساتیو قرار گرفت. نمونه‌ها برای مطالعات بافت‌شناسی آماده شده و توسط هماتوکسیلین-ئوزین رنگ‌آمیزی شدند. نتایج نشان دادند که تیمار عصاره موجب کاهش تعداد کریستال‌های اگزالات کلسیم در بافت کلیه حیوانات تجربی در مقایسه با گروه کنترل بیمار می‌گردد. همچنین، تیمار عصاره آسیب توبولو-اینتراستیشیال را در حیوانات تیمار شده کاهش می‌دهد. بنابراین، گیاه می‌تواند مانع تشکیل سنگ کلیه در حیوانات تیمار شده گردد.

واژه‌گان کلیدی: زنیان، اگزالات کلسیم، کریستالیزاسیون، سنگ کلیه، موش صحرایی

مقدمه

تشکیل می‌شود. سنگ‌های ادراری به طور تیبیک توسط موقعیت‌شان در کلیه، پیشابراه یا مثانه و یا توسط ترکیب شیمیایی آنها (حاوی کلسیم، sturvite، اسید اوریک یا سایر ترکیبات) طبقه‌بندی می‌شوند. ۸۰ درصد از بیماران مبتلا به سنگ کلیه، مرد هستند. مردان اغلب اولین

سنگ کلیه به صورت کالکولوس کلیوی (از لغات لاتین *ren* به معنی کلیه و *calculus* یا ریگ (pebble) شناخته شده که در حقیقت تجمع کریستال‌ها یا جسم سختی است که در کلیه‌ها از مواد معدنی موجود در رژیم غذایی

مکانیکی به صورت پودر تبدیل گردید. پودر خشک تا زمان آزمایش در فریزر یخچال نگهداری گردید.

آماده‌سازی عصاره

پودر حاصله از گیاه با اتانل ۸۰ درصد مخلوط شد و سپس عصاره الکلی گیاه با استفاده از دستگاه سوکسله (Suxhlet) تهیه و توسط دستگاه روتاری (Rotary) خشک گردید.

حیوانات آزمایشگاهی

موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد Wistar با محدوده وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند و در شرایط مناسب آزمایشگاهی با درجه حرارت کنترل شده 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی هوا بین ۴۰ تا ۶۰ درصد نگهداری شدند. حیوانات دسترسی مداوم به آب و غذا داشتند.

الفای سنگ کلیه در حیوانات

برای ایجاد سنگ کلیه در موش‌های صحرایی، از کلرید آمونیوم (۱ درصد) و اتیلن گلیکول (۰/۷۵ درصد) در آب آشامیدنی استفاده شد. ابتدا، حیوانات کلرید آمونیوم ۱ درصد را به مدت ۳ روز در آب آشامیدنی دریافت کردند. سپس، اتیلن گلیکول ۰/۷۵ درصد را به مدت ۳۸ روز دریافت نمودند. به منظور اطمینان از ایجاد کریستال‌های اگزالات کلسیم، حیوانات توسط اتر، بیهوش و کلیه سمت چپ آنها خارج شده و در فیکساتیو فرمالدئید قرار گرفت. پس از قالب‌گیری، برش‌گیری و رنگ‌آمیزی نمونه‌ها به روش هماتوکسیلین - اتوزین، از وجود کریستال‌های اگزالات کلسیم توسط میکروسکوپ نوری اطمینان حاصل شد (تصویر ۱).

خطر آن در دوره زندگی افراد در حدود ۱۵-۱۰ درصد در کشورهای توسعه یافته بوده، ولی تا ۲۵-۲۰ درصد در کشورهای خاور میانه افزایش می‌یابد. افزایش خطر دهیدراسیون در آب و هوای گرم همراه با رژیم غذایی که ۵۰ درصد کلسیم کمتر و ۲۵۰ درصد اگزالات بیشتر دارد، در مقایسه با رژیم غذایی غربی، شانس ابتلا را در خاور میانه بالاتر می‌برد (۲). اگرچه، سنگ‌های اسید اوریک عملاً در خاور میانه از سنگ‌های حاوی کلسیم معمول‌تر هستند (۳). شیوع سالانه (تعداد موارد جدید در سال) سنگ‌های کلیوی در امریکای شمالی و اروپا ۰/۵ درصد است. درجه شیوع سنگ کلیه (فرکانس در جمعیت) در ایالات متحده از ۳/۲ درصد به ۵/۲ درصد از اواسط ۱۹۷۰ تا اواسط ۱۹۹۰ افزایش یافته است (۴). هزینه کل برای درمان بیماری سنگ کلیه ۲ بیلیون دلار در امریکا در سال ۲۰۰۳ بوده است (۵).

