

Protective Effect of P-Coumaric Acid against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity and Hepatotoxicity in Rats

Zeynab Mohamadi Yarijani¹,
Houshang Najafi²,
Seyed Hamid Madani³

¹ MSc in Physiology, Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

² Associate Professor, Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

³ Professor, Molecular Pathology Research Center, Imam Reza Hospital, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

(Received December 8, 2019 ; Accepted April 12, 2020)

Abstract

Background and purpose: Cisplatin is used in chemotherapy for cancer patients. But, it has adverse effects on some organs, including the kidney and liver. P-coumaric acid is a polyphenolic substance with multiple biological properties. The present study aimed to investigate the effect of p-coumaric acid on renal and hepatic side effects of cisplatin.

Materials and methods: This experimental study was performed in 21 male rats that were randomly divided into three groups. In the sham group, 20% ethanol was gavaged for 7 days. The experimental group I received 20% ethanol for 7 days + a single dose of cisplatin (8 mg/kg) at day 5. The experimental group II received cisplatin (8 mg/kg at day 5) + p-coumaric acid (100 mg/kg/day) for 7 days. The functional disturbances of kidney and liver were assessed by measuring the blood levels of creatinine, urea-nitrogen, AST, ALT, and ALP. Also, measuring MDA and FRAP levels in kidney and liver tissues were used to assess oxidative stress. The tissue damages were also assessed by studying H&E stained slides.

Results: Cisplatin administration increased the concentrations of creatinine, urea-nitrogen, AST, ALT, ALP, MDA, tissue damages, and decreased FRAP. Application of p-coumaric acid led to complete or relative improvements in functional parameters of kidney and liver, and reduced tissue damages and MDA level. The FRAP level was found to increase by the p-coumaric acid.

Conclusion: P-coumaric acid demonstrated a protective effect against the side effects of cisplatin in the kidneys and liver.

Keywords: cisplatin, p-coumaric acid, nephrotoxicity, hepatotoxicity, oxidative stress

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (185): 1-13 (Persian).

* **Corresponding Author: Houshang Najafi** - Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran (E-mail: hnajafi@kums.ac.ir)

اثر محافظتی p-کوماریک اسید بر آسیب های کلیوی و کبدی ناشی از سیس پلاتین در مدل رت

زینب محمدی یاریجانی^۱

هوشنگ نجفی^۲

سید حمید مدنی^۳

چکیده

سابقه و هدف: سیس پلاتین در شیمی درمانی برای بیماران سرطانی مورد استفاده قرار می گیرد. اما مصرف آن با عوارض جانبی در اندام های مختلف از جمله کلیه و کبد همراه است. p-کوماریک اسید یک ترکیب پلی فنولی با خواص متعدد است. هدف مطالعه حاضر بررسی تاثیر p-کوماریک اسید بر اثرات جانبی سیس پلاتین در کلیه و کبد است.

مواد و روش ها: این مطالعه تجربی بر روی ۲۱ سر رت نر و در سه گروه انجام شد. در گروه شاهد اتانول ۲۰ درصد به مدت ۷ روز گاوژ شد. گروه سیس پلاتین مانند گروه شاهد بود اما تک دوز سیس پلاتین (۸ mg/kg) را در روز پنجم دریافت کرد. در گروه سوم (سیس پلاتین به علاوه p-کوماریک اسید) علاوه بر دریافت سیس پلاتین در روز پنجم، p-کوماریک اسید با دوز ۱۰۰ mg/kg/day به مدت ۷ روز گاوژ شد. اختلالات عملکردی کلیه و کبد بوسیله اندازه گیری غلظت کراتینین، اوره- نیتروژن و آنزیم های کبدی AST، ALT و ALP پلازما ارزیابی شد. جهت ارزیابی استرس اکسیداتیو، سطح مالون دی آلدئید (MDA) و قدرت آنتی اکسیدانی توتال (FRAP) در بافت کلیه و کبد اندازه گیری شد. آسیب های بافتی از طریق مطالعه اسلایدهای رنگ آمیزی شده با H&E بررسی شد.

یافته ها: سیس پلاتین سبب افزایش سطح کراتینین، اوره- نیتروژن، AST، ALT و ALP، MDA و آسیب های بافتی و کاهش FRAP در کلیه و کبد شد. p-کوماریک اسید منجر به بهبود نسبی یا کامل پارامترهای عملکردی کلیه و کبد، کاهش آسیب های بافتی و سطح MDA و افزایش سطح FRAP شد.

استنتاج: گاوژ p-کوماریک اسید قادر به محافظت از کلیه و کبد در برابر اثرات جانبی سیس پلاتین می باشد.

واژه های کلیدی: سیس پلاتین، p-کوماریک اسید، نفروتوکسیسیته، هپاتوتوکسیسیته، استرس اکسیداتیو.

مقدمه

و برخی دیگر از تومورها استفاده می شود (۱). با وجود این نشان داده شده که این دارو دارای عوارض جانبی متعددی از جمله نفروتوکسیسیته (۱،۲)، اتوتوکسیسیته (۳)،

سیس پلاتین (سیس دی کلرو دی آمین پلاتینیوم) یک داروی شیمی درمانی است که در درمان تومورهای مختلفی از جمله بیضه، تخمدان، مثانه، ریه، سر و گردن

E-mail: hnajafi@kums.ac.ir

مؤلف مسئول: هوشنگ نجفی - کرمانشاه: دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی

۱. کارشنای ارشد فیزیولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۲. دانشیار، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۳. استاد، مرکز تحقیقات پاتولوژی ملکولی، بیمارستان امام رضا، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۹/۱۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۸/۹/۲۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۹/۱/۲۴

هیدروکسیلاز سنتز می گردد (۱۶،۱۵). منبع اصلی p-کوماریک اسید در میوه‌ها (مثل سیب و گلابی)، سبزیجات (مثل لوبیا، سویا، سیب‌زمینی و گوجه فرنگی)، نوشیدنی‌ها (مثل چای و قهوه) و شکلات است (۱۷). مطالعات *In vivo* و *In vitro* متعددی بر روی p-کوماریک اسید انجام شده است و نشان داده‌اند که دارای خواص مختلفی از جمله مهار تجمع پلاکتی (۱۸)، مانعت از اکسیداسیون لیوپروتنین‌های با دانسته پایین (LDL) از طریق حذف رادیکال‌های آزاد (۱۹)، محافظت از روده کوچک در برابر التهاب ناشی از دکستران سولفات سدیم (۲۰)، اثرات ضد التهابی (۲۱، ۲۲)، محافظت از قلب در برابر استرس اکسیداتیو القا شده توسط دوکسورویسین (۲۳)، محافظت از کلیه در برابر کادمیوم کلراید (۲۴) و کاهش بیان سیتوکین‌های پیش‌التهابی (IL-17, IL-6, IL-1b, TNF α) و آنزیم‌های التهابی (COX-2 و iNOS) است (۲۷-۲۵).

