

بررسی اثر فراکسیون‌های اتیل‌استات عصاره ۵۰٪ الکی آبی سیاه دانه بر پیش‌گیری از سنگ‌گزالات کلسیم کلیه در رت نژاد Wistar

ابولفضل خواجوی‌راد^{۱*} (Ph.D.)، موسی‌الرضا حاج‌زاده^۱ (Ph.D.)، ناهید منور^۲ (M.Sc.)، حسین آیت‌اللهی^۳ (M.D.)

۱ - دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

۲ - کارشناس ارشد زیست‌شناسی

۳ - دانشگاه علوم پزشکی مشهد، بیمارستان قائم، آزمایشگاه عمومی بیمارستان

چکیده

سابقه و هدف: گیاه سیاه دانه (*Nigella Sativa L.*) دارای اثرات فارماکولوژیک فراوانی است که از جمله می‌توان به اثرات ضد التهابی، ضد میکروبی، ضد سنگ ادراری، کاهش دهنده چربی خون و تقویت‌کننده ترمیم بافتی پس از ایجاد سمیت کلیوی اشاره کرد. در این پژوهش اثر فراکسیون‌های اتیل‌استات عصاره ۵۰٪ الکی آبی سیاه دانه بر پیش‌گیری از سنگ‌گزالات کلسیم کلیه در رت نژاد Wistar بررسی شد.

مواد و روش‌ها: برای انجام این پژوهش از ۳۱ سر رت نژاد Wistar استفاده شد. رت‌ها بطور تصادفی در ۴ گروه تقسیم و به مدت ۲۸ روز تیمار شدند. رت‌های گروه اول (کنترل سالم) و دوم (کنترل منفی) به ترتیب آب معمولی و آب حاوی ۱٪ اتیلن گلیکول دریافت کردند. رت‌های گروه سوم و چهارم علاوه بر ۱٪ اتیلن گلیکول روزانه ۲۵۰ mg/kg عصاره آبی الکی دانه سیاه دانه از فراکسیون باقی‌مانده اتیل‌استات و ۲۵۰ mg/kg عصاره آبی الکی دانه سیاه دانه از فاز اتیل‌استات در آب آشامیدنی دریافت نمودند. میزان گزالات، سیترات و کلسیم ادرار تمام رت‌ها در روزهای صفر، ۱۴ و ۲۸ و میزان منیزیم و کلسیم خون رت‌ها در روزهای صفر و ۲۸ با روش‌های بیوشیمیایی اندازه‌گیری شد. سپس با استفاده از روش‌های هیستوپاتولوژیک مقاطع ۵ میکرونی از هر دو کلیه رت‌ها تهیه و با میکروسکوپ نوری مطالعه گردید. تعداد تجمعات بلورهای گزالات کلسیم در ۱۰ میدان میکروسکوپی (تعداد لوله‌های حاوی تجمعات) شمارش گردید. نتایج بصورت Mean±SEM محاسبه و با استفاده از تست ANOVA و سپس Tukey-Kramer مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تفاوت‌های با $p < 0/05$ معنی‌دار تلقی شدند.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تجمع بلورهای گزالات کلسیم در گروه دوم بطور معنی‌داری ($p < 0/001$) بیش‌تر از گروه اول بود. علاوه بر این تجمع بلورهای گزالات کلسیم در گروه دوم بطور معنی‌داری ($p < 0/001$) بیش از گروه سوم (بدون تجمع بلور) بود اما اختلاف معنی‌داری با گروه چهارم نداشت. علاوه بر این غلظت گزالات ادرار گروه‌های دوم، سوم و چهارم در روز ۲۸ نسبت به روز صفر بطور معنی‌داری ($p < 0/05$) افزایش یافت اما غلظت کلسیم ادرار گروه‌های سوم و چهارم طی این بازه زمانی تغییر معنی‌داری نکرد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که فراکسیون باقی‌مانده از فاز اتیل‌استات عصاره ۵۰٪ الکی آبی سیاه دانه در پیش‌گیری از تجمع بلورهای گزالات کلسیم موثر است در حالی که فراکسیون اتیل‌استات عصاره فاقد چنین اثری است. اگرچه مکانیسم این اثر کاملاً مشخص نیست اما شاید بتوان آنرا مربوط به اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و کاهش دهنده چربی خون سیاه دانه دانست و لذا می‌توان مصرف آنرا برای موارد انسانی نیز توصیه کرد.

کلیدواژه: سیاه دانه، سنگ کلیه، اتیلن گلیکول، گزالات کلسیم، فراکسیون اتیل‌استات سیاه دانه.

مقدمه

سیاه دانه (*Nigella Sativa L.*)، متعلق به خانواده

Rununculaceae، در برخی نواحی آسیا می‌روید و در ایران

نیز به فراوانی در اصفهان، اراک و خراسان پرورش می‌یابد

رسوب بلورهای اگزالات کلسیم منجر می‌شود [۸]. منیزیم عنصری است که کمبود آن در رژیم غذایی با افزایش تشکیل بلورهای اگزالات کلسیم و دفع آن‌ها از ادرار همراه است [۲۰]. سیترات نیز مهم‌ترین ترکیبی است که با کلسیم ادرار ترکیب و غلظت کلسیم یونیزه ادرار را کاهش می‌دهد از این رو کمبود سیترات به تشکیل سنگ ادرار منجر می‌شود [۱۰] و [۸]. از آنجا که در بیماران مبتلا به سنگ ادرار علاوه بر تغییر سطح سرمی منیزیم و کلسیم، میزان اگزالات، سیترات و کلسیم ادرار نیز تغییر می‌کند [۲، ۱۰] بنابراین فاکتورهای مذکور در گروه‌های آزمایشی اندازه‌گیری و با یکدیگر مقایسه شدند. اگرچه در پژوهشی اثر پیش‌گیری کننده عصاره الکلی سیاه دانه بر سنگ اگزالات کلسیم به اثبات رسیده است [۷] اما تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر بررسی اثر فراکسیون‌های گوناگون عصاره الکلی سیاه دانه بر درمان یا پیش‌گیری از سنگ کلیه انجام نشده است. لذا در این پژوهش اثر فراکسیون‌های اتیل‌استات و فاز باقی مانده از فراکسیون اتیل‌استات عصاره ۵۰٪ الکلی آبی سیاه دانه بر پیش‌گیری از سنگ اگزالات کلسیم کلیه در رت مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

