

“Research article”

DOI: 10.71499/jvcp.2024.3121447

Study on the effect of Fargesin on renal ischemia-reperfusion injury in male rats

Nazari, M.A.¹, Mohajeri, D.^{2*}, Bazhban, M.³

1- Graduate of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

2- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

3- Graduate of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

*Corresponding author's email: daryoushmohajeri@yahoo.com

(Received: 2023/12/13 Accepted: 2024/4/5)

Abstract

Renal ischemia-reperfusion (IR) injury is one of the most important causes of acute renal failure. Fargesin has anti-inflammatory properties and most recent studies have focused on its anti-inflammatory effects. The aim of the present study was to evaluate the effect of Fargesin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. For this purpose, 21 male Wistar rats were randomly divided into three groups of seven rats each including: Sham operated group, IR group and IR plus Fargesin treatment. Fargesin (50 mg/kg) was administered through gavage for 12 weeks after left renal IR induction. After anesthesia, blood was taken from the tail vein to measure serum creatinine and urea, thereafter all rats were euthanized. The ELISA technique was used to evaluate the antioxidant status of renal tissue and inflammatory parameters. Histopathological studies were carried out by routine methods. Renal IR resulted in a significant increase in creatinine and blood urea levels compared to sham group ($p<0.05$), whereas administration of Fargesin significantly reduced these parameters ($p<0.05$). The antioxidant activity of renal tissue significantly decreased in the IR group but increased in the Fargesin treated rats ($p<0.05$). Fargesin significantly reduced IL-1 and TNF- α compared to IR group in renal tissue ($p<0.05$). Histopathology confirmed the biochemical findings. The results obtained showed that Fargesin has a beneficial and protective effect on renal IR injury. These effects of Fargesin may be due to the reduction of oxidative stress and inflammation in renal tissue.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Fargesin, Ischemia-Reperfusion, Kidney, Rat.

"مقاله پژوهشی"

DOI: 10.71499/jvcp.2024.3121447

مطالعه تاثیر فارگسین (Fargesin) بر آسیب ناشی از ایسکمی-بازخونسانی کلیه در موش‌های صحرایی نر

محمدامین نظری^۱، داریوش مهاجری^{۲*}، مهبد باژبان^۳

۱- دانش‌آموخته دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۳- دانش‌آموخته دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: daryoushmohajeri@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۹/۲۲ پذیرش نهایی: ۱۴۰۳/۱/۱۷)

چکیده

آسیب ناشی از ایسکمی-بازخونسانی کلیه یکی از مهم‌ترین عوامل نارسایی حاد کلیوی به شمار می‌رود. فارگسین ترکیبی گیاهی است که دارای خواص ضد التهابی می‌باشد. هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی اثرات فارگسین بر آسیب ایسکمی-بازخونسانی کلیه در موش‌های صحرایی بود. بدین منظور ۲۱ سر موش صحرایی نر ویستار به‌طور تصادفی به ۳ گروه هفت‌تایی شامل گروه‌های شاهد، القاء ایسکمی-بازخونسانی و ایسکمی-بازخونسانی به‌همراه تیمار با فارگسین (۵۰ mg/kg) به‌صورت گاواژ به مدت ۱۲ هفته پس از ایجاد ایسکمی در کلیه سمت چپ) تقسیم شدند. در پایان دوره و پس از ایجاد بیهوشی، ابتدا از ورید دمی همه موش‌ها جهت سنجش کراتینین و اوره سرم خونگیری شد و سپس همگی آسان‌کشی شدند. در ادامه جهت بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و پارامترهای التهابی در کلیه از تکنیک الایزا استفاده شد. آسیب‌شناسی بافتی نیز با روش معمول صورت گرفت. یافته‌ها نشان داد که القاء ایسکمی-بازخونسانی منجر به افزایش معنی‌دار سطوح کراتینین و اوره خون موش‌ها نسبت به مقدار آن در خون حیوانات گروه شاهد شده ($p < 0/05$)، ولی تجویز فارگسین موجب کاهش معنی‌دار فراسنج‌های مذکور گردید ($p < 0/05$). همچنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بافت کلیه در گروه ایسکمی-بازخونسانی به‌طور معنی‌داری کاهش، اما در موش‌های تیمار شده با فارگسین افزایش یافت ($p < 0/05$). نیز تجویز فارگسین موجب کاهش معنی‌دار IL-1 و TNF- α در مقایسه با گروه ایسکمی-بازخونسانی در بافت کلیه شد ($p < 0/05$). نتایج آسیب‌شناسی بافتی هم یافته‌های بیوشیمیایی تحقیق را تایید کرد. به‌نظر می‌رسد که فارگسین می‌تواند اثرات محافظتی در آسیب ایسکمی-بازخونسانی کلیه داشته باشد که احتمالاً از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و التهاب در بافت کلیه ایجاد می‌شود.

کلیدواژه‌ها: ایسکمی-بازخونسانی، فارگسین، کلیه، موش صحرایی.

مقدمه

یکی از علل شایع نارسایی حاد کلیوی، ایسکمی است که اگر به مدت کافی برقرار بماند، باعث ایجاد آسیب در توبول‌های کلیوی شده، همچنین کاهش در فیلتراسیون گلومرولی رخ می‌دهد (Legrand *et al.*, 2008; Ávila *et al.*, 2019; Tanyeli *et al.*, 2019). آسیب ناشی از ایسکمی بافت‌ها معضلی است بسیار مهم که خونرسانی مجدد متعاقب آن، منجر به آسیب‌های بافتی شدیدتر نیز می‌شود. این فرآیند که منجر به تخریب گسترده بافت‌ها می‌شود تحت عنوان آسیب ایسکمی-بازخونسانی (ischemia-reperfusion injury) شناخته می‌شود. در این پدیده، در خصوص علت اصلی آسیب می‌توان به تولید گونه‌های فعال اکسیژن (reactive oxygen species; ROS) مانند سوپراکسید و رادیکال هیدروکسیل اشاره نمود که در واقع در روند توسعه آسیب ایسکمی - بازخونسانی کلیوی نقش دارند چرا که برقراری مجدد جریان خون، سبب فراهم شدن میزان زیادی اکسیژن برای بافت دچار ایسکمی می‌شود که این افزایش غلظت اکسیژن سبب فعال شدن ماکروفازها در دیواره عروق شده و به دنبال آن رادیکال‌های فعال اکسیژن آزاد می‌شوند. مرگ سلولی هم به دنبال آسیب ایسکمی-بازخونسانی در ارتباط نزدیک با تولید رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از آن می‌باشد، بدین ترتیب که با برقراری مجدد خون، سلول‌های آماسی باعث آزادسازی فاکتورهای التهابی مانند اینترلوکین‌ها و رادیکال‌های آزاد در بافت دچار ایسکمی می‌شوند (Thurman, 2007; Legrand *et al.*, 2008; Mohajeri *et al.*, 2013). آسیب ایسکمی باعث افزایش بیان

مولکول‌های چسبندگی و تولید واسطه‌های التهابی مثل سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها توسط اندوتلیوم عروق و توبول‌ها شده که منجر به جذب لوکوسیت‌ها به کلیه می‌شوند. مولکول‌های چسبندگی مثل ایتگرین و سلکتین در کنار سایتوکاین‌های پیش‌التهابی آسیب سلولی را افزایش می‌دهند (Garcia-Criado *et al.*, 1998; Thurman, 2007; Li *et al.*, 2016).