همچنین، Akdemir و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند p-کوماریک اسید به واسطه خواص آنتی‌اکسیدانی خود سبب کاهش آسیب‌های سلولی ناشی از سیس پلاتین در کلیه و کبد می‌شود (۱۴). با وجود این، در این مطالعه اثرات محافظت‌کنندگی p-کوماریک اسید در برابر اختلالات عملکردی ناشی از سیس پلاتین در کلیه و کبد مورد بررسی قرار نگرفته است. لذا مطالعه حاضر به نحوی طراحی شد تا با اندازه‌گیری پارامترهای عملکردی، استرس اکسیداتیو و آسیب‌های بافتی، اثرات محافظت‌کنندگی p-کوماریک اسید در برابر سیس پلاتین در کلیه و کبد را مورد بررسی قرار دهد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی بر روی ۲۱ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار و در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم انجام شد. حیوانات در شرایط یکسان و کنترل شده از نظر میزان نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و

هپاتوتوکسیسیته (۵،۴) و نوروکسیسیته (۶) می‌باشد. اگرچه مکانیسم دقیق نفروکسیسیته ناشی از سیس پلاتین هنوز به طور کامل شناخته نشده است، اما مشخص شده که استرس اکسیداتیو نقش مهمی بازی می‌کند (۷). استرس اکسیداتیو با افزایش سطح آنیون سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل و ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌تواند به پروتئین‌های سلولی، چربی‌ها و DNA آسیب برساند (۸). همچنین مشخص شده که سیس پلاتین با فعال کردن سیتوکین‌ها و کموکین‌ها و در نتیجه ایجاد التهاب باعث اختلال در عملکرد کلیه‌ها می‌شود، به طوری که اینترلوکین-۱۰ سبب محافظت از کلیه در برابر آسیب‌های ناشی از ایسکمی و سیس پلاتین می‌گردد (۹). در کلیه سیس پلاتین در قطعه S3 توپول پروگزیمال تجمع پیدا می‌کند و باعث کاهش میزان فیلتراسیون گلومرولی و توانایی تغلیظ ادرار، تغییر حجم ادرار (۱۰) و در نتیجه افزایش غلظت اوره و کراتینین خون می‌شود (۱۱). همچنین مشخص شده که سیس پلاتین می‌تواند باعث آسیب به کبد نیز شود (۵،۴). اطلاعات خیلی کمی در مورد مکانیسم ایجاد آسیب کبدی متعاقب به کارگیری سیس پلاتین وجود دارد، اما مشخص شده که استرس اکسیداتیو از طریق ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در آن مشارکت دارد (۱۲). علاوه بر این، آسیب به ساختار و عملکرد میتوکندری، آپوپتوز، اختلال در هومئوستاز Ca^{2+} و القای بیان ژن آنزیم‌های پیش‌التهابی، مانند COX-2 و نیتریک اکسید سنتتاز قابل القا (iNOS)، می‌تواند نقش مهمی در مکانیسم هپاتوتوکسیسیته القا شده توسط سیس پلاتین ایفا نماید (۵). سیس پلاتین باعث افزایش پروکسیداسیون لیپیدهای غشایی در کبد (افزایش MDA)، و افزایش آنزیم‌های کبدی ALT و AST نیز می‌شود (۱۳، ۱۴).

p-کوماریک اسید (4-hydroxyphenyl-2-) (propenoic acid) یک ترکیب پلی فنولی است که از سینامیک اسید و توسط آنزیم ۴-سینامیک اسید

آنتی‌اکسیدانی توتال بافت (FRAP)، به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد انتقال یافت. آنگاه کلیه چپ و یک نمونه از بافت کبد جهت بررسی آسیب بافتی و اینفیلتراسیون لکوسیتی در محلول فرمالین ۱۰ درصد نگهداری گردید تا با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ آمیزی شود (۱۳). در پایان آزمایش نیز حیوان‌ها با استفاده از بیهوشی عمیق معدوم شدند.

اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی: جهت ارزیابی عملکرد کلیه، غلظت کراتینین و اوره- نیتروژن پلاسما با استفاده از اتوانالایزر اندازه‌گیری شد (Biosystem, Cat no: 28514, 28101). همچنین جهت بررسی اختلالات عملکردی کبد، آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) اندازه‌گیری شدند (Biosystem, Cat no: 33571, 33322, 33371).

اندازه‌گیری میزان استرس اکسیداتیو: جهت بررسی وضعیت استرس اکسیداتیو سطح مالون دی‌آلدئید (MDA) که محصول نهایی پروکسیداسیون لیپیدهای غشایی توسط گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد و همچنین FRAP که بیانگر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی توتال بافت است، به روش رنگ سنجی در بافت کلیه و کبد همان گونه که در مطالعات قبلی توضیح داده شده است (۱۳، ۲۸)، اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، نحوه اندازه‌گیری MDA این گونه بود که پس از هموژنیزه کردن بافت در بافر فسفات، اسید استیک ۲۰ درصد، تیوباریتوریک اسید ۰/۸ درصد، سولفات دئودوسیل سدیم ۸/۱ درصد و عصاره بافتی به همه لوله‌های آزمایش اضافه شد و به مدت ۶۰ دقیقه در water bath با دمای ۹۵°C گرما داده شد. کمپلکس رنگی حاصل با افزودن ۱- بوتانل استخراج و جذب نوری آن توسط اسپکتروفوتمتر در طول موج 532 nm اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری سطح FRAP نیز ابتدا معرف FRAP تازه تهیه شد که حاوی محلول TPTZ ۱۰ میلی‌مولار در اسید کلریدریک ۴۰ میلی‌مولار، FeCl₃ ۲۰ میلی‌مولار و بافر استات ۰/۳

دمای محیط (۲۳±۱ °C) و در داخل قفس پلی‌پروپیلن نگهداری شدند و در طول آزمایش دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد داشتند. در هر گروه حداقل تعداد حیوانات مورد نیاز در نظر گرفته شد و در صورتی که در طول آزمایش هر کدام از حیوان‌ها علائمی که بیانگر درد و رنج ناخواسته باشد را نشان می‌دادند (شامل ناتوانی، کاهش تحرک و حالت غیر نرمال) از آزمایش خارج شده و بوسیله بیهوشی عمیق معدوم می‌شدند. تمام آزمایشات و پروسیجرها بر اساس اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد و تکنیک مطالعه نیز توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه مورد تصویب قرار گرفت (Approval number: IR.KUMS.REC.1397.272).