عصاره گیری: دانه گیاه سیاه دانه (*Nigella Sativa L.*) کشت شده در منطقه گناباد استان خراسان رضوی پس از خریداری توسط کارشناس هرباریوم دانشگاه فردوسی مشهد شناسایی شد. پس از تمیز کردن دانه پودر مورد نیاز برای هر نوبت عصاره‌گیری در همان روز تهیه شد. برای تهیه عصاره از روش خیساندن استفاده شد [۲۱، ۲۲] بدین ترتیب که مقدار ۵۰۰ گرم پودر در محلول ۵۰٪ الکل و ۵۰٪ آب مقطر به مدت ۷۲ ساعت خیسانده شد. در طول این مدت درب ظرف حاوی خیسانده با پارافیلیم بخوبی پوشانده شد و در انکوباتور با دمای 40°C نگهداری گردید. مخلوط هر ۶ ساعت یک‌بار توسط میله شیشه‌ای هم زده شد. پس از گذشت مدت زمان مذکور مخلوط از کاغذ صافی عبور داده شد و با حرارت

[۲ و ۱]. سیاه دانه علاوه بر مقادیر فراوان اسیدهای چرب غیر اشباع (اسید لینولئیک و اولئیک) حاوی انواع کربوهیدرات‌ها (گلوکز و رامنوز)، ویتامین‌های E و C و عناصر معدنی (کلسیم، آهن و پتاسیم) است [۳ و ۴] سیاه دانه دارای خواص فارماکولوژیک متعددی است که از این میان می‌توان به اثرات ضد التهابی، ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد توموری، ضد دیابتی و تقویت کننده سیستم ایمنی اشاره کرد [۴]. همچنین نشان داده شده است که تجویز خوراکی عصاره سیاه دانه دارای اثرات حفاظتی بر روی کلیه بوده و سمیت کلیوی ناشی از داروهایی مانند سیس‌پلاتین را کاهش می‌دهد [۵ و ۶]. علاوه بر این اثر پیش‌گیری از تشکیل سنگ اگزالات کلسیم در کلیه رت برای عصاره الکلی سیاه دانه گزارش شده است [۷].

سنگ‌های ادراری پس از عفونت‌های ادراری و اختلالات پاتولوژیک پروستات، سومین بیماری شایع دستگاه ادراری محسوب می‌شوند [۸] که شیوع آن در کشورهای صنعتی به دلیل تغییر رژیم غذایی و شیوه زندگی در حال افزایش است [۹]. اگرچه اتیولوژی این بیماری کاملاً مشخص نیست اما عوامل داخلی و خارجی مختلفی در بروز این بیماری دخیل هستند. از جمله عوامل داخلی می‌توان به سابقه ژنتیکی [۱۰] سن و جنس [۱۱ و ۱۲] و بیماری‌هایی همچون گاستروآنتریت مزمن و هیپرپاراتیروئیدی [۱۳] اشاره کرد. شرایط آب و هوایی محل زندگی [۱۰]، مقدار آب مصرفی و املاح موجود در آن [۱۳]، رژیم غذایی [۱۴، ۱۵]، استرس [۱۶] و انواع داروها [۱۷ و ۱۸] از جمله عوامل خارجی موثر در ایجاد سنگ‌های ادراری به شمار می‌روند.

بیش از ۸۰٪ انواع سنگ‌های ادراری از نوع کلسیمی هستند که بدلیل تشکیل بلورهای اگزالات و فسفات کلسیم ایجاد می‌شوند [۹]. تشکیل این بلورها ناشی از افزایش کلسیم و اسید اوریک ادرار و یا کاهش pH آن است [۱۹] و [۱۰]. علاوه بر این دفع زیاد اگزالات در ادرار، که می‌تواند ناشی از مصرف مقادیر فراوان اتیلن گلیکول باشد، نیز به

آن به لوله حاوی ۲۵ µl اسید کلریدریک ۱ نرمال منتقل و در آن با پارافیلیم بخوبی مسدود شد. بررسی بیوشیمیایی ادرار در آزمایشگاه مرکزی بیمارستان قائم (عج) مشهد انجام گرفت. جهت اندازه‌گیری اگزالات و سیترات ادرار از کیت‌های آنزیمی و جهت اندازه‌گیری کلسیم آن از روش کالریمتریکی گزیلیدیل‌بلو استفاده شد.

تهیه و بررسی نمونه‌های سرم: نمونه خون رت‌های هر گروه در روز صفر از سینوس غاری چشم و در روز ۲۹ مستقیماً از قلب تهیه شد. نمونه‌های خون پس از لخته شدن سانتریفیوژ گردیدند و سرم حاصل از این مرحله جمع‌آوری شد و بررسی‌های بیوشیمیایی آن در آزمایشگاه مرکزی بیمارستان قائم (عج) مشهد انجام گرفت. جهت اندازه‌گیری کلسیم و منیزیم سرم بترتیب از روش‌های کالریمتریکی گزیلیدیل‌بلو و متیل‌تیمول‌بلو استفاده شد.