رادیکال‌های آزاد اکسیژن بافت‌ها را از طریق پراکسیداسیون لیپیدی تحت تاثیر قرار داده و ساختارهای سلولی، پروتئین‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک آنها را تخریب کرده و با آسیب رساندن به غشاهای سلولی باعث رها شدن اجزای سلولی شده و در نتیجه آسیب بافتی ناشی از ایسکمی را تشدید می‌کنند (Minutoli *et al.*, 2016). در ایسکمی-بازخونسانی کلیوی مالون‌دی‌آلدئید (malondialdehyde; MDA)، محصول پراکسیداسیون لیپیدی، افزایش و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان دفع‌کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن کاهش می‌یابد (Legrand *et al.*, 2008).

داروهای شیمیایی متعددی برای کاهش صدمات ناشی از آسیب ایسکمی-بازخونسانی مورد استفاده می‌باشد، ولی با توجه به بروز عوارض متعدد و اغلب جبران‌ناپذیر در پی مصرف آنها از یک‌سو و همچنین فراوانی و دسترسی آسان به گیاهان دارویی و تمایل به استفاده از داروهای سنتی، امروزه گرایش برای تولید داروهای جدید با منشأ طبیعی که مؤثرتر و سازگارتر با بدن موجودات زنده باشد، بیشتر شده است.

فارگسین (Fargesin) یک نوع نئولیگنان (neolignan) مشتق‌شده از گونه‌های گیاه ماگنولیا (*Magnolia*) نظیر *Magnolia biondii* and *Magnolia* و

از فاکتورهای مهم آسیب کلیوی هستند (Diep *et al.*, 2002). مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، یک نشانگر زیستی برای استرس اکسیداتیو می‌باشد که به طور قابل توجهی در نتیجه ایسکمی افزایش می‌یابد (Han *et al.*, 2008). سوپراکسید دیسموتاز (SOD) یکی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که با تسریع در تبدیل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال سوپراکسید را از بین می‌برد و کاتالاز (CAT) در تجزیه H_2O_2 به آب و اکسیژن عمل می‌کند. طی مطالعات انجام شده، بیان کرده‌اند که فارگسین می‌تواند از طریق اثر روی فعالیت آنزیم‌های استرس اکسیداتیو، روند تخریب بافت‌ها را بهبود بخشد (Sha *et al.*, 2016).

با توجه به اهمیت مطالب ارائه شده، مطالعه حاضر جهت ارزیابی تاثیر فارگسین بر آسیب ناشی از ایسکمی-بازخونسازی تجربی کلیه در موش صحرایی نر انجام گردید.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی آزمایشگاهی بوده که در سال ۱۴۰۰ در مرکز تحقیقات دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تبریز انجام شده و در طی آن کلیه ملاحظات اخلاقی و روش‌های کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی مورد تأیید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی، رعایت گردیده است (Anonymous, 2004).

برای انجام مطالعه، از تعداد ۲۱ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی 20 ± 20 گرم استفاده شد. شرایط تغذیه و نگهداری برای تمام گروه‌ها یکسان

می‌باشد (Zhao *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2008) که طب سنتی از آن برای درمان گرفتگی بینی، سردرد و سینوزیت در کشورهای شرق آسیا مانند چین و ژاپن استفاده می‌شود. بیشتر مطالعات اخیر در مورد فارگسین هم بر اثرات ضدالتهابی آن متمرکز شده است (Lee *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2013). این ماده دارای اثراتی همچون کاهش استرس اکسیداتیو، سرکوب آپوپتوز میوکارد، بهبود متابولیسم لیپیدی و گلوکز از طریق مهار فعال‌سازی سیگنالینگ NF- κ B (Nuclear factor kappa B) هم می‌باشد (Pham *et al.*, 2017). همچنین فارگسین از طریق سرکوب مسیر PKC (Protein Kinase-C) از جمله مسیر پایین‌دستی ژانوس کیناز (Janus kinases)، فاکتورهای هسته‌ای AP-1 و NF- κ B اثرات ضد التهابی خود را نشان می‌دهد. این نتایج حاکی از آن است که فارگسین دارای خواص ضد التهابی با کاربردهای بالقوه در ایجاد دارو علیه اختلالات التهابی است (Pham *et al.*, 2017). طبق مطالعات بیان شده است که یکی از مکانیسم‌های اثر فارگسین ممکن است به فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن مربوط باشد. ROS یا گونه آزاد اکسیژن، با فعالیت طبیعی سلول‌ها تولید می‌شود و توسط گزانتین اکسیداز (XOD)، نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید فسفات (NADPH) اکسیداز، گلوکز اکسیداز و سیکلوکسیژناز (COX) تنظیم می‌شود (Nishiyama *et al.*, 2004; Mansour *et al.*, 2011).

تحت شرایط پاتولوژیک همچون آسیب ایسکمی-بازخونسازی کلیوی، افزایش تولید ROS منجر به اختلال عملکرد اندوتلیال، پراکسیداسیون لیپید و افزایش رسوب پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی می‌شود که

گیره و رفع انسداد، بر روی حفره شکمی بخیه زده شد و سپس حیوانات به قفس‌های خود بازگردانده شدند.

- پروتکل نمونه‌برداری از موش‌ها و آزمایشات بیوشیمیایی مورد نظر

جهت اندازه‌گیری برخی فاکتورهای بیوشیمیایی شامل کراتینین و اوره سرم، نمونه خون از ورید دمی اخذ گردید. سپس سرم نمونه‌های خون توسط عمل سانتریفیوژ (HB705, Iran) با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه جدا شده و میزان اوره و کراتینین سرم طبق دستورالعمل کیت تجاری (پارس آزمون) و به روش رنگ سنجی و با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر (Cobas 8000, Roche) اندازه‌گیری گردید.

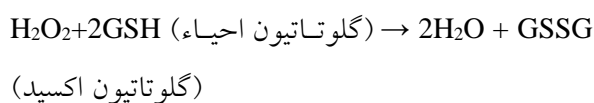
در ادامه تحقیق همه موش‌ها هم‌زمان با ایجاد دررفتگی در مهره‌های گردن آسان‌کشی شدند و بلافاصله کلیه چپ آن‌ها جدا و خارج شد. برای سنجش فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی و التهابی، قسمتی از بافت کلیه همه موش‌ها بصورت مجزا سریعاً جدا و در سالین بسیار سرد شستشو داده شد و از آن هموژنات بافتی ۱۰ درصد در ۱/۱۵ درصد (w/v) کلروپتاسیم تهیه گردید. در ادامه هموژنات مذکور با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شده و مایع رویی بدست آمده از نمونه‌های بافتی هموژنیزه، برای اندازه‌گیری میزان $TNF-\alpha$ و $IL-1$ و همچنین سنجش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آنزیم‌های کاتالاز (CAT) و گلوکاتیون پراکسیداز (GPx) و نیز اندازه‌گیری میزان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی (MDA) در بافت کلیه مورد استفاده قرار گرفت.

و به صورت ۱۲ ساعت روشنایی/ تاریکی و دمای 21 ± 2 درجه سلسیوس بود. جیره غذایی یکسان و آب نیز به طور آزاد در دسترس همه موش‌ها قرار گرفت و پس از یک هفته عادت دادن به شرایط جدید، آزمایش شروع شد. همه تیمارها بین ساعت ۱ تا ۶ بعد از ظهر از چرخه روشنایی اجرا شد.