پروتکل آزمایش: حیوانات مورد آزمایش به طور تصادفی به ۳ گروه تقسیم شدند. گروه اول (شاهد) اتانول ۲۰ درصد را به مدت ۷ روز بصورت گاوآژ دریافت کرد و در روز پنجم به جای سیس پلاتین، نرمال سالین به صورت داخل صفاقی تزریق شد. گروه دوم گروه دریافت کننده سیس پلاتین بود که تک دوز سیس پلاتین (۸ mg/kg) را در روز پنجم دریافت کرد (۱۳) و از روز اول تا هفتم اتانول ۲۰ درصد به صورت گاوآژ داده شد. گروه سوم گروه دریافت کننده سیس پلاتین بعلاوه p-کوماریک اسید بود که به مدت ۷ روز p-کوماریک اسید را با دوز ۱۰۰ mg/kg در اتانول ۲۰ درصد به صورت گاوآژ دریافت کرد (۲۳) و در روز پنجم تک دوز سیس پلاتین (۸ mg/kg) به صورت داخل صفاقی تزریق شد.

در پایان روز هفتم حیوان‌ها با استفاده از پنتوباریتال سدیم (۵۰ mg/kg) بیهوش شدند و شکم آن‌ها باز شد. ابتدا یک نمونه خون از آئورت نزولی گرفته شد و سپس کلیه‌ها و کبد خارج شدند. کلیه راست و مقداری از بافت کبد به صورت آبی در نیتروژن مایع فریز شد و جهت بررسی وضعیت استرس اکسیداتیو، از طریق اندازه‌گیری سطح مالون دی‌آلدئید (MDA) و قدرت

یافته ها

تاثیر p-کوماریک اسید بر اختلالات عملکردی کلیوی و کبدی ناشی از سیس پلاتین همان گونه که در جدول شماره ۱ مشاهده می شود سیس پلاتین باعث افزایش غلظت کراتینین و اوره-نیترژن پلاسما نسبت به گروه شاهد گردید ($P < 0/001$) که استفاده همزمان سیس پلاتین و p-کوماریک اسید توانست باعث کاهش معنی دار غلظت کراتینین و اوره نیترژن پلاسما نسبت به گروه سیس پلاتین شود ($P < 0/05$). با وجود این، همچنان غلظت کراتینین ($P < 0/001$) و اوره-نیترژن پلاسما ($P < 0/001$) در گروه دریافت کننده همزمان سیس پلاتین و p-کوماریک اسید بیش تر از گروه شاهد بود.

جدول شماره ۱: تاثیر گاوژ p-کوماریک اسید بر تغییرات پارامترهای عملکردی کلیه و آنزیم های کبدی ناشی از سیس پلاتین

پارامتر	گروه های آزمایشی	
	سیس پلاتین + کوماریک اسید	سیس پلاتین
کراتینین (mg/dl)	۰/۴۸±۰/۰۴	۱/۴۶±۰/۱۴
اوره نیترژن (mg/dl)	۱۵/۸±۰/۰۷	۸۲/۴±۰/۳
AST (unit/l)	۶۹/۵±۴/۲	۸۵/۰±۵/۵
ALT (unit/l)	۵۰/۵±۲/۸	۷۹/۷±۴/۳
ALP (unit/l)	۲۷۸/۷±۴۰/۰	۵۶۷/۲±۶/۱

مقادیر به صورت میانگین ± خطای معیار برای کراتینین، اوره-نیترژن، آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST)، آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) در گروه های تحت مطالعه ($n=7$ در هر گروه).

$P < 0/05$ * و $P < 0/01$ ** و $P < 0/001$ *** در مقایسه با گروه شاهد. $P < 0/05$ † و $P < 0/01$ †† و $P < 0/001$ ††† در مقایسه با گروه سیس پلاتین

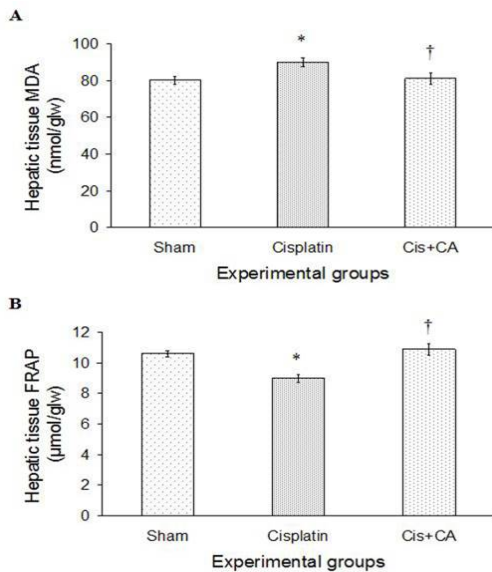
همچنین، سیس پلاتین باعث افزایش معنی دار سطح AST، ALT و ALP پلاسما در مقایسه با گروه شاهد شد (جدول شماره ۱).

