



فصل نامه داروهای گیاهی

journal homepage: www.jhd.iaushk.ac.ir



اثر عصاره هیدروالکلی پوست انار بر پیشگیری از سنگ کلیه القاء شده توسط اتیلن گلیکول در رت نژاد ویستار

مصطفی مرتضوی، لیلا روحی*

گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران؛

*مسئول مکاتبات (E-mail: Rouhi_59@yahoo.com)

چکیده	شناسه مقاله
<p>مقدمه و هدف: با توجه به اهمیت گیاهان دارویی در درمان انواع بیماری های کلیوی، در این مطالعه اثر پیشگیری کننده عصاره هیدروالکلی پوست انار بر روی سنگ کلیه ناشی از اتیلن گلیکول در رت های نژاد ویستار مورد بررسی قرار گرفته است.</p> <p>روش تحقیق: ۲۰ عدد رت نژاد ویستار به طور تصادفی به ۴ گروه یکسان تقسیم شدند. گروه ۱، حیواناتی که به عنوان گروه کنترل سالم در نظر گرفته شدند (A) و به مدت ۲۸ روز آب مقطر دریافت می کردند. گروه ۲ تا ۴ حیواناتی بودند که به مدت ۲۸ روز ۱٪ اتیلن گلیکول را در آب آشامیدنی دریافت می کردند. گروه ۲، به عنوان گروه کنترل منفی (اتیلن گلیکول) در نظر گرفته شد (B). گروه ۳ و ۴ (گروه های پیشگیری)، روزانه به میزان 200 mg/kg وزن بدن (C) و 400 mg/kg (D)، عصاره هیدروالکلی پوست انار را به مدت ۲۸ روز به صورت گاواژ دریافت کردند. نمونه های ادرار ۲۴ ساعته آنها در روزهای صفر و ۲۸ جمع آوری شد. سپس حجم ادرار و پارامترهای ادراری (اگزالات، کلسیم و سیترات) اندازه گیری شد. در روز ۲۸ خون نمونه ها برای ارزیابی پارامترهای بیوشیمیایی (کراتینین، اوره و اسید اوریک) جمع آوری شد. در پایان آزمایش تمام رت ها با کلروفرم کشته شدند و کلیه آنها به سرعت جدا گردید و از نظر آسیبهای بافتی توسط آنالیز بافت شناسی مورد بررسی قرار گرفت.</p> <p>نتایج و بحث: اتیلن گلیکول میزان اگزالات و کلسیم ادرار، میزان اوره، اسید اوریک و کراتینین سرم را به طور معنی داری افزایش داد. همچنین سطح سیترات ادرار را به طور معنی داری کاهش داد. در گروه های پیشگیری نتایج نشان داد سطح کلسیم و اگزالات ادرار، و سطح کراتینین، اوره و اسید اوریک سرم کاهش یافت. همچنین سطح سیترات ادرار به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0.01$). نتایج بافت شناسی نشان دهنده کاهش اتساع فضای ادراری کپسول بومن، هیدروپیک دژنراسن سلول های پوششی لوله های کلیوی و عدم رسوب پروتئین و کلسیم در مجاری در گروه های پیشگیری بود.</p> <p>توصیه کاربردی / صنعتی: عصاره هیدروالکلی پوست انار در پیشگیری از سنگ کلیه ناشی از اتیلن گلیکول در رت های نژاد ویستار می تواند مؤثر باشد.</p>	<p>تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۲/۱۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۶/۱۰ نوع مقاله: علمی - پژوهشی موضوع: گیاهان دارویی</p> <p>کلید واژگان:</p> <ul style="list-style-type: none">✓ سنگ کلیه✓ اگزالات کلسیم✓ اتیلن گلیکول✓ پوست انار

۱. مقدمه

مختلف در درمان سنگ کلیه مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Hadjzadeh, 2012 ; Manjula et al., 2012).