تهیه و بررسی پاتولوژیک بافت کلیه: پس از تیمار رت‌ها، در روز ۲۹ هر یک از رت‌ها با اتر بی‌هوش شد و کلیه‌ها با کنار زدن احشاء داخل شکم برداشته شدند. هر جفت کلیه در ظرف حاوی فرمالین ۱۰٪ فیکس شد و بررسی‌های پاتولوژیک آن‌ها در بخش آسیب‌شناسی بیمارستان قائم (عج) مشهد انجام گرفت. پس از تهیه برش‌های بافتی، نمونه‌ها جهت آب‌گیری، الکل‌گیری و قرارگیری در پارافین به دستگاه پردازش خودکار بافت منتقل شدند. سپس برش‌های با ضخامت ۵ میکرون تهیه و به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو $C^{\circ} 180$ قرار گرفتند. در مرحله آخر برش‌ها بر روی لام منتقل شده و با استفاده از همتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. پس از مشاهده لام‌های تهیه شده در زیر میکروسکوپ بلورهای اگزالات کلسیم، که بصورت تجمعات بلوری زرد تا قهوه‌ای رنگ درون لوله‌های ادراری کلیه تجمع یافته بود، در ده میدان میکروسکوپی شمارش گردیدند.

محاسبات آماری: نتایج بصورت $Mean \pm SEM$ محاسبه و با کمک نرم افزار SPSS داده‌های حاصل از اندازه‌گیری میزان اگزالات، سیترات و کلسیم ادرار و منیزیم و کلسیم سرم و تعداد تجمعات بلورهای اگزالات کلسیم در ده میدان

ملایم حلال آن حذف گردید. با وزن کردن عصاره غلیظ شده بازده آن ۳۳٪ به دست آمد.

تهیه فراکسیون اتیل استات: ۱۰ گرم از عصاره ۵۰٪ الکی آبی سیاه دانه به دفعات مکرر در دکانتور با ۵۰ ml اتیل استات استخراج شد تا اجزای بینابینی آن همچون فسفولیپیدها و کربوهیدرات‌ها در این فاز جدا شوند. سپس محلول حاصل حذف حلال شد و تغلیظ گردید.

تهیه فراکسیون باقی مانده از فاز اتیل استات: برای تهیه فراکسیون باقی مانده از فاز اتیل استات، فاز باقی مانده از کیف دکانتور در مرحله تهیه فراکسیون اتیل استات که شامل اجزای قطبی و غیر قطبی مانند تانن، ساپونین، فلاونوئید، ویتامین C و E، تیموکینون، و کاروتن می‌باشد تغلیظ شد.

نگهداری و تیمار حیوانات آزمایشگاهی: برای انجام این پژوهش ۳۱ سر رت نر نژاد Wistar با وزن ۱۶۰-۲۵۰ گرم از موسسه سرم سازی رازی مشهد تهیه شد. رت‌ها تحت شرایط استاندارد با دمای 25 ± 2 و سیکل روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند و غذای آن‌ها از شرکت جوانه خراسان تهیه شد. ۷۲ ساعت قبل از شروع آزمایش رت‌ها توزین شده و بطور تصادفی به ۴ گروه (یک گروه هفت‌تایی و سه گروه هشت‌تایی) تقسیم شدند و به مدت ۲۸ روز تیمار گردیدند. رت‌های گروه اول (کنترل، $n=7$) با آب و غذای معمولی تغذیه شدند. رت‌های گروه دوم (کنترل منفی) همراه آب آشامیدنی ۱٪ اتیلن‌گلیکول دریافت کردند. رت‌های گروه سوم علاوه بر ۱٪ اتیلن‌گلیکول معادل ۲۵۰ mg/kg عصاره آبی الکی سیاه دانه از فراکسیون باقی مانده اتیل استات در آب آشامیدنی دریافت نمودند. رت‌های گروه چهارم نیز علاوه بر ۱٪ اتیلن‌گلیکول معادل ۲۵۰ mg/kg عصاره آبی الکی دانه سیاه دانه از فاز اتیل استات در آب آشامیدنی دریافت نمودند.

جمع‌آوری و بررسی ادرار: برای جمع‌آوری ادرار ۲۴ ساعته، رت‌ها در روزهای صفر، ۱۴ و ۲۸ بطور انفرادی در قفس متابولیک قرار گرفتند. در پایان ۲۴ ساعت حجم ادرار جمع‌آوری شده از هر رت اندازه‌گیری شد و مقدار ۱۰ ml از

میکروسکوپی در برش‌های بافتی کلیه با استفاده از تست‌های one way ANOVA و Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. اختلافات در سطح $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

جدول ۲. میانگین غلظت سیترات ادرار بر حسب mg/dl در رت‌های گروه‌های مورد آزمایش

گروه اول	روز صفر	روز ۱۴	روز ۲۸
گروه اول	۱/۰۲ ± ۰/۱۴	۱/۵۴ ± ۰/۱۹	۱/۷۸ ± ۰/۳۹
گروه دوم	۲/۱۲ ± ۰/۱۸	۱/۰۷ ± ۰/۱۴ [□]	۱/۲۸ ± ۰/۲۲ [□]
گروه سوم	۱/۴۶ ± ۰/۵۳	۰/۶۷ ± ۰/۱۱ [□]	۰/۸۷ ± ۰/۱۴
گروه چهارم	۱/۲۹ ± ۰/۴۳	۰/۶۱ ± ۰/۱۹ [□]	۰/۹۷ ± ۰/۲۲

نمایش داده‌ها بصورت Mean±SEM بوده و بررسی آماری با استفاده از تست‌های one way ANOVA و Tukey انجام شد. تعداد رت‌های گروه اول $n=7$ و در سایر گروه‌ها $n=8$ می‌باشد.

□ کاهش معنی‌دار میزان سیترات ادرار در مقایسه با روز صفر ($p < 0.05$) هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین میزان سیترات ادرار گروه‌های دوم تا چهارم با گروه اول وجود ندارد.

در جدول ۳ نتایج حاصل از مقایسه میزان کلسیم ادرار گروه‌های مختلف ارائه گردیده است. با توجه به داده‌ها مشخص شد که اختلاف بین غلظت کلسیم ادرار گروه‌های دوم تا چهارم با گروه اول در روز ۱۴ معنی‌دار نیست ($p < 0.05$) مقایسه غلظت کلسیم ادرار در بازه زمانی ۲۸ روز نشان می‌دهد که غلظت این عنصر در گروه‌های دوم تا چهارم در روزهای ۱۴ و ۲۸ نسبت به روز صفر کاهش یافته است که این کاهش تنها در گروه دوم معنی‌دار ($p < 0.05$) است.