گاوژ p-کوماریک اسید با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن توانست منجر به کاهش قابل ملاحظه سطح هر سه آنزیم در مقایسه با گروه دریافت کننده سیس پلاتین به تنهایی گردد. به طوری که سطح AST و ALT به حدود مقدار آن‌ها در گروه شاهد رسید و

مولار بود. آنگاه عصاره بافتی اضافه شد و به دمای 37°C رسانده شد. سطح FRAP با اندازه گیری جذب نوری کمپلکس حاصل در طول موج 593 nm محاسبه گردید. ارزیابی آسیب های بافتی کلیه و کبد: جهت ارزیابی آسیب های بافتی کلیه و کبد، برش های رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین و ائوزین تهیه شد و توسط میکروسکپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور بافت کلیه و کبد تحت مراحل تثبیت، آبیگری، شفاف سازی و قالب گیری قرار گرفت و سپس برش های با ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد. سپس برش ها با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند و با میکروسکپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. آسیب های بافتی کلیه از نظر بزرگ شدن اندازه فضای بومن، نکروز توبولی، احتقان عروقی، کست های پروتئینی داخل توبولی، ادم دور عروقی و اینفیلتراسیون لکوسیت ها در ۱۰ فیلد میکروسکوپ و با عدسی چشمی ۴۰ بررسی شد. همچنین میزان اینفیلتراسیون لکوسیت ها، فیروز سلولی، اتساع سینوزوئیدی و احتقان عروقی در اسلایدهای کبد مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس درصدی از کل ناحیه مورد مطالعه در زیر میکروسکوپ که دچار آسیب شده بود مورد محاسبه قرار گرفت. این درصدها به این صورت درجه بندی شدند که به نبود آسیب درجه صفر، ۱-۲۰ درصد درجه ۱، ۲۱-۴۰ درصد درجه ۲، ۴۱-۶۰ درصد درجه ۳، ۶۱-۸۰ درصد درجه ۴، و ۸۰ درصد به بالا درجه ۵ تعلق گرفت. سپس تمام آسیب ها جمع و درجه کل آسیب هیستوپاتولوژیک محاسبه شد (۲۹).

آنالیز آماری: داده ها توسط نرم افزار آماری SPSS-23 مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. جهت مقایسه دیتاهای مربوط به عملکرد کلیه و کبد و همچنین استرس اکسیداتیو از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون Tukey post hoc استفاده شد. جهت مقایسه درجه هیستوپاتولوژیک کل در کلیه و کبد نیز از تست Non-parametric Kruskal-Wallis multiple comparison استفاده گردید. $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی داری داده ها در نظر گرفته شد.

به علاوه، به كارگیری سیس پلاتین سبب افزایش معنی دار میزان MDA و کاهش FRAP بافت کبد شد (نمودار شماره ۲). مصرف همزمان p-کوماریک اسید و سیس پلاتین توانست سطح MDA بافت کبد را کاهش و FRAP را افزایش دهد ($P < 0.05$). به طوری که هر دو متغیر به سطح مقادیر آن‌ها در گروه شاهد رسیدند و فاقد تفاوت معنی دار با آن بودند.



نمودار شماره ۲: میانگین ± خطای معیار برای مقادیر مالون دی آلدئید (A) و قدرت احیا کنندگی (B) بافت کبد در گروه دریافت کننده نرمال سالین (sham)، سیس پلاتین (Cis) و یا سیس پلاتین به علاوه p-کوماریک اسید (Cis+CA)، n=7 در هر گروه.

$P < 0.05$ * در مقایسه با گروه شاهد

$P < 0.05$ † در مقایسه با گروه سیس پلاتین

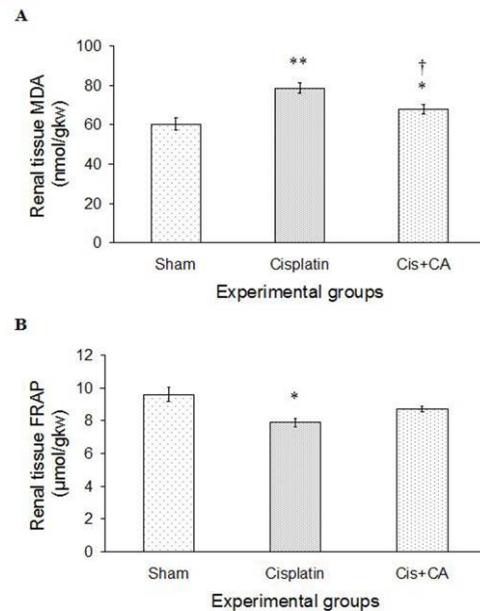
تاثیر p-كوماریك اسید بر آسیب های سلولی القا شده توسط سیس پلاتین در بافت کلیه و کبد

سیس پلاتین باعث افزایش اندازه فضای بومن با درجه ۲/۸، نکرور سلول‌های توبولی با درجه ۱/۵، احتقان عروقی با درجه ۲/۴، تشکیل کست‌های پروتئینی داخل توبولی با درجه ۱/۹، ادم دور عروقی با درجه ۰/۷ و اینفیلتراسیون لکوسیت‌ها با درجه ۱/۶ نسبت به گروه شاهد شد (جدول شماره ۲ و تصویر شماره ۱). به طوری که درجه هیستوپاتولوژیک کل در گروه دریافت کننده

فاقد تفاوت معنی دار با یکدیگر بودند، اما سطح ALP همچنان به طور معنی دار بالاتر از مقدار آن در گروه شاهد بود ($P < 0.05$).

تاثیر p-كوماریك اسید بر پروكسیداسیون لیپیدها و ظرفیت آنتی اكسیدانی توتال بافت کلیه و کبد

نمودار شماره ۱ نشان می‌دهد که میزان پروکسیداسیون لیپیدها (MDA) در بافت کلیه گروه دریافت کننده سیس پلاتین به طور معنی داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافته است ($P < 0.01$). همچنین، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی توتال (FRAP) بافت کلیه در گروه دریافت کننده سیس پلاتین به طور معنی داری کم‌تر از گروه شاهد است ($P < 0.05$). دریافت p-کوماریک اسید با سیس پلاتین توانست مانع افزایش MDA و کاهش FRAP توسط سیس پلاتین گردد، که تنها کاهش MDA نسبت به گروه سیس پلاتین معنی دار بود ($P < 0.05$).