انار با نام علمی *Punica granatum* L. گیاهی متعلق به خانواده Punicaceae می‌باشد (Zamani, 1990). عصاره‌های حاصل از بخش‌های مختلف میوه انار، غنی از ترکیبات فنولیکی می‌باشد. پوست انار به دلیل حضور فنل‌هایی مانند الازیک، تانن‌ها، اسید الازیک و اسیدگالیک دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بسیار بالا می‌باشد (Li, 2006). انار دارای خواص فراوانی از جمله خواص ضد تومور، ضد التهاب، ضد ویروس، ضد باکتری، ضد اسهال همچنین خواص آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشد که باعث شده در طی سال‌های اخیر مطالعات فراوانی روی این میوه ارزشمند صورت بگیرد و خصوصیات دارویی آن مورد توجه محققین زیادی قرار گرفته است (Viladomiu et al., 2013). با این وجود تا به حال تحقیق جامعی بر اثرات پوست این گیاه بر سنگ‌های کلیوی صورت نگرفته است، لذا در تحقیق حاضر اثر عصاره هیدروالکلی پوست انار بر سنگ‌های کلیوی القاء شده توسط اتیلن گلیکول در رت بررسی گردید.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. جمع آوری گیاهان

در این مطالعه از پوست گیاه انار استفاده گردید. این گیاه از منطقه دورک اناری واقع در ۱۵۰ کیلومتری شهرکرد تهیه شده و جنس و گونه آن به تأیید بخش گیاهان دارویی شهرکرد رسید. در این تحقیق عصاره‌گیری به روش سوکسیله انجام شد. سپس دوزهای مختلف عصاره با حل کردن عصاره در حلال مناسب (آب مقطر) تهیه گردید.

۲-۲. تیمار حیوانات

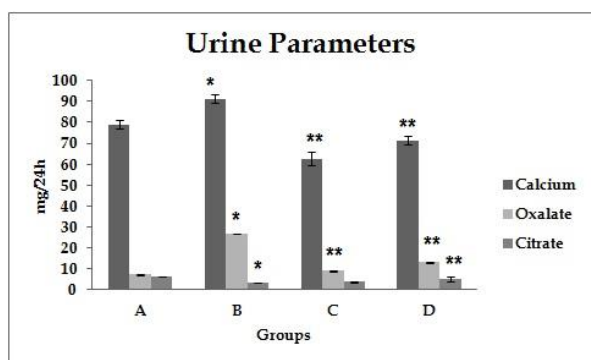
این مطالعه در آذر ماه سال ۱۳۹۳ در حیوان‌خانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شد. در این مطالعه از رت نژاد ویستار استفاده گردید. رت‌ها به وزن تقریبی ۲۰۰-۱۵۰ گرم بودند. در تمام مدت آزمایشات تحت شرایط استاندارد (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) و درجه حرارت ۲۱ درجه سانتیگراد قرار داشتند. در این مطالعه تجربی ۲۰ سر رت نژاد ویستار به طور تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند. رت‌های گروه کنترل سالم (گروه A) و کنترل

بیماری‌های کلیه از جمله مهم‌ترین علل مرگ و ناتوانی در بسیاری از کشورها هستند که به دلیل شیوع نسبتاً بالای آن به خصوص در کشورهای در حال توسعه، یکی از مسائل مهم اورولوژی و نفرولوژی به شمار می‌آیند. سنگ‌های کلیوی پس از عفونت‌های ادراری و اختلالات پاتولوژیک پروستات، سومین بیماری شایع دستگاه ادراری هستند. اکثر افراد مبتلا به سنگ‌های کلیوی از دردهای کولیکی رنج می‌برند که غالباً با داروهای رایج ضد درد از بین نمی‌رود و برای تسکین درد از داروهای مخدر استفاده می‌شود (Guyton and Hall, 2012; Saeidi et al., 2011). از سوی دیگر انسدادی که این سنگ‌ها ایجاد می‌کنند، باعث کاهش برون‌ده کلیه می‌شود و اگر در کوتاه مدت درمان نشود، می‌تواند باعث ایجاد برخی اختلالات و نارسایی‌های مزمن در کلیه و حتی باعث ایجاد آسیب‌های غیر قابل جبران کلیه شود (Guyton and Hall, 2011). اقدامات درمانی تهاجمی و جراحی شامل: حل کردن سنگ از طریق شیمیایی، خارج کردن سنگ از طریق مجرای ادراری، خارج کردن یا خرد کردن سنگ از طریق پوست، سنگ شکنی با امواج ماوراء صوت از طریق خارج بدن و در صورت نیاز جراحی باز است. درمان جراحی و یا سنگ شکنی علاوه بر هزینه‌های سنگین که به بیمار تحمیل می‌کند، عوارض جانبی متعددی از جمله عفونت دستگاه ادراری دارد که ممکن است علاوه بر آسیب شدید بافت کلیه موجب عفونت عمومی بدن شود (Biswas, 2012; Saeidi et al., 2012).