در طی دوره آزمایش تحقیق، موش‌ها به طور تصادفی به ۳ گروه مساوی ۷ تایی به این شرح تقسیم شدند که گروه اول به عنوان شم (Sham) یا شاهد جراحی در نظر گرفته شد و در آن‌ها فقط محل جراحی را برش داده و سپس بخیه زده شد. در گروه دوم به عنوان گروه القاء ایسکمی-بازخونسازی (Ischemia-Reperfusion; I/R) پس از القاء ایسکمی کلیوی، ۳۰ دقیقه بعد عمل بازخونسازی انجام شد. در مورد موش‌های گروه سوم هم به عنوان گروه القاء ایسکمی-بازخونسازی به علاوه تیمار با فارگسین ($I/R + Fargesin$)، پس از القاء ایسکمی کلیوی، ۳۰ دقیقه بعد عمل بازخونسازی انجام و سپس فارگسین (سیگما-آمریکا) با دوز 50 mg/kg به صورت خوراکی به مدت ۱۲ هفته گاوژ شد (Wang et al., 2020). لازم به ذکر است که قبل از ایجاد ایسکمی و برقراری مجدد خون رسانی، همه گروه‌ها توسط تزریق داخل صفاقی کتامین (90 mg/kg) و زایلازین (10 mg/kg) بی‌هوش شدند (Sancaktutar et al., 2014) و پس از ضدعفونی ناحیه جراحی، خط وسط در قسمت میانی شکم برش داده شد. البته در گروه شاهد جراحی فقط دست‌کاری عروق کلیه چپ اکتفا کرده و در سایر گروه‌ها عروق کلیه چپ به مدت ۳۰ دقیقه به وسیله گیره غیرضرریه‌ای عروقی مسدود شد (Kirkby et al., 2007). پس از برداشتن

همچنین فعالیت آنزیم کاتالاز توسط روش کلابورن و بر اساس تجزیه پراکسید هیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر، مورد سنجش قرار گرفت (Claiborne, 1985). بدین منظور، مخلوط مورد سنجش متشکل از ۱/۹۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (M, pH=7/۰۵)، ۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن (M ۰/۰۱۹) و ۰/۵۰ میلی‌لیتر PMS (۱۰ درصد) در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر بود و تغییرات در جذب نوری، در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شده و به شکل "فعالیت کاتالاز در دقیقه" محاسبه و ثبت گردید.

فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز هم با استفاده از روش روتراک و همکاران (Rotruck *et al.*, 1973) و بر اساس واکنش ذیل مورد سنجش قرار گرفت:



مطابق واکنش بالا، گلوتاتیون پراکسیداز در هموزنات بافتی تهیه شده، گلوتاتیون را اکسید کرده و بطور هم‌زمان پراکسید هیدروژن به آب احیاء می‌گردد. لازم به ذکر است که بدین منظور، مخلوط واکنشگر مربوطه متشکل از ۰/۲ میلی‌لیتر اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (ethylenediamine tetra-acetic acid; sodium EDTA mM ۰/۸، ۰/۱ میلی‌لیتر آزید سدیم (azide mM ۱۰، ۰/۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن mM ۲/۵ و ۰/۲ میلی‌لیتر هموزنات بود که در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری گردید. واکنش حاصله پس از ۱۰ دقیقه، توسط تری کلرواستیک اسید متوقف و گلوتاتیون باقیمانده توسط محلول دی تیوبیس نیتروبنزوئیک اسید (Dithiobis nitrobenzoic acid; DTNB) مجدداً فعال گردیده و منجر به تشکیل

برای اندازه‌گیری میزان IL-1 و TNF- α از کیت‌های الیزای مربوطه بر اساس پروتکل شرکت سازنده (Nanjing Giancheng Bioengineering Institute, Nanjing, China) استفاده شد. فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مورد مطالعه و میزان MDA نیز با استفاده از کیت‌های تجاری موجود (Nanjing Giancheng Bioengineering Institute, Nanjing, China) و طبق دستورالعمل شرکت تولید کننده کیت انجام شد. مقدار MDA بافتی به صورت نانومول مالون-دی‌آلدئید (nmol) در میلی‌گرم پروتئین و فعالیت آنتی اکسیدانی به صورت واحدهای قراردادی در میلی‌گرم پروتئین عنوان گردید.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز توسط روش نیشیکیمی و همکاران تعیین گردید (Nishikimi *et al.*, 1972) که بدین منظور مقدار ۵ میکروگرم از پروتئین‌های تام هر یک از هموزنات‌های کلیه با بافر پیروفسفات سدیم، فنازین متوسولفات (phenazine methosulfate; PMS) و نیترو-بلوتترازولیوم (Nitro-blue Tertazilium; NBT) مخلوط گردید. واکنش با افزودن نیکوتین آمید-آدنین دی‌نوکلئوتید (Nicotinamide-adenine dinucleotide; NADH) آغاز شد. مخلوط مذکور در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه گرمخانه‌گذاری شده و سپس با افزودن ۱ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال (Merck, Germany) واکنش در مخلوط فوق، متوقف گردید و بلافاصله شدت جذب مخلوط رنگزای تشکیل شده در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و در نهایت هر واحد از فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به صورت غلظت آنزیم مورد نیاز برای ممانعت از تولید رنگ تا ۵۰ درصد در ۱ دقیقه، تحت شرایط مطالعه، تعیین گردید.

ثبوت در فرمالین ۱۰ درصد (Merck, Germany) مقاطع بافتی مورد نظر با استفاده از تکنیک متداول رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین تهیه گردید (Luna, 1968). در ادامه مشاهدات ریزبینی در ۵ میدان میکروسکوپی از هر برش بافتی، به‌طور تصادفی و با استفاده از میکروسکوپ نوری Nikon (مدل ECLIPSE E200، ساخت کشور ژاپن) انجام شد. بررسی مقاطع آسیب‌شناسی توسط یک مقیاس نیمه کمی (semiquantitative scale) و به‌صورت دوسو کور جهت ارزیابی از لحاظ تغییرات پاتولوژیک شامل: الف) آسیب گلمرول‌ها به شکل "گلمرولیت، آتروفی گلمرولی، فیروز گلمرولی و اتساع فضای ادراری، ب) آسیب بینابینی به شکل پرخونی، خونریزی، ادم، ارتشاح بینابینی سلول‌های آماسی و فیروز بینابینی و ج) آسیب توبولی به شکل اتساع توبولی، تغییرات دژنراتیو و نکروز سلول‌های توبولی، پهن و مسطح شدن سلول‌های توبولی و مشاهده کست‌های هیالینی داخل توبول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین از لحاظ شدت هم آسیب‌های بافتی مشاهده شده، بر اساس روش بهالودیا و همکاران به صورت عدم وجود آسیب (-) آسیب ملایم (+)، آسیب متوسط (++) و آسیب شدید (+++) رتبه بندی شدند (Bhalodia et al., 2009).

-تحلیل آماری داده‌ها

برای تحلیل داده‌های جمع‌آوری شده از نرم‌افزار SPSS-17 استفاده شد. داده‌های به‌دست آمده کمی، به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد (mean \pm SEM) ارائه و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها توسط آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) مورد بررسی قرار گرفت.