جدول ۳. میانگین غلظت کلسیم ادرار بر حسب mg/dl در رت‌های گروه‌های مورد آزمایش

گروه اول	روز صفر	روز ۱۴	روز ۲۸
گروه اول	۱۰/۲۵ ± ۰/۲۹	۷/۶ ± ۰/۵۶	۸/۳ ± ۱/۳۶
گروه دوم	۱۰/۲۵ ± ۰/۲۹	۶/۲۳ ± ۱/۲۵	۵/۲۴ ± ۰/۸۷ [□]
گروه سوم	۸/۲ ± ۰/۲۰	۹/۰۲ ± ۱/۱۶	۶/۰۰ ± ۱/۱۴
گروه چهارم	۸/۳۵ ± ۱/۴۷	۵/۶۲ ± ۱/۵	۷/۹۰ ± ۰/۶۵

نمایش داده‌ها بصورت Mean±SEM بوده و بررسی آماری با استفاده از تست‌های one way ANOVA و Tukey انجام شد. تعداد رت‌های گروه اول $n=7$ و در سایر گروه‌ها $n=8$ می‌باشد.

□ کاهش معنی‌دار میزان کلسیم ادرار در مقایسه با روز صفر ($p < 0.05$)

نتایج حاصل از بررسی بیوشیمیایی ادرار: همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود در روز ۱۴ غلظت اگزالات ادرار گروه دوم و سوم در مقایسه با گروه اول بطور معنی‌داری ($p < 0.01$) افزایش یافته است. در روز ۲۸ نیز غلظت اگزالات گروه سوم نسبت به گروه اول بطور معنی‌داری ($p < 0.05$) افزایش یافته است. مقایسه غلظت اگزالات ادرار در بازه زمانی ۲۸ روز نشان می‌دهد که غلظت این ماده در گروه‌های دوم تا چهارم در روزهای ۱۴ و ۲۸ در مقایسه با روز صفر بطور معنی‌داری ($p < 0.05$) افزایش یافته است.

جدول ۱. میانگین غلظت اگزالات ادرار بر حسب mg/dl در رت‌های گروه‌های مورد آزمایش.

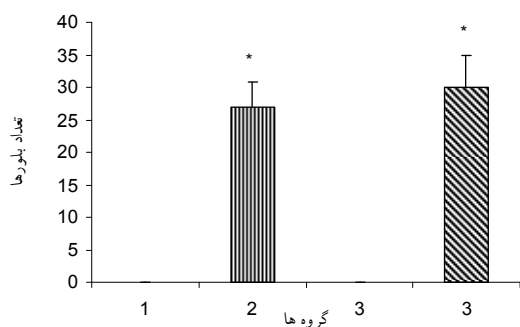
گروه اول	روز صفر	روز ۱۴	روز ۲۸
گروه اول	۰/۵۷ ± ۰/۰۱	۰/۴۳ ± ۰/۰۶	۰/۵۲ ± ۰/۰۹
گروه دوم	۰/۴۱ ± ۰/۰۶	۱/۲۱ ± ۰/۰۸ ^{□□□}	۰/۸۲ ± ۰/۰۱ [□]
گروه سوم	۰/۴۵ ± ۰/۰۳	۱/۲۵ ± ۰/۰۷ ^{□□}	۱/۰۹ ± ۰/۱۱ [□]
گروه چهارم	۰/۴۷ ± ۰/۰۲	۰/۷۶ ± ۰/۱۱ [□]	۰/۸ ± ۰/۰۸ [□]

نمایش داده‌ها به صورت Mean±SEM بوده و بررسی آماری با استفاده از تست‌های one way ANOVA و Tukey انجام شد. تعداد رت‌های گروه اول $n=7$ و در سایر گروه‌ها $n=8$ می‌باشد.

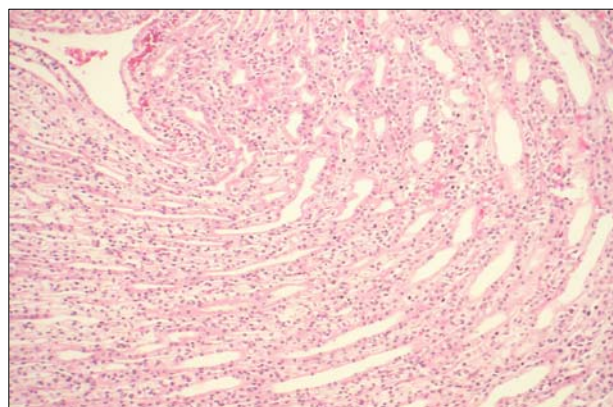
* افزایش معنی‌دار میزان اگزالات ادرار در مقایسه با گروه اول ($p < 0.05$)
 ** افزایش معنی‌دار میزان اگزالات ادرار در مقایسه با گروه اول ($p < 0.01$)
 □ افزایش معنی‌دار میزان اگزالات ادرار در مقایسه با روز صفر ($p < 0.05$)

نتایج حاصل از مقایسه میزان سیترات ادرار گروه‌های مختلف در جدول ۲ ارائه شده است. همانطور که دیده می‌شود غلظت سیترات ادرار گروه‌های دوم تا چهارم در روز ۱۴ و ۲۸ نسبت به گروه اول کاهش یافته است اگر چه این کاهش معنی‌دار نیست ($p > 0.05$). مقایسه غلظت سیترات ادرار در بازه زمانی ۲۸ روز نشان می‌دهد که غلظت این ماده در روز ۱۴ و ۲۸ در مقایسه با روز صفر بطور معنی‌داری

بلورهای اگزالات کلسیم در تعداد زیاد و بخش های گوناگونی از لوله های ادراری مانند بخش پروگزیمال و دیستال، لوله هنله، لوله های جمع کننده و حتی در کالیس ها تشکیل شده بود (شکل ۵).