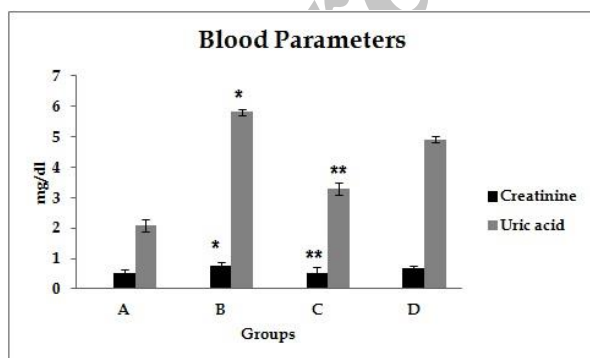
در تحقیقات نشان داده شده که بالغ بر ۸۰ درصد سنگ‌های کلیه از اگزالات کلسیم تشکیل می‌شوند، اما کریستال‌ها ممکن است، حاوی کلسیم فسفات و اوریک اسید نیز باشند (Liebman and Costa, 2000). شایع‌ترین آن‌ها سنگ‌های اگزالات کلسیم و موارد نادرتر به صورت فسفات کلسیم است (Robbins and Cotran, 2005) افراد مبتلا به این سنگ‌ها ممکن است دارای بیماری‌های زمینه‌ای، مانند سارکوئیدز و هیپراگزالوریا، باشند که میزان کلسیم خون را افزایش می‌دهد (Goljan, 2007).

امروزه با روشن شدن عوارض جانبی و آثار زیان‌بخش داروهای شیمیایی، استفاده از داروهای گیاهی و طبیعی مورد توجه پژوهشگران معاصر قرار گرفته است و در مطالعات متعدد اثرات داروهای گیاهی

معنی داری مشاهده نشد ($P > 0.05$). در روز ۲۸ غلظت اگزالات ادراری گروه B (اتیلن گلیول) نسبت به گروه سالم A افزایش معنی داری یافته بود ($P \leq 0.01$)، این در حالی است که میزان این ترکیب در گروه‌های پیشگیری (C و D) به طور معنی داری نسبت به گروه B کاهش یافت ($P \leq 0.05$). غلظت اگزالات ادرار گروه‌های کنترل سالم، C و D تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند (شکل ۱). مقایسه غلظت سیترات ادرار نشان داد که در روز ۲۸ مطالعه، گروه D میزان سیترات بالاتری نسبت به سایر گروه B داشت (شکل ۱) که تفاوت معنی داری را نشان داد ($P \leq 0.01$). همچنین مقایسه کلسیم ادرار در روز ۲۸ نشان داد که در گروه‌های D و C نسبت به گروه B به طور معنی داری مقادیر کلسیم کمتری وجود دارد که نشان می‌دهد میزان دفع کلسیم در گروه‌های پیشگیری کاهش یافته است (شکل ۱).



شکل ۱. بررسی پارامترهای ادرار در روز صفر و ۲۸.



شکل ۲. بررسی پارامترهای خونی در روز ۲۸.