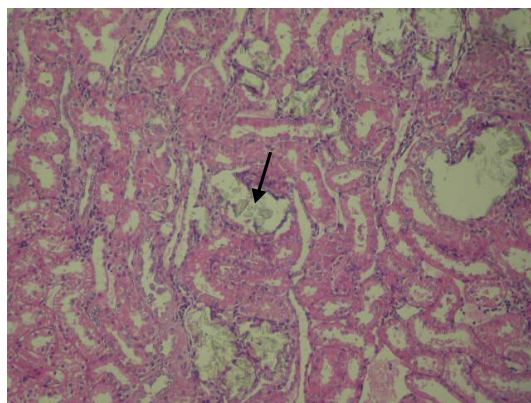
استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری سنگ کلیه از قدیم معمول بوده است.

از آنجایی که اثر بخش‌های هوایی زنیان بر ممانعت از تشکیل کریستال‌های اگزالات کلسیم در کلیه هنوز به‌طور دقیق مورد بررسی قرار نگرفته است، در پژوهش حاضر اثر عصاره هیدروآتانلی بخش‌های هوایی گیاه زنیان بر جلوگیری از تشکیل کریستال‌های اگزالات کلسیم در موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی گیاه

در پژوهش تجربی حاضر، ابتدا بخش‌های هوایی گیاه زنیان از منطقه شمال ایران جمع‌آوری شد و شناسایی تاگزونومیکی آن در هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران انجام گرفت. گیاه در حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد در سایه خشک شده و توسط آسیاب



تصویر ۱ - تصویر میکروسکوپ توری از کریستال‌های اغزالات کلسیم در مقاطع کلیه موش‌های تیمار شده توسط کلرید آمونیوم و اتیلن گلیکول. ← کریستال‌های اغزالات کلسیم را نشان می‌دهد. بزرگنمایی $250 \times$ (H&E).

گروه‌های مورد مطالعه

پس از اطمینان از ایجاد کریستال‌های اغزالات کلسیم در بافت کلیه حیوانات، ادامه آزمایش‌ها با تیمار عصاره گیاهی انجام شد. گروه‌های مورد مطالعه عبارت بودند از:

گروه ۱ یا کنترل سالم: رت‌هایی که هیچ‌گونه بیماری را دریافت نکردند ($n=9$).

گروه ۲ یا کنترل بیمار: رت‌هایی که کلرید آمونیوم را به مدت ۳ روز و سپس اتیلن گلیکول را به مدت ۳۸ روز دریافت کردند. همچنین، روزانه ۰/۵ میلی‌لیتر سالین به‌طور درون‌صفاقی دریافت نمودند ($n=9$).

گروه‌های ۳، ۴ و ۵ یا گروه‌های تجربی: رت‌هایی که علاوه بر دریافت کلرید آمونیوم به مدت ۳ روز و اتیلن گلیکول به مدت ۳۸ روز در آب آشامیدنی، عصاره هیدروالکلی گیاه را در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه به‌صورت درون‌صفاقی دریافت نمودند ($n=9$).

مطالعات بافت‌شناسی

پس از ۴۱ روز و خاتمه دوره تیمار، حیوانات توسط اتر، بیهوش و کلیه سمت چپ آن‌ها خارج شد و در بافر فرمالین ۱۰ درصد فیکس گردید. پس از انجام مراحل

آب‌گیری، قالب‌گیری در پارافین، مقاطعی به ضخامت ۳ میکرون تهیه شد. از مقاطع تهیه شده از هر کلیه، ۳ مقطع، انتخاب و به‌روش هماتوکسیلین - ائوزین رنگ‌آمیزی شد. تعداد کریستال‌های اغزالات کلسیم در کل هر مقطع شمارش شدند.