ترکیب رنگی گردید که جذب نوری آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. واکنش با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد متوقف و لوله‌ها با ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. ۳ میلی‌لیتر دی سدیم هیدروژن ۰/۸ mM و ۰/۱ میلی‌لیتر DTNB ۰/۰۴ درصد به محلول شناور افزوده شد و بلافاصله رنگ حاصله در ۴۲۰ mM اندازه‌گیری شد. در نهایت فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز به صورت میلی‌گرم پروتئین / دقیقه / میکرومول گلوتاتیون اکسید محاسبه و ثبت گردید.

در نهایت هم سنجش سطح پراکسیداسیون لیپیدی در بافت کلیه با روش رنگ سنجی (calorimetrically) به وسیله اندازه‌گیری TBARS (thiobarbituric acid reacting substances) طبق روش فراگا و همکاران انجام شد (Fraga et al., 1988) که بدین‌منظور به‌طور خلاصه ۰/۱ میلی‌لیتر هموژنات بافتی با ۲ میلی‌لیتر معرف TCA-HCl (-TBA) trichloroacetic acid (Thiobarbituric acid) ۳۷ درصد، TBA، ۰/۲۵ مول HCl و ۱۵ درصد TCA، به نسبت ۱:۱:۱ مخلوط و پس از ۱۵ دقیقه قرارگیری در بن ماری جوشان، خنک گردید و در شتاب ۳۵۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. شدت جذب نوری محلول رویی شفاف در طول موج ۵۳۵ نانومتر در مقابل بلانک اندازه‌گیری گردید و مقادیر بدست آمده به صورت نانومول در ۱۰۰ گرم بافت کلیه محاسبه و ثبت شد.

- بررسی آسیب بافتی در کلیه موش‌ها

بدین منظور، در مرحله آسان‌کشی موش‌ها، همزمان کلیه راست آن‌ها نیز خارج گردید و پس از

همچنین اختلافات در سطح $p < 0/05$ معنی‌دار تلقی شدند.

یافته‌ها

-مقادیر فاکتورهای بیوشیمیایی مربوط به عملکرد کلیوی تغییرات فاکتورهای بیوشیمیایی عملکرد کلیوی در سرم موش‌های صحرایی گروه‌های مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است که مشاهده می‌گردد در گروه

موش‌های القاء ایسکمی - بازخونسازی، ایجاد ایسکمی - بازخونسازی موجب افزایش معنی‌دار سطح اوره و کراتینین سرم موش‌ها نسبت به گروه شاهد شده است ($p < 0/05$). همچنین در موش‌های گروه تیمار شده با فارگسین نیز تیمار با فارگسین موجب کاهش معنی‌دار اوره و کراتینین سرم موش‌ها نسبت به گروه موش‌های القاء ایسکمی - بازخونسازی گردیده است ($p < 0/05$).

جدول ۱- تاثیر فارگسین بر تغییرات پارامترهای بیوشیمیایی سرمی مربوط به عملکرد کلیه در عمل ایسکمی - بازخونسازی کلیه موش‌های صحرایی

مقدار فراسنجه‌های بیوشیمیایی بررسی شده (mean±S.E.M)		گروه آزمایشی
اوره (mg/dl)	کراتینین (mg/dl)	شاهد جراحی
۲۸/۱۱±۰/۳۷	۱/۲۱±۰/۱۰	ایسکمی - بازخونسازی
۴۱/۳۲±۰/۵۸*	۲/۶۳±۰/۲۴*	ایسکمی - بازخونسازی + فارگسین
۳۰/۱۹±۰/۶۶	۱/۲۴±۰/۱۷	

* نشانگر اختلاف آماری معنی‌دار با مقادیر مربوط به گروه شاهد می‌باشد.

- سطوح بافتی سایتوکاین‌های التهابی

تغییرات سطوح سایتوکاین‌های التهابی در بافت کلیه موش‌های صحرایی گروه‌های مورد مطالعه هم در جدول ۲ ارائه شده است که ملاحظه می‌گردد در گروه موش‌های القاء ایسکمی - بازخونسازی (I/R)، انجام عمل ایسکمی - بازخونسازی موجب افزایش معنی‌دار

مقادیر مارکرهای پیش التهابی IL-1 و TNF- α نسبت به گروه شاهد شده است ($p < 0/05$). اما در گروه موش‌های تیمار شده با فارگسین، تجویز فارگسین موجب کاهش تولید مارکرهای پیش التهابی ذکر شده در مقایسه با گروه I/R گردیده است ($p < 0/05$).

جدول ۲- تاثیر فارگسین بر تغییرات سطوح بافتی سایتوکاین‌های التهابی در آسیب ایسکمی بازخونسازی کلیه در موش صحرایی

مقدار فراسنجه‌های بیوشیمیایی بررسی شده (mean±S.E.M)		گروه آزمایشی
IL-1 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	شاهد جراحی
۱۱۵/۶۳±۵/۴۱	۱۱۱/۱۹±۶/۱۳	ایسکمی - بازخونسازی
۲۷۱/۵۱±۹/۶۹*	۲۳۰/۵۵±۱۱/۲۷*	ایسکمی - بازخونسازی + فارگسین
۱۱۹/۱۱±۶/۷۷	۱۱۸/۲۲±۷/۱۹	

* نشانگر اختلاف آماری معنی‌دار با مقادیر مربوط به گروه شاهد می‌باشد.

- میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در بافت کلیه

تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و میزان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در بافت کلیه موش‌های صحرایی گروه‌های مورد مطالعه در جدول ۳ ارائه شده است. در گروه IR ایجاد ایسکمی و بازخونسازی موجب کاهش معنی‌دار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آنزیم‌های کاتالاز (CAT) و گلووتاتیون پراکسیداز (GPx) بافت کلیه و کاهش معنی‌دار میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA) بافت کلیه در مقایسه با گروه I/R شد ($p < 0/05$).

گردید ($p < 0/05$) و همچنین موجب افزایش معنی‌دار میزان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی (مالون‌دی‌آلدئید) در بافت کلیه شد ($p < 0/05$). در گروه I/R + Fargesin تیمار با فارگسین موجب افزایش معنی‌دار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آنزیم‌های کاتالاز (CAT) و گلووتاتیون پراکسیداز (GPx) بافت کلیه و کاهش معنی‌دار میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA) بافت کلیه در مقایسه با گروه I/R شد ($p < 0/05$).

جدول ۳- مقایسه تغییرات اکسیدانی/آنتی‌اکسیدانی بافت کلیه در موش‌های صحرایی گروه‌های مورد مطالعه

فراسنجه‌های بیوشیمیایی (mean±S.E.M)				
گروه آزمایشی	مالون‌دی‌آلدئید (nmol/g protein)	سوپراکسید دیسموتاز (U/mg protein)	کاتالاز (U/mg protein)	گلووتاتیون پراکسیداز (U/mg protein)
شاهد جراحی	4/0 ± 274/18	18/0 ± 13/61	70/4 ± 14/92	24/1 ± 19/18
ایسکمی/بازخونسازی	6/0 ± 61/65*	12/0 ± 45/57*	50/2 ± 64/15*	16/1 ± 38/15 ^a
ایسکمی/بازخونسازی + فارگسین	4/0 ± 59/32	17/0 ± 92/32	67/3 ± 89/35	22/1 ± 77/20 ^b

مقادیر به صورت میانگین ± انحراف استاندارد برای ۷ سر موش صحرایی در هر گروه ارائه شده است.