نمودار شماره ۱: میانگین ± خطای معیار برای مقادیر مالون دی آلدئید (A) و قدرت احیا کنندگی (B) بافت کلیه در گروه دریافت کننده نرمال سالین (sham)، سیس پلاتین (Cis) و یا سیس پلاتین به علاوه p-کوماریک اسید (Cis+CA)، n=7 در هر گروه

$P < 0.05$ * $P < 0.01$ ** در مقایسه با گروه شاهد

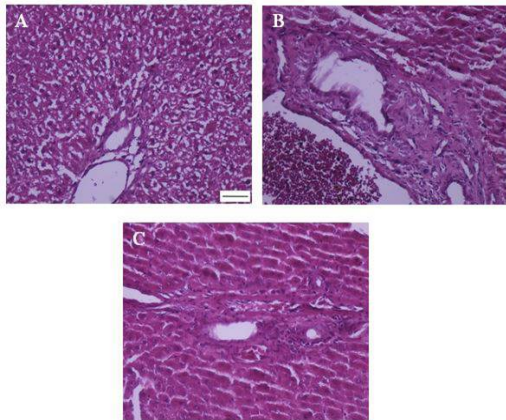
$P < 0.05$ † در مقایسه با گروه سیس پلاتین

هم‌چنین، سیس پلاتین باعث افزایش اینفیلتراسیون لکوسیت‌ها، فیروز سلولی، اتساع سینوزویدی و احتقان عروقی در بافت کبد شد. به طوری که درجه هیستوپاتولوژیک کل در این گروه به طور معنی‌دار بیش‌تر از میزان آن در گروه شاهد بود ($P < 0/01$). گواژ p-کوماریک اسید منجر به بهبود نسبی تمام این آسیب‌ها در بافت کبد شد و درجه آسیب هیستوپاتولوژیک کل در این گروه به طور معنی‌دار ($P < 0/05$) نسبت به مقدار آن در گروه سیس پلاتین کاهش یافت (جدول شماره ۳ و تصویر شماره ۲).

جدول شماره ۳: تاثیر گواژ p-کوماریک اسید بر آسیب‌های بافتی کبدی القا شده توسط سیس پلاتین

آسیب بافتی	گروه‌های آزمایشی	
	سیس پلاتین	سیس پلاتین + کوماریک اسید
افزایش اندازه فضای بومن	۲/۸	۰/۳
نکروز سلول‌های توبولی	۱/۵	۰
احتقان عروقی	۲/۴	۱/۱
کست‌های پروتئینی داخل توبولی	۱/۹	۰
ادم دور عروقی	۰/۷	۰/۴
اینفیلتراسیون لکوسیت‌ها	۱/۶	۰/۷
درجه کل آسیب بافتی	۱۰/۹ **	۲/۵ * †

درجات آسیب‌های بافتی کلیوی در گروه دریافت‌کننده نرمال سالیس، سیس پلاتین و یا سیس پلاتین بعلاوه p-کوماریک اسید ($P < 0/05$)، سیس پلاتین و یا سیس پلاتین بعلاوه p-کوماریک اسید ($P < 0/01$) در مقایسه با گروه شاهد ($P < 0/05$) در مقایسه با گروه سیس پلاتین



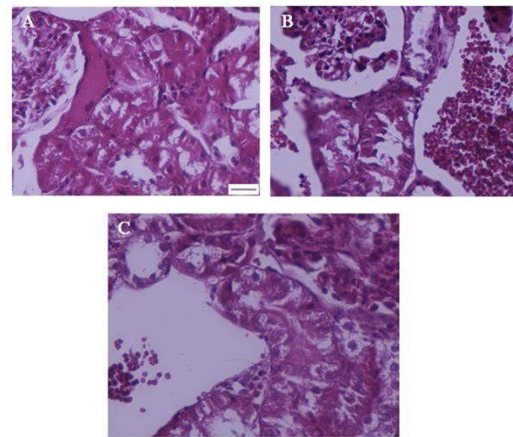
تصویر شماره ۲: تصاویر میکروسکپ نوری برای نشان دادن آسیب‌های بافتی کبد در گروه دریافت‌کننده نرمال سالیس (A)، سیس پلاتین (B) و یا سیس پلاتین بعلاوه p-کوماریک اسید (C). رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، بزرگنمایی ۲۰۰ و مقیاس (Scale) برابر ۱۰۰ میکرومتر

سیس پلاتین برابر ۱۰/۹ گردید که به طور معنی‌دار بیش‌تر از گروه شاهد بود ($P < 0/05$). مصرف همزمان p-کوماریک اسید و سیس پلاتین منجر به بهبود نسبی تمام این آسیب‌ها شد، به طوری که درجه هیستوپاتولوژیک کل در گروه دریافت‌کننده p-کوماریک اسید بعلاوه سیس پلاتین برابر ۲/۵ بود که تفاوت معنی‌دار با مقدار آن در گروه سیس پلاتین دارد ($P < 0/05$).

جدول شماره ۲: تاثیر گواژ p-کوماریک اسید بر آسیب‌های بافتی کلیوی القا شده توسط سیس پلاتین

آسیب بافتی	گروه‌های آزمایشی	
	سیس پلاتین	سیس پلاتین + کوماریک اسید
افزایش اندازه فضای بومن	۲/۸	۰/۳
نکروز سلول‌های توبولی	۱/۵	۰
احتقان عروقی	۲/۴	۱/۱
کست‌های پروتئینی داخل توبولی	۱/۹	۰
ادم دور عروقی	۰/۷	۰/۴
اینفیلتراسیون لکوسیت‌ها	۱/۶	۰/۷
درجه کل آسیب بافتی	۱۰/۹ **	۲/۵ * †

درجات آسیب‌های بافتی کلیوی در گروه دریافت‌کننده نرمال سالیس، سیس پلاتین و یا سیس پلاتین بعلاوه p-کوماریک اسید ($P < 0/05$)، سیس پلاتین و یا سیس پلاتین بعلاوه p-کوماریک اسید ($P < 0/01$) در مقایسه با گروه شاهد ($P < 0/05$) در مقایسه با گروه سیس پلاتین



تصویر شماره ۱: تصاویر میکروسکپ نوری برای نشان دادن آسیب‌های بافتی کلیه در گروه دریافت‌کننده نرمال سالیس (A)، سیس پلاتین (B) و یا سیس پلاتین بعلاوه p-کوماریک اسید (C). رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، بزرگنمایی ۴۰۰ و مقیاس (Scale) برابر ۲۰۰ میکرومتر