در مطالعاتی که بر روی عصاره استخراج شده از پوست انار انجام شده، مشخص گردیده است که پوست این گیاه حاوی ترکیبات آنتی

منفی (گروه B) به ترتیب آب معمولی و آب حاوی اتیلن گلیکول ۱ درصد دریافت کردند و گروه‌های پیشگیری، ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم (گروه C) و ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم (گروه D) عصاره پوست انار را روزانه، همراه با اتیلن گلیکول، به صورت گاوآژ دریافت کردند.

۳-۲. بررسی بیوشیمیایی ادرار

جهت اندازه‌گیری پارامترهای ادراری، در روزهای صفر و ۲۸ مطالعه نمونه ادرار ۲۴ ساعته آن‌ها در قفسه‌های متابولیک جمع‌آوری شد. از ادرار جمع‌آوری شده جهت بررسی پارامترهای ادراری (اگزالات، کلسیم و سیترات) استفاده گردید.

۴-۲. بررسی بیوشیمیایی خون

نمونه‌های خون در روزهای ۰ و ۲۸ از حیوانات در تمام گروه‌ها جمع‌آوری شد که در روز صفر حیوانات با استفاده از کلروفورم بیهوش شدند و نمونه خون از گوشه چشم آنها تهیه شد. در روز ۲۸ پس از نمونه‌گیری خون با استفاده از روش خون‌گیری مستقیم از قلب انجام شد و پارامترهای بیوشیمیایی (کراتینین، اوره و اسید اوریک) کمک کیت‌های اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت.

۵-۲. بررسی آسیب شناسی

بعد از تیمار رت‌ها به مدت ۲۸ روز، در روز آخر رت‌ها با کلروفورم به‌طور ملایم بیهوش و سپس کشته شدند و کلیه آن‌ها به سرعت جدا شد. کلیه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفتند و سایر مراحل آسیب‌شناسی با میکروسکوپ نوری جهت بررسی آسیب‌های احتمالی کلیه بر روی آن‌ها انجام گرفت.

۶-۲. تجزیه آماری

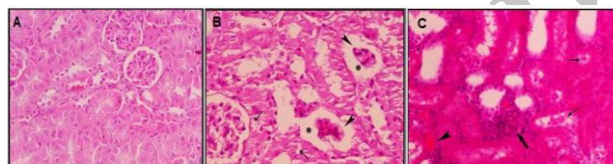
جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات از تجزیه واریانس یک طرفه و همچنین از مقایسه میانگین به روش آزمون توکی با سطح احتمال ۰/۰۵ با استفاده از نرم افزار آماری (SPSS Ver.16) استفاده شد.

۳. نتایج و بحث

۳-۱. نتایج بررسی بیوشیمیایی ادرار

بر اساس نتایج حاصله در روز صفر، مقادیر اگزالات، کلسیم و سیترات ۲۴ ساعته رت‌های تمام گروه‌ها یکسان بوده و هیچ تفاوت

رسوبات قرمز رنگ پروتئین در داخل مجاری به خصوص در ناحیه قشری قابل مشاهده بودند (شکل ۳-۲). بررسی های میکروسکوپی گروه‌ها نشان داد، در گروه‌های تیمار با عصاره هیدروآلکلی پوست انار، شدت ضایعات وارده به کلیه کاهش یافته بود. رسوب پروتئین و کلسیم در لوله‌ها محدود شده بود و از نظر بافت شناسی تفاوت مشهودی بین گروه های تیمار مشاهده نشد (شکل ۳-۲). اتیلن گلیکول در بدن متابولیت‌های سمی نظیر گلیکوالدهید و گلی اگزالات تولید می‌کند که منجر به آسیب بافتی و افزایش اگزالات ادرار می‌شوند و چنانچه مقدار اگزالات و اسید اوریک و یا هر ۲ در ادرار زیاد باشد، تشکیل سنگ‌های کلسیمی افزایش می‌یابد. توده‌های اگزالات کلسیم تشکیل شده قطری حدود ۲۰-۲۵ میکرومتر دارند که کوچک‌تر از قطر خروجی مجاری جمع کننده ادرار است، اما چسبیدن توده‌های اگزالات کلسیم به سطوح مجاری ادرار باعث رشد آن‌ها می‌شود به طوری که نمی‌توانند دفع شوند (Henry, 1996; Halabe et al., 2003; Fredric, et al., 2008). کاهش اتساع فضای ادراری کپسول بومن، هیدروپیک دژنراسی سلول‌های پوششی لوله‌های کلیوی و عدم رسوب پروتئین و کلسیم در مجاری در گروه‌های پیشگیری بود که نشان دهنده عدم تشکیل سنگ های کلیوی می باشد.