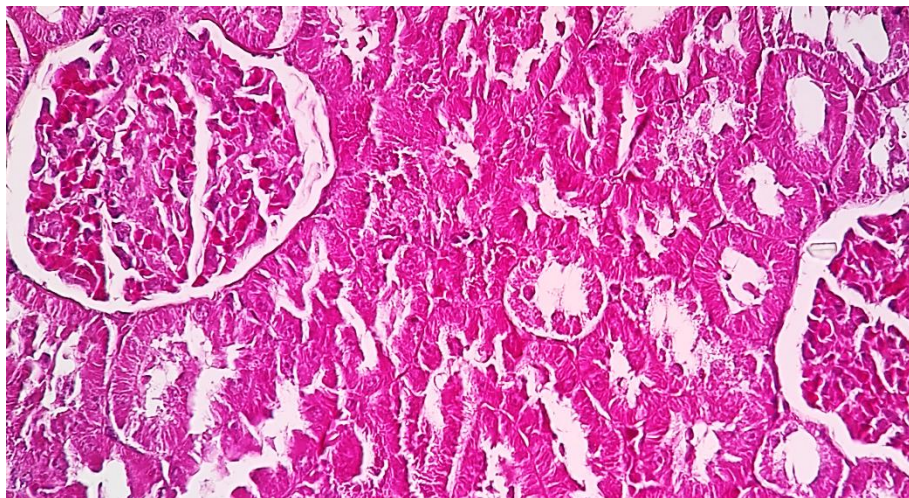
*: نشانگر اختلاف معنی‌دار با گروه شم

- ارزیابی آسیب شناختی بافت کلیه موش‌ها

در مطالعات ریزینی نمونه‌های مربوط به موش‌های گروه شاهد جراحی، ساختار بافت کلیه‌ها کاملاً سالم و طبیعی بود (اشکال ۱ و ۲).

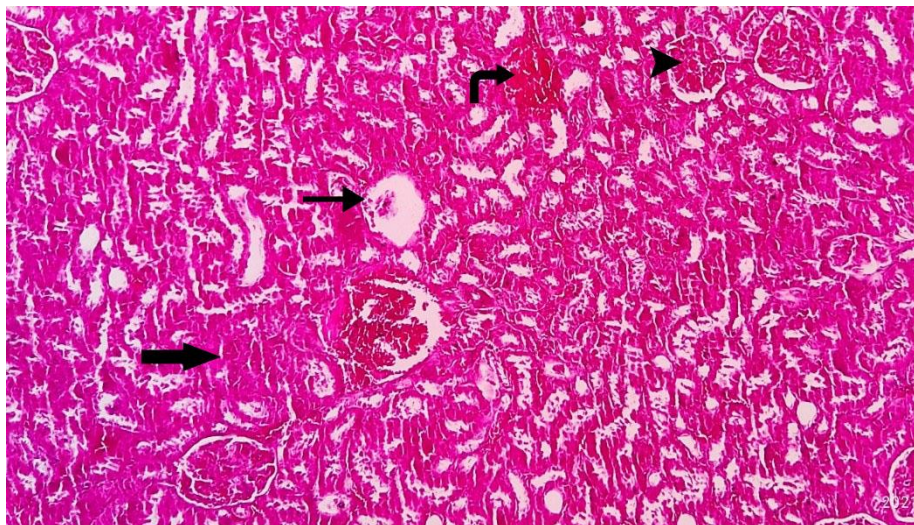


شکل ۱- نمای ریزبینی بافت کلیه موش صحرائی از گروه شم که ساختار آن طبیعی است (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی ۱۰۰×).

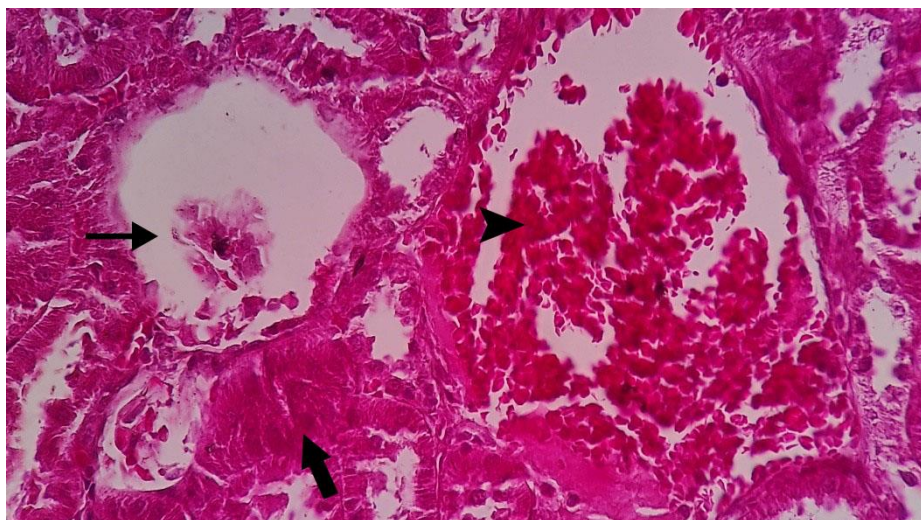


شکل ۲- نمای ریزبینی بافت کلیه موش صحرائی از گروه شم که ساختار آن طبیعی است (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی ۶۰۰×).

در نمونه‌های بافتی مربوط به گروه موش‌های القاء ایسکمی - بازخونسانی، آسیب بافت کلیه به صورت تغییرات دژنراتیو سلول‌های توبولی، نکروز حاد توبول‌ها، ادم، پرخونی و خونریزی شدید بینابینی مشاهده گردید. همچنین تغییرات نکروز، آتروفی، اتساع فضای ادراری، پرخونی و خونریزی شدید نیز در گلومرول‌ها بسیار واضح بود (اشکال ۳ و ۴).



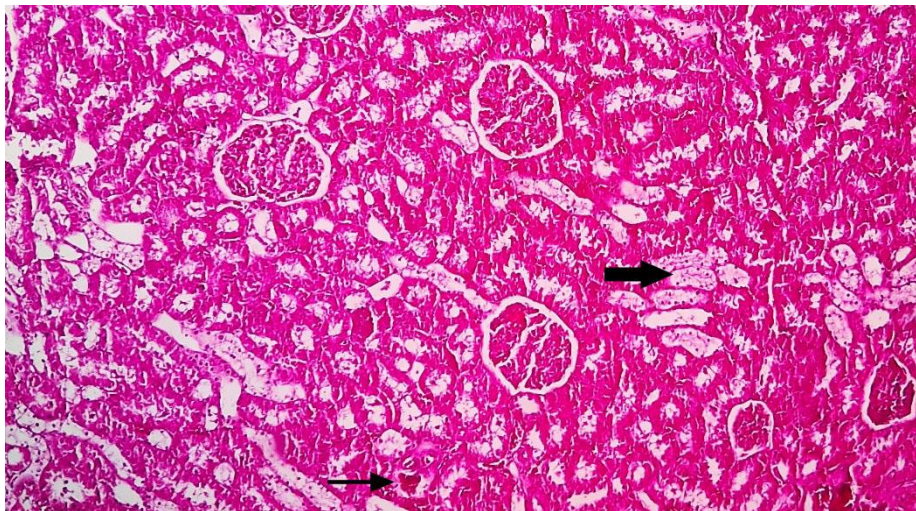
شکل ۳- نمای ریزبینی از بافت کلیه یک موش صحرایی از گروه IR که در آن تغییرات شدید و گسترده نکروز سلول‌های اپیتلیال توبولی و همچنین نکروز (پیکان ضخیم) و آتروفی گلومرولی (پیکان باریک) و پرخونی و خونریزی در کلافه مویرگی گلومرول (نوک پیکان) و بافت بینابینی کلیه (پیکان خمیده) مشخص می‌باشد (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، بزرگ‌نمایی ۱۰۰×).