بحث

می‌گردد (۳۱). یکی از این راه‌ها ایجاد استرس اکسیداتیو است که توسط گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن ایجاد می‌شود. سیس پلاتین باعث آسیب میتوکندری، توقف انتقال الکترون در زنجیره تنفسی و در نتیجه نشت الکترون‌های زنجیره انتقال الکترونی می‌گردد. این الکترون‌های آزاد به داخل اکسیژن یا نیتروژن نفوذ کرده و گونه‌های فعال اکسیژن یا نیتروژن را تشکیل می‌دهند (۳۲). به علاوه، سیس پلاتین از راه‌های دیگر از جمله واکنش با گلوپروتئین و غیر فعال کردن آن و همچنین فعال‌سازی مسیر میکروزومی از طریق سیتوکروم P450 منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شود (۳۳). گلوپروتئین یک آنتی‌اکسیدان شناخته شده در سلول است که کاهش آن می‌تواند سبب افزایش استرس اکسیداتیو شود. بنابراین سیس پلاتین از طریق افزایش تولید گونه‌های فعال و تضعیف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی منجر به القای استرس اکسیداتیو می‌گردد که در مطالعه حاضر نیز به صورت افزایش پروکسیداسیون لیپیدها (افزایش MDA) و کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی (FRAP) خود را نشان داده است. به کارگیری p-کوماریک اسید سبب کاهش MDA و افزایش FRAP بافت کلیه و کبد در گروه‌های دریافت‌کننده همزمان سیس پلاتین و p-کوماریک اسید در مقایسه با گروه دریافت‌کننده p-کوماریک اسید به تنهایی شد، که بیانگر خاصیت آنتی‌اکسیداتیو آن است. بررسی ساختار شیمیایی p-کوماریک اسید نشان داده که گروه فنیل هیدروکسیل موجود در آن مسئول خاصیت آنتی‌اکسیداتیو آن بوده و همچنین دارای خاصیت اسکاونجری برای رادیکال‌های آزاد خصوصاً رادیکال‌های هیدروکسیل است (۳۴، ۱۹). به علاوه، مطالعات تجربی نیز نشان داده اند p-کوماریک اسید دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است و سبب محافظت قلب در برابر استرس اکسیداتیو القا شده توسط دوکسورویسین (۲۳) و کاهش استرس اکسیداتیو متعاقب ایسکمی/خون‌رسانی مجدد مغزی می‌شود (۳۵). همچنین، نتایج این مطالعه همسو با پژوهش انجام شده

سیس پلاتین یک داروی شیمی درمانی موثر برای بسیاری از تومورها است. اما دارای اثرات جانبی قابل ملاحظه‌ای بر اندام‌های مختلف از جمله کبد و کلیه است که هنوز رویکرد محافظتی موثری برای این آسیب‌ها در طول شیمی درمانی شناخته نشده است (۴، ۱). اخیراً استفاده از مکمل‌های گیاهی به‌طور وسیعی برای محافظت در برابر برخی بیماری‌ها رواج پیدا کرده که به خاطر عوارض جانبی کم‌تر آن‌ها می‌باشد. لذا هدف مطالعه حاضر بررسی تاثیر پیش درمانی با p-کوماریک اسید بر آسیب‌های کلیوی و کبدی القا شده توسط سیس پلاتین در رت بود. نتایج این مطالعه نشان داد سیس پلاتین سبب افزایش غلظت کراتینین، اوره-نیتروژن، AST، ALT، و ALP پلاسما، افزایش سطح MDA و کاهش FRAP در بافت کلیه و کبد و همچنین افزایش آسیب‌های سلولی در بافت کلیه و کبد می‌گردد. گاوژ p-کوماریک اسید با دوز ۱۰۰ mg/kg توانست تمام این آسیب‌ها را به‌طور نسبی یا کامل بهبود دهد.

نتایج مطالعه ما نشان داد سیس پلاتین سبب افزایش استرس اکسیداتیو در بافت کلیه و کبد می‌شود. مکانیسم ایجاد آسیب کلیوی توسط سیس پلاتین بطور کامل شناخته نشده است، اما اخیراً پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در این زمینه حاصل شده است. سیس پلاتین توسط مویرگ‌های دور توبولی به غشاء بازولترال سلول‌های اپی‌تلیال کلیه می‌رسد و توسط ناقل کاتیون آلی-۲ (OCT2) و همچنین ناقل‌های آنیون آلی ۱ و ۳ (OAT1 و OAT3) وارد آن‌ها می‌گردد (۳۰). آن‌گاه ناقل‌های موجود در غشاء اپیکال سیس پلاتین را به داخل توبول انتقال می‌دهند تا از طریق ادرار دفع گردد. در صورتی که برداشت توسط غشاء بازولترال افزایش یابد و یا انتقال آن از غشاء اپیکال دچار مشکل شود، سیس پلاتین در داخل سلول تجمع پیدا می‌کند و از راه‌های مختلف سبب ایجاد و توسعه نفروتوکسیسیته

توسط Akdemir و همکاران است که نشان دادند p-کوماریک اسید سبب کاهش استرس اکسیداتیو در بافت کلیه و کبد متعاقب مصرف سیس پلاتین می گردد (۱۴).

در این مطالعه ما دریافتیم که سیس پلاتین سبب افزایش چشمگیر نکروز سلولی و آسیب‌های پاتولوژیک در کلیه و کبد می شود و گاوژ p-کوماریک اسید توانست منجر به بهبودی نسبی یا کامل آیین آسیب‌ها گردد. نشان داده شده که سیس پلاتین از طریق آسیب DNA و فعالسازی p53 و همچنین تولید گونه های فعال اکسیژن منجر به شروع آپوپتوز می شود (۳۳،۳۲). از طرف دیگر پس از ورود سیس پلاتین به سلول، واکنش با محیط سلولی سبب می شود به یک الکتروفیل با شارژ مثبت تبدیل گردد که تمایل بالایی برای DNA دارد (۳۶). اتصال سیس پلاتین به DNA سبب تشکیل پیوندهای متقابل در DNA و متوقف شدن سنتز و رونویسی می شود که خود منجر به توقف سیکل سلولی می گردد (۳۳). به علاوه، اخیراً مشخص شده که تحت شرایط فیزیولوژیک میتوکندری طبیعت دینامیک داشته و پیوسته تحت شکافت و همجوشی قرار دارد که تعادل دینامیک بین این دو پدیده برای زنده ماندن و عملکرد میتوکندری حیاتی است. با وجود این، سیس پلاتین با قطع این دینامیک میتوکندری منجر به تخریب آن، نشت از غشاء سلول تخریب شده و مرگ سلولی می گردد (۳۸،۳۷). پیشنهاد شده که احتمالاً مسیرهای سیگنالینگ آپوپتوز و نکروز در مسمومیت با سیس پلاتین مشترک باشند، زیرا عوامل محافظت کننده کلیه سبب مهار آپوپتوز و نکروز هردو در کلیه متعاقب دریافت سیس پلاتین می شوند (۳۹). بنابراین ممکن است p-کوماریک اسید به واسطه خاصیت آنتی اکسیداتیو خود و یا از مسیرهای ناشناخته دیگری سبب کاهش آسیب‌های بافتی در کلیه و کبد شده باشد که روشن شدن مکانیسم دقیق آن نیازمند تحقیقات بیش تر است.