شکل ۱. تعداد بلورهای اگزالات کلسیم در ده میدان میکروسکوپی بافت کلیه رت های گروه های مورد آزمایش. نمایش داده ها به صورت Mean±SEM بوده و بررسی آماری با استفاده از تست های one way ANOVA و Tukey انجام شد. تعداد رت های گروه اول n=7 و در سایر گروه ها n=8 می باشد. * افزایش معنی دار تعداد بلورهای اگزالات کلسیم در مقایسه با گروه اول (p<0.001)



شکل ۲. کالیس و مجاری جمع کننده کلیه طبیعی (۱۰×۱۰)

بررسی وضعیت بلورها در گروه چهارم نیز نشان دهنده تشکیل بلورهای اگزالات کلسیم با ابعاد متفاوت در لوله های ادراری بود. تجمعات بلورها در گروه های دوم و چهارم هر یک از ۳-۴ بلور با اندازه نسبتاً بزرگ تشکیل شده بود.

نتایج حاصل از بررسی بیوشیمیایی سرم: همان طور که در جدول ۴ مشاهده می شود مقایسه منیزیم سرم گروه های مختلف نشان داد که در روز ۲۸ غلظت این عنصر در سرم گروه های دوم تا چهارم کاهش یافته است اما غلظت منیزیم هیچ یک از این گروه ها در روز ۲۸ اختلاف معنی داری با گروه اول نشان نمی دهد (p>0.05). کاهش غلظت منیزیم در روز ۲۸ در گروه های سوم و چهارم در مقایسه با روز صفر معنی دار (p<0.05) است. نتایج حاصل از مقایسه کلسیم سرم در گروه های مختلف در روزهای صفر و ۲۸ اختلاف معنی داری را نشان نمی دهد (نتایج نشان داده نشده است).

جدول ۴. میانگین غلظت منیزیم سرم بر حسب mg/dl در رت های گروه های مورد آزمایش

روز صفر	روز ۲۸	گروه
۱/۸۶ ± ۰/۳۰	۲/۳۸ ± ۰/۱۴	گروه اول
۲/۵۶ ± ۰/۲۴	۲/۲۱ ± ۰/۱۸	گروه دوم
۲/۶۴ ± ۰/۱۴	۱/۸۶ ± ۰/۲۲ [□]	گروه سوم
۲/۹۲ ± ۰/۳۴	۱/۹۷ ± ۰/۱۶ [□]	گروه چهارم

نمایش داده ها بصورت Mean±SEM بوده و بررسی آماری با استفاده از تست های one way ANOVA و Tukey انجام شد. تعداد رت های گروه اول n=7 و در سایر گروه ها n=8 می باشد. □ کاهش معنی دار میزان منیزیم سرم در مقایسه با روز صفر (p<0.05) هیچ گونه اختلاف معنی داری بین میزان منیزیم سرم گروه های دوم تا چهارم با گروه اول وجود ندارد.

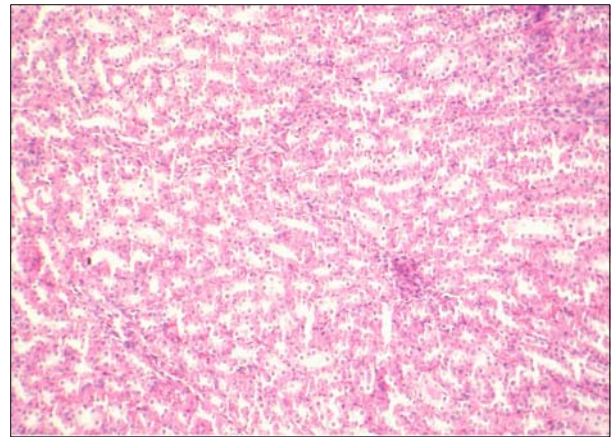
نتایج حاصل از بررسی پاتولوژیک کلیه: مقایسه تعداد تجمعات بلورهای اگزالات کلسیم در لوله های حاوی تجمعات اگزالات کلسیم که در ده میدان میکروسکوپی شمارش شدند. شکل ۱ نشان داد که تعداد بلورها در گروه های دوم و چهارم بطور معنی داری (p<0.001) بیش از گروه اول است. در گروه سوم در ده میدان شمارش شده هیچ گونه تجمع بلوری اگزالات کلسیم مشاهده نشد و تعداد تجمعات صفر می باشد. بررسی مقاطع میکروسکوپی گروه اول و سوم نشان داد که هیچ گونه بلوری در لوله های ادراری بافت کلیه رت های این دو گروه وجود نداشت. (شکل های ۲ تا ۴) بررسی وضعیت بلورها در گروه دوم نشان داد که تجمعات گسترده ای از

از آنجا که مهم‌ترین جزء غیر قطبی عصاره سیاه دانه تیموکینون است لذا احتمال می‌رود اثر معنی‌دار فراکسیون باقی مانده از فاز اتیل استات در جلوگیری از تشکیل سنگ کلیه ناشی از اثر تیموکینون باشد. محققین به بررسی اثرات تیموکینون بر روی سنگ کلیه پرداخته و نشان دادند که تجویز تیموکینون با دوز 0.4 mg/kg از راه دهان موجب ریزاندن و دفع سنگ اگزالات در رت شده است [۲۳]. در پژوهش دیگری نیز تجویز تیموکینون داخل صفاقی موجب جلوگیری از تشکیل سنگ اگزالات و نیز موجب ریزاندن سنگ اگزالات کلسیم تشکیل شده در کلیه رت شده است [۲۴]. نتایج این پژوهش‌ها با یافته‌های این پژوهش هماهنگ است و به نظر می‌رسد که در فراکسیون باقی مانده اتیل استات نیز تیموکینون بعنوان یک ماده اصلی همان ماده موثر بر جلوگیری از تجمع سنگ اگزالات کلسیم کلیه رت باشد. البته اثرات تجمع اجزاء فاز باقی مانده از اتیل استات در پیش‌گیری از سنگ اگزالات کلسیم قابل بررسی است.