شکل ۳. نتایج آسیب شناسی رت‌ها.

۴. نتیجه گیری

نتایج نشان داد که تجویز عصاره انار بر پیشگیری از سنگ کلیه مؤثر بوده و لذا به نظر می‌رسد که فراورده‌های انار از جمله عصاره هیدروآلکلی آن که در این پژوهش به کار برده شد، در پیشگیری سنگ کلیه در افرادی که مستعد تشکیل سنگ‌های اگزالاتی هستند می‌تواند مؤثر باشد، اگر چه لازم است با انجام آزمایشات بالینی این اثر بخشی به اثبات برسد.

۵. منابع

اکسیدان و آنتی باکتریال قوی است که می‌تواند نقش پیشگیری کننده در بروز عفونت‌های کلیوی و تشکیل سنگ داشته باشد (Lee, 2010; Lansky and Newman, 2007). بر اساس گزارشات اخیر انار غنی از پلی‌فنل‌ها، آنتوسیانین‌ها و تعدادی زیادی از آلکالوئیدها است که می‌تواند باعث نرم و لغزنده شدن مجاری ادراری شده و دفع سنگ‌های کلیوی را تسهیل کند (Vidhan, 2010; Lee, 2010).

۳-۲. نتایج بررسی بیوشیمیایی خون

بررسی میزان اسید اوریک گروه‌های مختلف در روز صفر تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. ولی میزان اسید اوریک در روز ۲۸ در گروه B نسبت به گروه A افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P \leq 0/01$) (شکل ۲). نتایج آزمایش گروه D نشان داد، میزان اسید اوریک نسبت به گروه B کاهش یافت ولی این تفاوت معنی دار نبود. ولی میزان اسید اوریک در گروه C نسبت به گروه B کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P \leq 0/01$). همچنین مقایسه غلظت کراتینین در بازه زمانی ۲۸ روز نشان داد که گروه C کمترین میزان کراتینین داشته است که با گروه A اختلاف معنی‌داری نداشت در حالیکه در مقایسه با گروه B کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P \leq 0/01$) (شکل ۲). این نتایج حاکی از این است که اتیلن گلیکول خطر تشکیل سنگ را بالا برده و موجب کاهش فیلتراسیون گلومرولی (GFR) در کلیه گردیده است. این یافته‌ها پیشنهاد می‌کنند که عملکرد کلیه در گروه‌های پیشگیری بهبود یافته است. افزایش فیلتراسیون گلومرولی (GFR) به فعالیت آنتی اکسیدانی قوی و خاصیت آنتی لیپیدی (در واکنش‌های پراکسیداسیون) عصاره انار نسبت داده شده است. در مطالعات دیگر گزارش شده که انار غنی از ترکیبات آنتی اکسیدانی قوی، کاروتن‌ها، ویتامین C و ویتامین E می‌باشد (Bagri et al., 2009; Turk, et al., 2008).