شکل ۴- نمای ریزبینی با درشت‌نمایی بیشتر از بافت کلیه یک موش صحرایی از گروه IR که در آن تغییرات شدید و گسترده نکروز سلول‌های اپیتلیال توبولی (پیکان ضخیم) و همچنین نکروز و آتروفی گلومرولی (پیکان باریک) و پرخونی و خونریزی در بافت بینابینی کلیه (نوک پیکان) مشخص می‌باشد (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، بزرگ‌نمایی ۶۰۰×).

همراه با نکروز خفیف و پراکنده سلول‌های اپیتلیال توبولی بود (شکل‌های ۵ و ۶). تغییرات آسیب‌شناسی بافتی تمامی گروه‌ها در جدول ۴، درجه‌بندی و مقایسه گردیده است.

در نمونه‌های بافتی گروه (I/R + Fargesin) بهبود قابل توجهی در بروز تغییرات پاتولوژیک مشاهده گردید. تغییرات پاتولوژیک مشاهده شده در این گروه شامل پرخونی و ادم جزعی و تغییرات ملایم دژنراتیو



شکل ۵- نمای ریزبینی از بافت کلیه یک موش صحرایی از گروه I/R + Fargesin که از شدت آسیب بافتی کاسته شده و آسیب‌ها عمدتاً به شکل تغییرات دژنراتیو خفیف در سلول‌های پوششی توبول‌ها (پیکان ضخیم) و پرخونی و ادم در بافت بینابینی (پیکان باریک) مشاهده می‌شود (هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگ‌نمایی ۱۰۰×).



شکل ۶- نمای ریزبینی از بافت کلیه یک موش صحرایی با درشت‌نمایی بیشتر از گروه I/R + Fargesin که از شدت آسیب بافتی کاسته شده و آسیب‌ها عمدتاً به شکل تغییرات دژنراتیو خفیف در سلول‌های پوششی توبول‌ها (پیکان) مشاهده می‌شود (هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگ‌نمایی ۱۰۰×).

جدول ۴- تاثیر فارگسین بر آسیب ایسکمی/بازخونسانی بافت کلیه در موش صحرایی

گروه‌ها	آسیب بافتی	آسیب گلوبرولی	تورم حاد سلولی	پرخونی و خونریزی	اتساع توپولی	نکروز سلول‌های پوششی توپول‌ها
شم	-	-	-	-	-	-
ایسکمی/بازخونسانی	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ایسکمی/بازخونسانی + فارگسین	+,-	+	+	+	+	+,-

علامت (-) نشانگر عدم وجود آسیب، علامت (+) نشانگر آسیب پاتولوژیک ملایم، علامت (++) آسیب متوسط و علامت (+++) آسیب شدید می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه به دنبال ایجاد ایسکمی-بازخونسانی، سطوح فعالیت آنزیم‌های SOD، GPx و CAT کاهش پیدا کرده و میزان MDA افزایش یافت. از طرفی متعاقب تیمار با فارگسین، فاکتورهای مذکور بهبود معنی داری را نشان دادند. مکانیسم دیگر اشاره شده، التهاب بافتی می‌باشد که با افزایش میزان فاکتورهای IL-1 و TNF- α مشخص شد. فارگسین با اثرات ضد التهابی خود توانست این فاکتورها را نیز بهبود بخشد. در گروه دریافت کننده فارگسین میزان فعالیت کلیوی بهبود پیدا کرد و سطوح سرمی اوره و کراتینین کاهش معنی داری را نشان داد. نتایج آسیب شناسی بافتی نیز آن را تایید کرد. کلیه‌ها کراتینین و اوره را به عنوان یک محصول متابولیکی زائد دفع می‌کنند، از این رو سطح پلاسمایی این پارامترها می‌تواند عملکرد کلیه را منعکس کند. در این مطالعه سطح سرمی کراتینین و اوره در گروه I/R بیشتر از گروه شم بود. همسو با نتایج مطالعه کیرکبای و همکاران در سال ۲۰۰۷ و ابوطالب و همکاران در سال ۲۰۱۹ آسیب ایسکمی-بازخونسانی بافت کلیه موجب افزایش کراتینین و اوره شده و موجب کاهش عملکرد کلیه گردیده است (Kirkby et al., 2007; Aboutaleb et al., 2019). تجویز فارگسین موجب کاهش غلظت اوره، و کراتینین بوده است که نشان دهنده اثر بهبود دهنده این ترکیب می‌باشد. این اثرات ممکن است

در شرایط بالینی یکی از آسیب‌های حاد کلیوی، آسیب ایسکمی-بازخونسانی می‌باشد که می‌تواند موجب آسیب غیرقابل برگشت کلیه، اختلال در عملکرد ارگان‌های دور همچون کبد، مغز و قلب و همچنین مرگ و میر شود. از آنجایی که استرس اکسیداتیو و التهاب در کلیه و سایر اندام‌ها دیگر مشخصه آسیب ناشی از ایسکمی-بازخونسانی می‌باشد، مداخلاتی که این فرآیندها را هدف قرار می‌دهند در کنترل اثرات مضر ایسکمی-بازخونسانی مفید خواهد بود (Patschan et al., 2012). تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن به مقدار زیاد، در کلیه که دچار ایسکمی-بازخونسانی شده، منجر به آسیب می‌شود که روندی اجتناب ناپذیر در تروما، عفونت و پیوند کلیه می‌باشد (El-Abhar et al., 2003).

نتایج مطالعه حاضر بیان کرد که متعاقب آسیب ناشی از ایسکمی-بازخونسانی کلیوی، میزان کراتینین و اوره سرمی افزایش پیدا کرده که افزایش سطوح این مواد نشانگر آسیب کلیوی می‌باشد. همچنین نتایج آسیب شناسی بافتی، آن را تایید کرد. همانطور که بیان شد، از مکانیسم‌های آسیب متعاقب ایسکمی-بازخونسانی کلیوی می‌توان به افزایش استرس اکسیداتیو و همچنین فاکتورهای التهابی اشاره نمود که