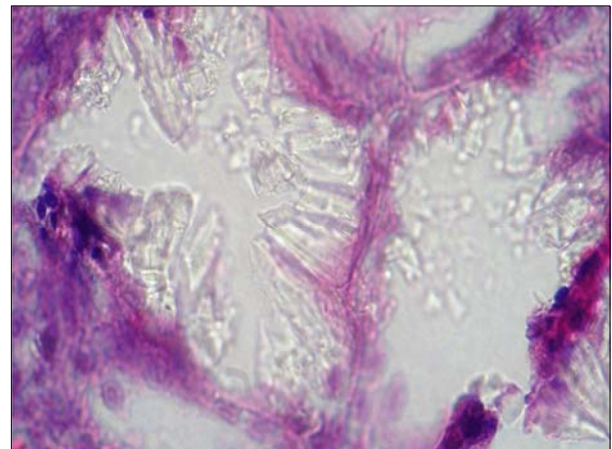
همانطور که اشاره شد فراکسیون اتیل استات (اجزای بینابینی عصاره) اثری بر تجمعات بلوری اگزالات کلسیم در کلیه رت‌ها ندارد و تعداد بلورهای اگزالات کلسیم شمارش شده در بافت کلیه تفاوت معنی‌داری با گروه دوم (کنترل منفی) ندارد ($p < 0.05$) و با توجه به اینکه تعداد تجمعات بلوری و وضعیت بلورها همانند گروه دوم است می‌توان نتیجه گرفت که اجزای بینابینی عصاره سیاه دانه موجود در فراکسیون اتیل استات اثری بر پیش‌گیری از تشکیل سنگ اگزالات کلسیم کلیه ندارند.

یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که فراکسیون اتیل استات اثری بر اگزالات ادرار رت‌ها ندارد (جدول ۱) و نمی‌تواند غلظت اگزالات ادرار را کاهش دهد و لذا به نظر می‌رسد که مکانیسم اثر فراکسیون اتیل استات بر جلوگیری از تشکیل سنگ اگزالات کلسیم در کلیه رت به اگزالات ادرار ارتباطی ندارد.

فراکسیون‌های عصاره سیاه دانه در این پژوهش با وجود اینکه سبب جلوگیری از تشکیل سنگ اگزالات کلسیم و یا



شکل ۳. لوله‌های ادراری طبیعی (۱۰×۱۰)



شکل ۴. بلورهای اگزالات کلسیم در لوله‌های ادراری (۱۰×۱۰)

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش اثر فراکسیون‌های اتیل استات عصاره ۵۰٪ الکلی آبی سیاه دانه در جلوگیری از تشکیل سنگ و تجمع بلورهای اگزالات کلسیم ایجاد شده توسط اتیلن گلیکول در بافت کلیه رت نژاد Wistar مورد بررسی قرار گرفت.

مهم‌ترین یافته این پژوهش اثرات فراکسیون باقی مانده از فاز اتیل استات (اجزای قطبی و غیر قطبی عصاره) بر جلوگیری از تشکیل سنگ‌های اگزالات کلسیم می‌باشد. بررسی میکروسکوپی بافت‌های کلیه و شمارش تعداد تجمعات بلورهای اگزالات کلسیم (شکل ۱) نشان داد که فراکسیون باقی مانده از فاز اتیل استات با دوز معادل 250 mg/kg از عصاره ۵۰٪ الکلی آبی سیاه دانه در بافت کلیه بطور کامل از ایجاد بلورهای اگزالات کلسیم جلوگیری نموده بطوری که در این گروه اصلاً بلوری تشکیل نشد.

فراکسیون های عصاره سیاه دانه در پیش گیری از سنگ اگزالات کلسیم ارتباطی با مکانیسم اثر منیزیم در مهار تشکیل بلورهای اگزالات کلسیم ندارد.

پژوهش های محققین نشان داده است که تیمار رت های مبتلا به هیپراگزالوری، هیپرکلسیوری، نفروکلسینوز کلسیم و سنگ کلیه با عصاره سیاه دانه باعث جلوگیری و رفع سنگ های کلیوی می شود به همین دلیل پژوهش گران پیشنهاد کردند که ممکن است بخشی از اثرات سیاه دانه به علت اثرات ضد چربی آن باشد [۲۷]. در مطالعات دیگر نیز نشان داده شد که سیاه دانه از طریق تثبیت غشاء ماست سل ها و مهار لیپواکسیژناز دارای اثرات ضد التهابی می باشد [۲۸]. لذا ممکن است بخشی از اثر سیاه دانه در جلوگیری و درمان سنگ های کلیوی که در این پژوهش دیده شد به علت اثرات ضد التهابی و آنتی اکسیدانی ترکیبات موجود در عصاره ۵۰٪ الکی آبی سیاه دانه باشد که با دخالت در پروسه تخریب سلولی ناشی از تشکیل کریستال احتمالا از آزاد شدن و یا عمل فاکتورهای پیش رونده التهاب جلوگیری می نماید. مطالعات جدید نشان داده است که سنگ های کلسیمی کلیه ممکن است منشاء عفونی داشته باشند [۱۹] با توجه به اینکه ترکیبات سیاه دانه دارای اثرات ضد میکروبی هستند [۳۱-۲۹] بنابراین ممکن است بخشی از اثرات سیاه دانه در پیش گیری و درمان سنگ کلیه بنحوی مرتبط با اثر آن در مهار عوامل عفونی باشد.