۳-۳. نتایج آسیب شناسی

بررسی ها نشان داد در گروه کنترل، اجزاء پارانشیمی بافت کلیه از جمله گلومرولها، لوله های پروکسیمال و دیستال از نظر بافت شناسی نرمال بوده و فاقد هر گونه ضایعه پاتولوژیک و رسوب کریستالهای اگزالات و یا پروتئین بودند (شکل ۳-۲). در حالی که در گروه B، گلومرول‌ها دچار آسیب شده بودند. به دلیل آسیب گلومرولها پروتئین‌ها از راه خون به داخل ادرار نشت کرده و به صورت

- calcium oxalate urolithiasis in albino rats. *Urol Res.* 40(5):499-510.
- Robbins, SL., Cotran RS. 2005. Cotranpathologic basis of disease. Philadelphia: Elsevier Saunders. 32:77-140.
- Saeidi, J., Bozorgi, H., Zendehtdel, A., Mehrzad, J. 2012. Therapeutic effects of aqueous extracts of *Petroselinum Sativum* on ethylene glycol- induced kidney calculi in rats. *Urol Journal.* 9(1): 61-66.
- Turk, G., Sonmez, M., Avdin, M., Yuce, A., Gur, S., Yuksel, M., Aksu, E.H., Aksoy,H., 2008. Effects of pomegranate juice consumption on sperm quality, spermatogenic cell density, antioxidant activity and testosterone levels in male rats. *Clinical Nutrition.*, 27: 287-296.
- Vidhan, J., Ara, D.M., John, R.P. 2010. Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried aerals of pomegranate (*Punica granataum L.*). *Food Chemistry.* 118: 11-16.
- Viladomiu, M., Hontecillas, M., Lu, P., Bassaganya-Riera, J. 2013. Preventive and prophylactic mechanisms of action of pomegranate bioactive constituents. *Evid Based Complement Alternat Med.* doi: 10.1155/789764. [In press].
- Zamani, Z. 1990. Characteristics of Pomegranate Cultivars Grown in Saveh oIran. M.Sc. Thesis. University of Tehran. pp: 175.
- Bagri, P., Ali, M., Aeri, V., Bhowmik, M., Sultana, S. 2009. Antidiabetic effect of *Punica granatum* flowers: effect on hyperlipidemia, pancreatic cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Food and Chemical Toxicology.*, 47: 50-54.
- Biswas, D. 2012. Antilithiatic and nephroprotective activity of *Punica granatum linn.* on experimental animals. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences Life.*, 7: 976-712.
- Fredric L., Coe., Andrew Evan., Elaine Worcester. 2005. Kidney stone disease. *J. Clin. Invest.*, 115: 2598-2608.
- Goljan, EF. 2007. Pathology. Philadelphia: Mosby Elsevier. 12: 23-32
- Guyton, A., Hall, JE. 2011. Medical physiology. Translate Sepehri, H. Ghasemi, K. Publisher andisherafi. 31:504-509 .
- Henry, J. B. 1996. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Saunders Company, Toronto. 449-450.
- Hadjzadeh, M., Khajavi Rad, A., Rajaei, Z. 2012. The preventive effect of N-butanol fraction of *Nigella sativa* on ethylene glycol-induced kidney calculi in rats. *Pharmacogn Mag.*, 7(28): 338-343.
- Halabe A., Shor R., Wong N. L., Sutton R. A. 2003. Effect of vitamin D3 on the conversion of ethylene glycol to glycolate and oxalate in ethylene glycol-fed rats. *Clinical Chimie Acta.*, 330: 135-139.
- Lansky, EP., Newman, RA. 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J. Ethnopharmacol.*, 109: 177-206.
- Lee, C-Chen, L-G., Liang, W-L., Wang, C-C. 2010. Anti-inflammatory effects of *Punicagranatum Linne* in vitro and in vivo. *J.Food Chemistry.* 118:315-322.
- Liebman, M., and Costa, G. 2000. Effects of calcium and magnesium on urinary oxalate excretion after oxalate loads. *The Journal of Urology.* 163-1565.
- Li, Y. 2006. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chem.*, 96: 254-60.
- Manjula, K., Rajendran, K., Eevera, T., Kumaran, S. 2012. Effect of *Costus igneus* stem extract on