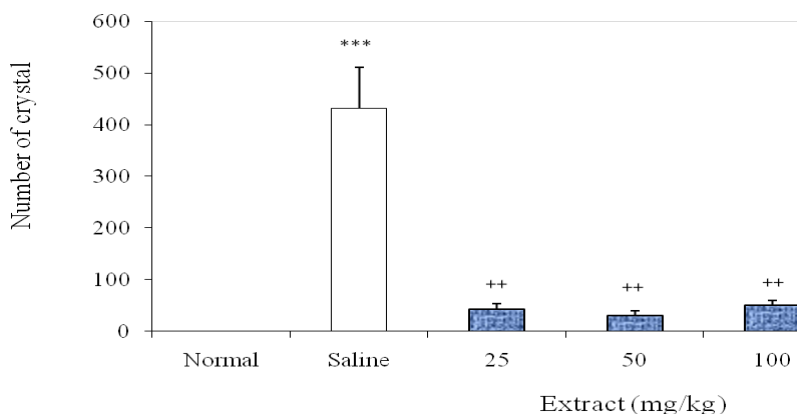
آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و تست Tukey از نظر آماری بررسی گردید. همه داده‌ها به‌صورت $Mean \pm S.E.M$ ارائه شدند. اختلاف بین گروه‌ها در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ تعیین شد.

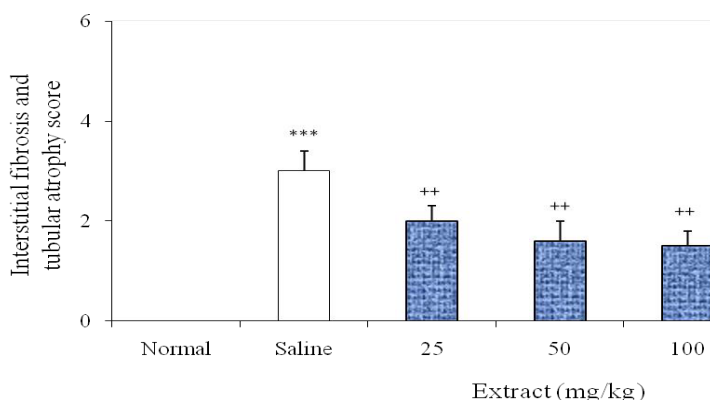
یافته‌ها

نتایج تحقیق نشان داد که تیمار عصاره هیدرواتانلی بخش‌های هوایی گیاه در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، موجب کاهش معنی‌داری در تعداد کریستال‌های اغزالات کلسیم در کلیه موش‌های صحرائی تیمار شده می‌گردد (نمودار ۱).

تیمار عصاره هیدروالکلی بخش‌های هوایی گیاه موجب کاهش آسیب بافتی کلیه‌ها در حیوانات تیمار شده با عصاره گیاهی می‌گردد (نمودار ۲).



نمودار ۱ - تاثیر عصاره هیدروالکلی بخش‌های هوایی گیاه زنیان در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر تعداد کریستال‌های اگزالات کلسیم در موش‌های صحرائی نر نژاد ویستار. هر ستون Mean±S.E.M. را نشان می‌دهد. $***p<0.001$ اختلاف از گروه سالم (Normal) را نشان می‌دهد. $++p<0.01$ اختلاف از گروه سالین را نشان می‌دهد.



نمودار ۲ - تاثیر عصاره هیدروالکلی بخش‌های هوایی گیاه زنیان در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر آسیب بافتی کلیه‌ها در موش‌های صحرائی نر نژاد ویستار. هر ستون Mean ± S.E.M. را نشان می‌دهد. $***p<0.001$ اختلاف از گروه سالم (Normal) را نشان می‌دهد. $++p<0.01$, $+++p<0.001$ اختلاف از گروه سالین (Saline) را نشان می‌دهد.

بحث

سنگ‌های کلیوی توصیه می‌شود، انجام گرفت. در پژوهش حاضر، اثر عصاره هیدروالکلی گیاه زنیان بر جلوگیری از تشکیل کریستال‌های اگزالات کلسیم در موش‌های صحرائی نر مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق، موش‌های صحرائی نر نژاد ویستار با آشامیدن آب محتوی اتیلن‌گلیکول و کلرید آمونیوم مبتلا به سنگ کلیه شدند. نتایج تحقیق نشان داد که تیمار درون صفاقی عصاره هیدروالکلی بخش‌های هوایی گیاه زنیان به موش‌های صحرائی که توسط اتیلن‌گلیکول و کلرید آمونیوم دهیدراته شده بودند، موجب کاهش تعداد کریستال‌های

گیاهان دارویی با عوارض جانبی کمتر، به دلیل طبیعی بودن، جایگزین‌های خوبی برای داروهای شیمیایی بوده و در نواحی مختلف جهان کاربرد گسترده‌ای دارند. استفاده از گیاهان دارویی برای دفع یا حل نمودن سنگ‌های کلیوی از زمان‌های قدیم متداول بوده و استفاده از آن‌ها به دلیل سهل‌الوصول و ارزان بودن، رو به افزایش است.