سیستم‌های بیولوژیکی داشته باشد (Jeyakumar *et al.*, 1999; Shobana and Akhilender Naidu, 2000). GSH (Glutathione) یک آنزیم مهم درون زاد در برابر تخریب پراکسیدان‌ها در غشاهای سلولی است. GSH می‌تواند برای سم‌زدایی در مقابل گونه‌های اکسیژن فعال مانند H₂O₂ و یا کاهش پراکسیدهای چربی عمل کند. (GSH) یک پاک‌کننده رادیکال آزاد مستقیم نیز است. این آنزیم به عنوان یک بستر برای GPx (Glutathione peroxidase) و GST (Glutathione S-transferases) عمل می‌کند. نتایج این مطالعه حاکی از آن بوده است که ایجاد ایسکمی و بازخونسازی موجب کاهش سطح CAT، SOD، GPx و همچنین افزایش میزان MDA در بافت کلیه گشته است. به دنبال تجویز فارگسین در گروه تیمار موجب افزایش و بهبودی پارامترهای آنتی‌اکسیدانی و کاهش میزان مالون دی‌آلدئید گردیده است. کاهش میزان مالون دی‌آلدئید به عنوان یکی از شاخص‌های مهم استرس اکسیداتیو، نشان دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی فارگسین می‌باشد. همچنین می‌توان استنباط کرد که افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بافت کلیه موجب کاهش تولید رادیکال‌های آزاد می‌گردد که مطابق با نتایج مشاهدات قبلی می‌باشد (Zolali *et al.*, 2015). در مطالعه‌ای وانگ و همکاران بیان کردند که فارگسین با بهبود آنزیم‌های استرس اکسیداتیو همچون افزایش فعالیت SOD، GPx و GSH و همچنین کاهش میزان MDA منجر به کاهش عوارض قلبی ناشی از ایسکمی قلبی شده است که این نتایج همسو با نتایج حاضر بود (Wang *et al.*, 2015). پاسخ التهابی نشان دهنده دفاع بیولوژیکی از سیستم ایمنی بدن برای بازگرداندن به وضعیت اصلی پس از ایجاد آسیب می‌باشد. تعیین سطح

مربوط به فعالیت ضد التهابی و ضد اکسیدانی ماده فارگسین باشد. چندین مطالعه گزارش کرده اند که برخی از گیاهان با خواص ضد اکسیدانی می‌تواند آسیب کلیه ناشی از استرس اکسیداتیو در وضعیت ایجاد ایسکمی، کاهش و عملکرد کلیه را ارتقا بخشد (Szcześniak *et al.*, 2016; Yaribeygi *et al.*, 2019). بنابراین اغلب از آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان یکی از روش‌های درمانی استفاده می‌شود و گزینه‌ای مناسبی جهت محافظت از سلول‌ها در برابر رادیکال‌های آزاد و آسیب‌های اکسیداتیو می‌باشد. پراکسیداسیون لیپیدها منجر به کاهش استحکام و افزایش آسیب‌پذیری غشاء سلول‌ها می‌شود. مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی، از تشکیل رادیکال‌های آزاد اضافی جلوگیری می‌کنند. از طرفی یون سوپراکسید (O₂⁻) و رادیکال هیدروکسیل (OH•) از مواردی هستند که منجر به صدمات قابل توجهی در بافت‌ها و اندام‌ها می‌شوند (Fang *et al.*, 2002). بنابراین، حذف یون‌های سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل احتمالاً یکی از موثرترین مکانیسم‌های تدافعی در برابر انواع بیماری‌ها است. افزایش فعالیت‌های CAT و GPx، دو آنزیمی که به ترتیب یون‌های سوپراکسید و یون‌های هیدروکسیل را پاکسازی می‌کنند، به طور قابل توجهی منجر به بهبود عوارض استرس اکسیداتیو می‌شوند. بنابراین کاهش فعالیت آنزیم‌های CAT منجر به تجمع رادیکال‌های آزاد شده و نهایتاً باعث القاء اثرات مضر مانند از بین رفتن یکپارچگی غشای سلول و عملکرد غشا می‌شود (Vijayakumar *et al.*, 2004). طبق مطالعات انجام شده، تیمار با ادویه‌جات مختلف، با بهبود سطح SOD و CAT می‌تواند تأثیر مثبتی بر پراکسیداسیون لیپیدها در

محافظتی در آسیب ایسکمی-بازخونسانی کلیه داشته باشد که این اثرات احتمالاً از طریق کاهش و تداخل در یک سری از فرایندها از جمله استرس اکسیداتیو و التهاب در بافت کلیه ایجاد می‌شود. البته برای اعلام نظر دقیق و قاطع، انجام مطالعات آتی با مدت زمان تیمار طولانی‌تر و با دوزهای بیشتر دارو بر روی موش‌های صحرایی تحت القا ایسکمی-بازخونسانی با مدت زمان بازخونسانی بیشتر، توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان از آقای دکتر ناظری برای همکاری در انجام این تحقیق قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارد.

اینترلوکین ۱ (IL-1) و فاکتور نکروز دهنده آلفا (TNF- α) به عنوان یکی شاخص مهم در حالت التهابی بدن با توجه به نتایج بدست آمده، موش‌های صحرایی ناشی از I/R در گروه کنترل جراحی سطح بالاتری از سیتوکاین‌های پیش التهابی را داشتند. در مطالعه زانگ و همکاران نتایج نشان داد ایجاد ایسکمی به مدت ۳۰ دقیقه موجب افزایش معنی دار میزان کراتینین، اوره و TNF- α در موش‌های صحرایی تحت جراحی ایسکمی کلیه در مقایسه با گروه شم گردیده است (Zhang et al., 2016). مطالعه‌ای نشان داده است که فارگسین می‌تواند تولید و بیان TNF- α mRNA را در مخاط روده بزرگ موش‌های مبتلا به کولیت کاهش دهد. به عنوان یک واسطه مهم التهاب، TNF- α نقش مهمی در پاتوژنز IBD ایفا می‌کند (Wang et al., 2018).

نتیجه نهائی این‌که بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر و نیز سایر محققین، می‌توان اظهار داشت که تجویز ۱۲ هفته فارگسین قادر است اثرات مفید و

منابع

- Aboutaleb, N., Jamali, H., Abolhasani, M. and Toroudi, H.P. (2019). Lavender oil (*Lavandula angustifolia*) attenuates renal ischemia/reperfusion injury in rats through suppression of inflammation, oxidative stress and apoptosis. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 110: 9-19.
- Anonymous. (2004). Australian code of practice for the care and use of animals for scientific purposes, 7th ed., <http://www.nhmrc.gov.au/publications/synopsis> (access in 2011).
- Ávila, C., Líbano, L., Rojas, I. and Rodrigo, R. (2019). Role of ischemia-reperfusion in oxidative stress-mediated injury during kidney transplantation. *Clinical Research*, 5:1-4.
- Bhalodia, Y., Kanzariya, N., Patel, R., Patel, N., Vaghasiya, J., Jivani, N., et al. (2009). Renoprotective activity of benincasa cerifera fruit extract on ischemia/reperfusion-induced renal damage in rat. *I J K D*, 3(2): 80-85.
- Choi, S.S., Cha, B.Y., Choi, B.K., Lee, Y.S., Yonezawa, T., Teruya, T., et al. (2013). Fargesin, a component of *Flos Magnoliae*, stimulates glucose uptake in L6 myotubes. *Journal of natural medicines*, 67: 320-326.
- Claiborne, A. (1985). Catalase activity. In: Greenwald, R.A. editor, *Hand Book of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press. Boca Raton, Florida, pp: 84-86.