در مطالعه حاضر سیس پلاتین سبب افزایش میزان اینفیلتراسیون لکوسیت ها به فضای بینابینی شد که

می تواند ناشی از القای التهاب باشد و به کارگیری p-کوماریک اسید منجر به کاهش قابل ملاحظه آن گردید. نشان داده شده که سیس پلاتین سبب القای التهاب نیز می شود. آسیب داخل سلولی ایجاد شده توسط سیس پلاتین منجر به آزاد شدن "ملکول‌های الگوی ملکولی همراه آسیب" (DAMPs) می شود که در زمان آسیب بافتی تولید می گردند. این ملکول‌ها از طریق اثر بر TLRs باعث فعال سازی سیستم ایمنی و آزاد شدن سیتوکاین ها (مثل TNF- α) و کموکاین‌ها و جذب سلول‌های التهابی می شوند (۴۱،۴۰) و استفاده از اینترلوکین-۱۰ به عنوان یک سایتوکاین ضد التهاب یا مهار TNF- α سبب محافظت از کلیه در برابر سیس پلاتین می گردد (۲۷،۹). نشان داده شده که p-کوماریک اسید سبب کاهش فاکتورهای پیش التهابی (از جمله TNF- α) و همچنین آنزیم‌های التهابی (iNOS و COX-2) می گردد (۲۵) و دارای خاصیت ضد التهابی در مدل‌های مختلف التهاب است (۲۲،۲۱،۱۸).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد سیس پلاتین سبب افزایش غلظت کراتینین و اوره- نیتروژن پلاسما می شود که این امر بیانگر کاهش میزان فیلتراسیون گلومرولی (GFR) است و همسو با نتایج مطالعات قبلی می باشد (۱۳). نشان داده شده که سیس پلاتین از طریق القای التهاب، استرس اکسیداتیو، آسیب و مرگ سلول‌های توبولی، آسیب عروقی و کاهش تولید NO از اندوتلیوم، انقباض شریانچه آوران کلیه و همچنین کاهش ضریب فیلتراسیون گلومرولی منجر به کاهش GFR و در نتیجه افزایش غلظت مواد زائد نیتروژنی در خون می شود (۴۳،۴۲،۱). به کارگیری p-کوماریک اسید مانع افزایش غلظت کراتینین و اوره- نیتروژن پلاسما متعاقب سیس پلاتین گردید. همان گونه که ذکر شد p-کوماریک اسید دارای خواص ضد التهابی، ضد استرس اکسیداتیو و محافظت کنندگی سلولی است و ممکن است از این راه ها منجر به بهبود میزان GFR و در نتیجه کاهش غلظت کراتینین و اوره- نیتروژن

محدوديت اين مطالعه اين بود كه جهت بررسي التهاب نتوانستيم فاكترهاي پيش التهابي را اندازه گيري نماييم و تنها اينفيلتراسيون لكوسيت ها به عنوان شاخص التهاب در نظر گرفته شد.

در كل مي توان اين گونه نتيجه گيري كرد كه سيس پلاتين مي تواند سبب القاي استرس اكسيداتيوي، التهاب، آسيب هاي سلولي و در نتيجه اختلال در عملكرد كليه و كبد شود و گاواژ p-كوماريك اسيد از طرق خواص ضد التهابي، ضد استرس اكسيداتيوي و مهار كنندگي iNOS مي تواند مانع اين آسيب ها گردد.

سپاسگزارى

اين مقاله حاصل بخشي از نتايج طرح تحقيقاتي شماره ۹۷۲۷۹ مصوب معاونت تحقيقات و فناوري دانشگاه علوم پزشكي كرمانشاه مي باشد كه بدین وسيله از همكاري ايشان كمال تشكر و قدرداني به عمل مي آيد.

References

1. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int* 2008; 73(9): 994-1007.
2. Singh G. A possible cellular mechanism of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicology* 1989; 58(1): 71-80.
3. Rybak LP, Mukherjea D, Jajoo S, Ramkumar V. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. *Tohoku J Exp Med* 2009; 219: 177-186.
4. Liao Y, Lu X, Lu C, Li G, Jin Y, Tang H. Selection of agents for prevention of cisplatin-induced hepatotoxicity. *Pharmacol Res* 2008; 57(2): 125-131.
5. Karta A, Cigremis Y, Karaman M, Ozen H. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ameliorates cisplatin-induced hepatotoxicity in rabbit. *Exp Toxicol Pathol* 2010; 62(1): 45-52.
6. Kanat O, Ertas H, Caner B. Platinum-induced neurotoxicity: A review of possible mechanisms. *World J Clin Oncol* 2017; 8(4): 329-335.
7. Lee SH, Kim BK, Nam Y, Sohn UD, Park ES, Hong SA, et al. Protective role of phosphatidylcholin against cisplatin-induced renal toxicity and oxidative stress in rats. *Food Chem Toxicol* 2013; 58: 388-393.
8. Petrovic M, Todorovic D. Biochemical and molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer cells. *Medicine and Biology* 2016; 18(1): 12-18.