تحقیق حاضر به منظور بررسی اثر بخش‌های هوایی گیاه زنیان که در طب سنتی ایران برای دفع یا حل کردن

پلاسمای خون حیوانات تیمار شده افزایش می‌دهد (۹) (Masteiková, et al., 2007).

اثر بخش‌های هوایی گیاه زنیان در درمان بیماری سنگ کلیه و جلوگیری از تشکیل کریستال‌های اگزالات کلسیم تاکنون بطور دقیق روشن نشده است. لذا، پژوهش حاضر گزارش مستندی است که در مورد اثر گیاه دارویی زنیان بر جلوگیری از تشکیل سنگ کلیه اگزالات کلسیمی و کاهش آسیب‌های ناشی از تشکیل کریستال ارائه شده است و به استفاده سنتی از این گیاه جهت درمان سنگ‌های کلیوی اعتبار می‌دهد.

تقدیر و قدردانی

از پرسنل گروه پاتولوژی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه ایران تشکر می‌شود.

اگزالات کلسیم در مقاطع بافت کلیه موش‌های صحرایی تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل می‌گردد. از طرف دیگر، تیمار عصاره گیاهی موجب کاهش آسیب بافتی در بافت کلیوی حیوانات تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل می‌شود.

مطالعات اندکی در مورد اثر گیاه زنیان بر بیماری سنگ کلیه انجام شده است. Grases و همکاران در سال ۱۹۹۴ اثر گیاه *Equisetum arvense* را در موش‌های صحرایی بررسی کردند و سیتراوری، کلسی‌اوری، فسفاتوری، pH و دیورز را در آنها اندازه‌گیری کردند. تاثیر گیاه بر این پارامترها احتمالاً بواسطه وجود ساپونین‌های گیاه است (۸) (Grases, et al., 1994).

Masteiková و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که گیاه زنیان در مقایسه با داروی hydrochlorothiazide دارای اثر دیورتیک بالایی است. همچنین گیاه زنیان میزان kallikrein-kinins و prostaglandins E2 را در

منابع مورد استفاده

- زرگری، ع.، ۱۳۹۰، گیاهان دارویی، جلد ۵، ص ۱۳۴-۱۲۲.
- صالحی سورمقی، م. ح.، ۱۳۸۹، گیاهان دارویی و گیاه درمانی، جلد ۳، ص ۱۹۹-۱۹۵.
- Grases, F., Melero, G., Costa-Bauzá, A., Prieto, R., March, J. G., 1994. Urolithiasis and phytotherapy. *Int Urol Nephrol* 26: 507-11.
- Lieske, J. C., Segura, J. W., 2004. Chapter 7: Evaluation and medical management of kidney stones". In Potts, J. M., *Essential Urology: A guide to clinical practice* (1st ed.). Totowa, New Jersey: Humana Press. pp. 117-52.
- Masteiková, R., Klimas, R., Samura, B. B., Savickas, A., Samura, B. A., Belaij, S. I., Samura, I. B., Rabisková, M., Chalupová, Z., Bernatoniene, J., 2007. An orientational examination of the effects of extracts from mixtures of herbal drugs on selected renal functions. *Ceska Slov Farm* 56: 85-9.
- Moe, O. W., 2006. Kidney stones: pathophysiology and medical management. *The Lancet* 367: 333-44.
- Pietrow, P. K., Karellas, M. E., 2006. Medical management of common urinary calculi. *American Family Physician* 74: 86-94.
- Preminger, G. M., 2007. Chapter 148: Stones in the urinary tract. In Cutler, R. E. *The Merck Manual of Medical Information Home Edition* (3rd ed.). Whitehouse Station, New Jersey: Merck Sharp and Dohme Corporation.
- Reilly, Jr R. F., 2005. Chapter 13: Nephrolithiasis, pp. 192-207 in Reilly Jr. and Perazella, 2005.