- Diep, Q.N., Amiri, F., Touyz, R.M., Cohn, J.S., Endemann, D., Neves, M.F., et al. (2002). PPAR α activator effects on Ang II-induced vascular oxidative stress and inflammation. *Hypertension*, 40(6): 866-871.
- El-Abhar, H.S., Abdallah, D.M. and Saleh, S. (2003). Gastroprotective activity of *Nigella sativa* oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 84(2-3): 251-258.
- Fang, Y.Z., Yang, S. and Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition *Nutrition*, 18: 872-879.
- Fraga, C.G., Leibovitz, B.E. and Tappel, A.L. (1988). Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radical Biology and Medicine*, 4(3): 155-161.
- Garcia-Criado, F.J., Eleno, N., Santos-Benito, F., Valdunciel, J.J., Reverte, M., Lozano-Sanchez, F.S., et al. (1998). Protective effect of exogenous nitric oxide on the renal function and inflammatory response in a model of ischemia-reperfusion. *Transplantation*, 66(8): 982-90.
- Han, X., Pan, J., Ren, D., Cheng, Y., Fan, P. and Lou, H. (2008). Naringenin-7-O-glucoside protects against doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes by induction of endogenous antioxidant enzymes. *Food and Chemical Toxicology*, 46(9): 3140-3146.
- Jeyakumar, S.M., Nalini, N. and Menon, V.P. (1999). Antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale* Rosc) in rats fed a high fat diet. *Medical science research*, 27(5): 341-344.
- Kirkby, K., Baylis, C., Agarwal, A., Croker, B., Archer, L. and Adin, C. (2007). Intravenous bilirubin provides incomplete protection against renal ischemia-reperfusion injury in vivo. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 292(2): F888-F894.
- Lee, Y.S., Cha, B.Y., Choi, S.S., Harada, Y., Choi, B.K., Yonezawa, T., et al. (2012). Fargesin improves lipid and glucose metabolism in 3T3-L1 adipocytes and high-fat diet-induced obese mice. *Biofactors*, 38(4): 300-308.
- Legrand, M., Mik, E.G., Johannes, T., Payen, D. and Ince, C. (2008). Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney. *Molecular medicine*, 14: 502-516.
- Li, J., Hong, Z., Liu, H., Zhou, J., Cui, L., Yuan, S., Chu, X., et al. (2016). Hydrogen-rich saline promotes the recovery of renal function after ischemia/reperfusion injury in rats via anti-apoptosis and anti-inflammation. *Frontiers in pharmacology*, 7: 106.
- Luna, L.G. (1968). Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. In *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*, pp: xii-258.
- Mansour, S.M., Bahgat, A.K., El-Khatib, A.S. and Khayyal, M.T. (2011). Ginkgo biloba extract (EGb 761) normalizes hypertension in 2K, 1C hypertensive rats: role of antioxidant mechanisms, ACE inhibiting activity and improvement of endothelial dysfunction. *Phytomedicine*, 18(8-9): 641-647.
- Minutoli, L., Puzzolo, D., Rinaldi, M., Irrera, N., Marini, H., Arcoraci, V., et al. (2016). ROS-mediated NLRP3 inflammasome activation in brain, heart, kidney, and testis ischemia/reperfusion injury. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016(1): 2183026.
- Mohajeri, D., Gharamaleki, M.N., Hejazi, S.S. and Nazeri, M. (2013). Preventive effects of turnip (*Brassica rapa* L.) on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Life Science Journal*, 10(1): 1165-1170.
- Nishikimi, M., Rao, N.A. and Yagi, K. (1972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and biophysical research communications*, 46(2): 849-854.
- Nishiyama, A., Yao, L., Nagai, Y., Miyata, K., Yoshizumi, M., Kagami, S., et al. (2004). Possible contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase to renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertension*, 43(4): 841-848.
- Patschan, D., Patschan, S. and Müller, G.A. (2012). Inflammation and microvasculopathy in renal ischemia reperfusion injury. *Journal of transplantation*, 2012(1): 764154.

- Pham, T.H., Kim, M.S., Le, M.Q., Song, Y.S., Bak, Y., Ryu, H.W., et al. (2017). Fargesin exerts anti-inflammatory effects in THP-1 monocytes by suppressing PKC-dependent AP-1 and NF- κ B signaling. *Phytomedicine*, 24: 96-103.
- Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G. and Hoekstra, W. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 179(4073): 588-590.
- Sancaktutar, A.A., Bodakci, M.N., Hatipoglu, N.K., Soylemez, H., Basarılı, K. and Turkcu, G. (2014). The protective effects of pomegranate extracts against renal ischemia-reperfusion injury in male rats. *Urology annals*, 6(1): 46-50.
- Sha, S., Xu, D., Wang, Y., Zhao, W. and Li, X. (2016). Antihypertensive effects of fargesin in vitro and in vivo via attenuating oxidative stress and promoting nitric oxide release. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 94(999): 900-906.
- Shen, Y., Li, C.G., Zhou, S.F., Pang, E.C., Story, D.F. and Xue, C.C. (2008). Chemistry and bioactivity of Flos Magnoliae, a Chinese herb for rhinitis and sinusitis. *Current medicinal chemistry*, 15(16): 1616-1627.
- Shobana, S. and Naidu, K.A. (2000). Antioxidant activity of selected Indian spices. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 62(2): 107-110.
- Szcześniak, K.A., Ostaszewski, P., Ciecierska, A. and Sadkowski, T. (2016). Investigation of nutritive phytochemical-gamma-oryzanol in experimental animal models. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 100(4): 601-617.
- Tanyeli, A., Eraslan, E., GÜLER, M., Kurt, N. and Akaras, N. (2020). Gossypin protects against renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 26(1).
- Thurman, J.M. (2007). Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. *Clinical immunology*, 123(1): 7-13.
- Vijayakumar, R., Surya, D. and Nalini, N. (2004). Antioxidant efficacy of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. *Redox Report*, 9(2): 105-110.
- Wang, G., Gao, J.H., He, L.H., Yu, X.H., Zhao, Z.W., Zou, J., et al. (2020). Fargesin alleviates atherosclerosis by promoting reverse cholesterol transport and reducing inflammatory response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(5): 158633.
- Wang, X., Cheng, Y., Xue, H., Yue, Y., Zhang, W. and Li, X. (2015). Fargesin as a potential β 1 adrenergic receptor antagonist protects the hearts against ischemia/reperfusion injury in rats via attenuating oxidative stress and apoptosis. *Fitoterapia*, 105: 16-25.
- Wang, Z., Wu, X., Wang, C.L., Wang, L., Sun, C., Zhang, D.B., et al. (2018). Tryptanthrin protects mice against dextran sulfate sodium-induced colitis through inhibition of TNF- α /NF- κ B and IL-6/STAT3 pathways. *Molecules*, 23(5): 1062.
- Yaribeygi, H., Simental-Mendía, L.E., Butler, A.E. and Sahebkar, A. (2019). Protective effects of plant-derived natural products on renal complications. *Journal of cellular physiology*, 234(8): 12161-12172.
- Zhang, H., Deng, A., Zhang, Z., Yu, Z., Liu, Y., Peng, S., et al. (2016). The protective effect of epicatechin on experimental ulcerative colitis in mice is mediated by increasing antioxidation and by the inhibition of NF- κ B pathway. *Pharmacological reports*, 68: 514-520.
- Zhao, W., Zhou, T., Fan, G., Chai, Y. and Wu, Y. (2007). Isolation and purification of lignans from *Magnolia biondii* Pamp by isocratic reversed-phase two-dimensional liquid chromatography following microwave-assisted extraction. *Journal of separation science*, 30(15): 2370-2381.
- Zolali, E., Asgharian, P., Hamishehkar, H., Kouhsoltani, M., Khodaii, H. and Hamishehkar, H. (2015). Effects of gamma oryzanol on factors of oxidative stress and sepsis-induced lung injury in experimental animal model. *Iranian journal of basic medical sciences*, 18(12): 1257.
- Zweier, J.L. and Talukder, M.H. (2006). The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovascular research*, 70(2): 181-190.