نتیجه گیری: یافته های حاصل از پژوهش حاضر به وضوح نشان می دهد که فراکسیون باقی مانده اتیل استات بطور معنی داری مانع از تشکیل سنگ اگزالات کلسیم در کلیه رت می شود و لذا این فراکسیون می تواند بعنوان یک فراورده سیاه دانه برای پیش گیری از سنگ اگزالات کلسیم مد نظر قرار گیرد. تعیین مکانیسم دخیل در این اثرات نیازمند بررسی های بیش تر می باشد.

ریزاندن آن می شوند ولی از افزایش غلظت اگزالات ادرار که به دنبال مصرف اتیلن گلیکول ایجاد شده بود جلوگیری نمی کنند که این یافته ها با نتایج حاصل از این پژوهش هماهنگ است.

یافته های پژوهش حاضر نشان می دهد که متعاقب مصرف اتیلن گلیکول غلظت سیترات ادرار تنها در گروه دوم به طور معنی داری ($p < 0.05$) نسبت به گروه اول کاهش می یابد که این یافته ها نیز با مطالعات قبلی [۲۵] هماهنگ بوده و نشان دهنده دخالت هیپوسیتراتوری در تشکیل سنگ اگزالات کلسیم است. در مطالعه حاضر سیترات ادرار در گروه های تیمار شده با فراکسیون های عصاره تفاوت معنی داری با گروه اول ندارد و با توجه به اینکه در گروه دریافت کننده فراکسیون اتیل استات بلورهای اگزالات کلسیم تشکیل شده اند اثر فراکسیون اتیل استات و فراکسیون باقی مانده از آن بر روی غلظت سیترات ادرار و لذا تاثیر فراکسیون باقی مانده در کاهش تجمعات بلوری اگزالات کلسیم را نمی توان به این پارامتر نسبت داد. یافته های این پژوهش اختلاف معنی داری در میزان کلسیم ادرار بین گروه های مبتلا به سنگ کلیه (گروه دوم و چهارم)، سالم (گروه اول) و گروه تیمار شده با باقی مانده اتیل استات نشان نمی دهد و لذا تاثیر فراکسیون باقی مانده در جلوگیری از تشکیل سنگ اگزالات کلسیم را به تغییرات کلسیم ادراری نیز نمی توان نسبت داد.

مقایسه میانگین غلظت منیزیم سرم بین گروه های مختلف نشان می دهد که در روز ۲۸ پس از شروع اتیلن گلیکول میانگین غلظت منیزیم و کلسیم سرم گروه های دریافت کننده اتیلن گلیکول سرم نسبت به گروه کنترل سالم تفاوت معنی داری ندارد ($p > 0.05$) به همین دلیل می توان نتیجه گرفت که تیمار رت ها با اتیلن گلیکول و فراکسیون های اتیل استات عصاره ۵۰٪ الکی آبی سیاه دانه تاثیری بر میزان منیزیم و کلسیم سرم ندارد. اگرچه منیزیم با کاهش جذب سیترات از لوله های کلیوی باعث افزایش دفع ادراری آن می گردد [۲۶] اما یافته های ما تغییرات یونی سرم را در طول تیمار با اتیلن گلیکول تایید نمی کند زیرا احتمالا تاثیر

- [15] Vahlensieck W. The importance of diet in urinary stones. *Urol Res* 1986; 14: 283-288.
- [16] Ljughall S. Environmental factors in the development of urolithiasis. *Contrib Nephrol* 1984; 37: 9-12.
- [17] Catalano-Pons C, Barga S, Schlecht D, Tabone MD, Deschenes G, Bensman A, and et al. Sulfadiazine induced nephrolithiasis in children. *Pediatr Nephrol* 2004; 19: 928-931.
- [18] Cohen F, Abdelmoula J, Hoarau MP, Jungers P, Lacour B, and Daudon M. Urinary lithiasis of medical origin. *Therapie* 2001; 56: 743-750.
- [19] Kramer G, Klingler HC, and Steiner GE. Role of bacteria in the development of kidney stones. *Curr Opin Urol* 2001; 10: 35-38.
- [20] Massey L. Magnesium therapy for nephrolithiasis. *Magnes Res* 2005; 18: 123-126.
- [21] Samsam shariat H. Qualitative and quantitative evaluation of the active constituents and control methods for medicinal plants. *Mani press*, first ed. 1992, 20-23 (Persian).
- [22] Narin Jamal. Solution, emulsions, suspensions and extracts. In: *Remington's pharmaceutical sciences*. 18th ed, Pennsylvania: Mack Publication; 1990. p.1543.
- [23] Eftekhari M. The effect of thymoquinone on kidney stone in rat. Thesis for degree of pharm D, School of pharmacy, Mashhad university of medical sciences, 2007; (Persian).
- [24] Hadjzadeh MR, Mohammadian N, Rahmani Z, and Behnam Rassouli F. The effects of thymoquinone on ethylene glycol induced kidney stone in rat. *Urol J*. (in press).
- [25] Chapple CR. Potassium-magnesium citrate is an effective prophylaxis against recurrent calcium oxalate nephrolithiasis. *Curr Opin Urol* 1998; 8: 341-344.
- [26] Reungjui S. Magnesium status of patients with renal stones and its effect on urinary citrate excretion. *BJU International* 2002; 90: 635-636.
- [27] Chetyrkin SV, Kim D, Belmont JM, Scheinman JI, Hudson BG, and Voziyan PA. Pyridoxamine lowers kidney crystals in experimental hyperoxaluria: A potential therapy for primary hyperoxaluria. *Kidney Int* 2005; 67: 53-60.
- [28] El-Dakhkhny M, Madi NJ, Lember N, and Ammon HP. Nigella sativa oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *J Ethnopharmacol* 2002; 81: 161-164.
- [29] Mutabagani A, and El-Mahdy SM. A study of the anti-inflammatory activity of Nigella sativa and thymoquinone in rats. *Saudi Pharm J* 1997; 5: 110-113.
- [30] Mouhajer F, Pederson JA, and Towers GN. Antimicrobial thymohydroquinones of morraican Nigella sativa seeds detected by electron spin resonance. *Pharmacol Biol* 1999; 37: 391-395.
- [31] Hanafy MS, and Hatem ME. Studies on the antimicrobial activity of Nigella sativa seed (black cumin). *J Ethnopharmacol* 1991; 34: 275-278.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به خاطر تأمین هزینه های مالی این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را درند.