9. Deng J, Kohda Y, Chiao H, Wang Y, Hu X, Hewitt S, et al. Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury. *Kidney Int* 2001; 60(6): 2118-2128.
10. Abouzeinab NS. Antioxidant effect of silymarine on cisplatin-induced renal oxidative stress in rats. *J Pharmacol Toxicol* 2015; 10(1): 1-19.
11. Atessahin A, Ceribasi AO, Yuce A, Bulmus O, Cikim G. Role of ellagic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007; 100(2): 121-126.
12. Niu C, Ma M, Han X, Wang Z, Li H. Hyperin protects against cisplatin-induced liver injury in mice. *Acta Cir Bras* 2017; 32(1): 633-640.
13. Mohamadi yarijani Z, Godini A, Madani SH, Najafi H. Reduction of cisplatin-induced renal and hepatic side effects in rat through antioxidative and anti-inflammatory properties of *Malva sylvestris* L. extract. *Biomed Pharmacother* 2018; 106: 1767-1774.
14. Ekinci Akdemir FN, Albayrak M, Çalik M, Bayir Y, Gülçin I. The protective effects of p-coumaric acid on acute liver and kidney damages induced by cisplatin. *Biomedicines* 2017; 5(2): E18.
15. Moneim AA, El-Twab SMA, Ashour MB, Yousef AI. Hepato-renal protective effects of gallic acid and p-coumaric acid nicotinamide/streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Bioassays* 2016; 5(6): 4641-4649.
16. Kong CS, Jeong CH, Choi JS, Kim KJ, Jeong JW. Antiangiogenic effects of p-coumaric acid in human endothelial cells. *Phytother Res* 2013; 27(3): 317-323.
17. King A, Young G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J Am Diet Assoc* 1999; 99(2): 213-218.
18. Luceri C, Giannini L, Lodovici M, Antonucci E, Abbate R, Masini E, et al. p-coumaric acid, a common dietary phenol, inhibits platelet activity in vitro and in vivo. *Br J Nutr* 2007; 97(3): 458-463.
19. Zang LY, Cosma G, Gardner H, Shi X, Castranova V, Vallyathan V. Effect of antioxidant protection by p-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279(4): 954-960.
20. Luceri C, Guglielmi F, Lodovici M, Giannini L, Messerini L, Dolara P. Plant phenolic 4-coumaric acid protects against intestinal inflammation in rats. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39(11): 1128-1133.
21. Pragasam SJ, Murunikkara V, Sabina EP, Rasool M. Ameliorative effect of p-coumaric acid, a common dietary phenol, on adjuvant-induced arthritis in rats. *Rheumatol Int* 2013; 33(2): 325-334.
22. Zhao Y, Liu Y, Liu Ch, Zeng X, Li X, Zhao J. Anti-Inflammatory Effects of p-coumaric acid in LPS-stimulated RAW264.7 Cells: Involvement of NF-κB and MAPKs pathways. *Med Chem* 2016; 6(5): 327-330.
23. Abdel wahab MH, Elmahdy MA, Abdellah MF, Helal GK, Khalifa F, Hamada FM. Influence of p-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. *Pharmacol Res* 2003; 48: 461-465.
24. Navaneethan D, Rasool MK. An experimental study to investigate the impact of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol, on cadmium chloride-induced renal toxicity. *Food Funct* 2014; 5(10): 2438-2445.
25. Neog MK, Joshua Pragasam S, Krishnan M, Rasool M. p-coumaric acid, a dietary polyphenol ameliorates inflammation and curtails cartilage and bone erosion in the

- rheumatoid arthritis rat model. *Biofactors* 2017; 43(5): 698-717.
26. Kheiripour N, Amidi N, Moradkhani SH, Sedaghat M, Khiripour N, Larki A, et al. Effect of green tea on inflammation and oxidative stress in cisplatin- induced experimental liver function. *J HerbMed Pharmacol* 2016; 5(3): 99-102.
 27. Ramesh G, Reeves WB. Salicylate reduces cisplatin nephrotoxicity by inhibition of tumor necrosis factor-alpha. *Kidney Int* 2004; 65(2): 490-499.
 28. Changizi-Ashtiyani S, Alizadeh M, Najafi H, Babaei S, Khazaei M, Jafari M, et al. *Physalis alkekengi* and *Alhagi maurorum* ameliorate the side effect of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Cancer Gene Ther* 2016; 23(7): 235-240.
 29. Najafi H, Mohamadi Yarijani Z, Changizi-Ashtiyani S, Mansouri K, Modarresi M, Madani SH, et al. Protective effect of *Malva sylvestris* L. extract in ischemia-reperfusion induced acute kidney and remote liver injury. *Plos One* 2017; 12(11): e0188270.
 30. Hu S, Leblanc AF, Gibson AA, Hong KW, Kim JY, Janke LJ, et al. Identification of OAT1/OAT3 as contributors to cisplatin toxicity. *Clin Transl Sci* 2017; 10(5): 412-420.
 31. Perazella MA. Drug-induced acute kidney injury: diverse mechanisms of tubular injury. *Curr Opin Crit Care* 2019; 25(6): 550-557.
 32. Yang Y, Liu H, Liu F, Dong Z. Mitochondrial dysregulation and protection in cisplatin nephrotoxicity. *Arch Toxicol* 2014; 88(6): 1249-1256.
 33. Manohar S, Leung N. Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. *J Nephrol* 2018; 31(1): 15-25.
 34. Pei K, Ou J, Huang J, Ou S. P-coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *J Sci Food Agric* 2016; 96(9): 2952-2962.
 35. Guven M, Aras AB, Akman T, Sen HM, Ozkan A, Salis O, et al. Neuroprotective effect of p-coumaric acid in rat model of embolic cerebral ischemia. *Iran J Basic Med Sci* 2015; 18(4): 356-363.
 36. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4(4): 307-320.
 37. Chan DC. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet* 2012; 46: 265-287.
 38. Youle RJ, Vander Blik AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 2012; 337(6098):1062-1065.
 39. Faubel S, Ljubanovic D, Reznikov L, Somerset H, Dinarello CA, Edelstein CL. Caspase-1 deficient mice are protected against cisplatin-induced apoptosis and acute tubular necrosis. *Kidney Int* 2004; 66(6): 2202-2213.
 40. Gluba A, Banach M, Hannam S, Mikhailidis DP, Sakowicz A, Rysz J. The role of Toll-like receptors in renal diseases. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6(4): 224-235
 41. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(4): 279-289.
 42. Sugiyama S, Hayakawa M, Kato T, Hanaki Y, Shimizu K, Ozawa T. Adverse effects of anti-tumor drug, cisplatin, on rat kidney mitochondria: disturbances in glutathione peroxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159(3): 1121-1127.
 43. Daugaard G, Abildgaard U. Cisplatin nephrotoxicity. A review. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; 25(1): 1-9.

44. Gaona-Gaona L, Molina-Jijon E, Tapia E, Zazueta C, Hernandez-Pando R, Calderon-Oliver M, et al. Protective effect of sulforaphane pretreatment against cisplatin-induced liver and mitochondrial oxidant damage in rats. *Toxicology* 2011; 286(1-3): 20-27.