منابع

- [1] Zargari A. Medicinal Plants, vol 2, 5th ed. Tehran University press, Tehran, 1992; P 43-44 (Persian).
- [2] Mirhaydar H. Plant Information, Nashre Farhang Islami Press, Iran, 1993; 211-214 (Persian).
- [3] Mojab F. Lippia citriodora monograph, in: Iranian Herbal Pharmacopoeia, Iranian Health Ministry, Food and Drug Deputy, 2001; 466-470 (Persian).
- [4] Salem ML, Immunopharmacology, and therapeutic properties of the Nigella sativa L. seed. *International Immunopharmacology* 2005; 5: 1749-1770.
- [5] El-Daly ES, Protective effect of cysteine and vitamin E, Crocus sativus and Nigella sativa extracts on cisplatin-induced toxicity in rats. *J Pharm Belg* 1998; 53: 87-93.
- [6] Marengo SR, Chen DH, Kaung HL, Resnick MI, and Yang L, Decreased renal expression of the putative calcium oxalate inhibitor Tamm-Horsfall protein in the ethylene glycol rat model of calcium oxalate urolithiasis. *J Urol* 2002; 167: 2192-2197.
- [7] Hadjzadeh MAR, Khoei A, Hadjzadeh Z, and Parizady M, Ethanolic extract of Nigella sativa L. seeds on ethylene glycol-induced kidney calculi in rats. *UJ* 2007; 4: 86-90.
- [8] Tanagho E.A, McAninch J.W, Smith, General urology, 15th ed. 2000; 291-321 (Persian).
- [9] Coe FL, and Evan A. Worcester E. Kidney stone disease. *J Clin Invest* 2005; 115: 2598-2608.
- [10] Menon M, and Resnick M. Urinary lithiasis: Etiology, diagnosis and medical management. In: *Compbells Urology*. 8th ed. London; Saunders; 2002. p. 3229-3305.
- [11] Iguchi M, Takamura C, Umekawa T, Kurita T, and Kohri K. Inhibitory effects of female sex hormones on urinary stone formation in rats. *Kidney Int* 1999; 56: 429-489.
- [12] Fan J, Chandhoke PS, and Grampass SA. Role of sex hormones in experimental calcium oxalate nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 376-380.
- [13] Shamsa A. Urinary stones, Mashhad university of medical sciences press, Mashhad, 2003; 30-45 (Persian).
- [14] Griffith HM, Shea B, Maguire M, Koegh G, and Kevany JP. A case control study of dietary intake of renal stone patients (part II). *Urol Rex* 1986; 2: 75-82.

The preventive effects of ethyl acetate fractions from aqueous and ethanolic extract of *Nigella sativa* L. seeds on calcium oxalate stones in Wistar rat

A. Khajavi Rad (Ph.D)^{*1}, M.AL.R Hadjzadeh (Ph.D)¹, N. Monavvar (M.Sc)², H. Ayathollahi (M.D)³
1 - Dept. of Physiology, Medical school, MUMS, Mashhad, Iran
2 - Dept. of Biology, Azad University, Mashhad, Iran
3 - Dept. Biochemistry, Ghaem hospital, MUMS, Mashhad, Iran.

Introduction: Various pharmacological effects of *Nigella sativa* including; anti-inflammatory and antimicrobial effects, disruption of kidney stone, lowering serum lipids and repairment of kidney tissues after nephrotoxicity, have been reported. The aim of this study was to investigate the preventive action of ethyl acetate fractions of aqueous-ethanolic extract of *Nigella sativa* seeds on calcium oxalate kidney stones in male rats.

Materials & Methods: 31 male Wistar rats were randomly divided into four groups. All groups were studied during 28 days of experimental protocol. Healthy control group (1) received tap drinking water. Negative control group (2) received 1% ethylene glycol in drinking water. Groups 3 and 4 were treated with 1% ethylene glycol as well as ethyl acetate phase remnant and ethyl acetate fractions from aqueous and ethanolic extract of *Nigella sativa* L. seeds, respectively at equivalent dose of 250 mg/kg of total extract. Urine concentration of oxalate, citrate and calcium in days 0, 14 and 28, and also plasma concentration of magnesium and calcium in days 0 and 28, were measured. At the end of experiment, kidneys were removed for histopathologic study and examined for counting calcium oxalate deposits. Data were presented as Mean \pm SEM and were analyzed by one way ANOVA and subsequently Tukey tests; p value less than 0.05 ($p<0.05$) was considered significant.

Results: Results showed that the number of calcium oxalate crystals in group 2 vs. group 1 and 3 (without any crystals) significantly increased ($p<0.001$), but there was no significant difference between groups 2 and 4. Urine oxalate concentration in day 28 increased significantly in groups 2, 3 and 4 ($p<0.05$) in comparison with day 0, but urine calcium concentration in groups 3 and 4 at day 28 has no significant difference with day 0.

Conclusion: The results of this study supported the inhibitory action of aqueous-ethanolic extract of *Nigella sativa* ethyl-acetate phase remnant on calcium oxalate kidney stones. However, ethyl acetate fraction of extract did not show a similar effect on kidney stones. Although the exact mechanism is not clear, but this action may be due to antioxidant, antilipid or anti-inflammatory properties of *Nigella sativa* seed. Therefore, *Nigella sativa* should be advised in treatment of human kidney stone disease.

Keywords: *Nigella sativa*, Kidney stones, Ethyl glycol, Calcium oxalate, N.S ethyl acetate fractions.

* Corresponding author: Fax: +98 511 8828564; Tel: +98 5112298002
Khajavirada@MUMS.ac.ir