اثر محافظتی بربرین بر سمیت کلیوی القا شده با بروموبنزن در موش سفید کوچک

دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۲ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۹

هادی کلانتر[۱]، مهدی گودرزی[۲]، محمدجواد خدایار[۳]، الهه صادقی[۴]، زهرا بصیر[۵]، مجتبی حقی کرم الله[۶]، مجتبی کلانتر[۶]*

۱. استادیار، مرکز تحقیقات سم شناسی، پژوهشکده علوم پایه پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران ۲. استادیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران ۳. دانشیار، گروه سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران ۴. دکترای داروسازی، مرکز تحقیقات سم شناسی، پژوهشکده علوم پایه پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران ۵. استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران ۶. استادیار، دانشکده علوم پزشکی شوشتر، شوشتر، ایران

چکیده

مقدمه و هدف: بروموبنزن یک سم محیطی است که متابولیت‌های آن باعث سمیت کلیوی می‌گردد. مکانیسم دخیل در ایجاد سمیت شامل استرس اکسیداتیو است. هدف از این مطالعه تعیین اثرات محافظتی بربرین در برابر سمیت کلیوی القا شده با بروموبنزن در موش نر سفید کوچک نژاد NMRI بود.

روش کار: در این مطالعه تجربی، ۴۰ سر موش سفید کوچک به طور تصادفی به پنج گروه تقسیم شدند. گروه یک (کنترل): دریافت کننده نرمال سالین، گروه دوم: دریافت کننده تک دوز بروموبنزن (۰/۳۶ ml/kg) به‌صورت داخل صفاقی در روز دهم، گروه سوم، چهارم و پنجم: دریافت کننده بربرین به ترتیب با دوزهای ۱۰۰ ،۵۰، ۲۵ mg/kg به‌صورت خوراکی به مدت ۱۰ روز متوالی و تک دوز بروموبنزن (۰/۳۶ ml/kg) به‌صورت داخل صفاقی در روز دهم. ۲۴ ساعت بعد از آخرین تجویز، از حیوانات خونگیری شد و مارکرهای کلیوی اندازه‌گیری گردید. از کلیه راست جهت اندازه‌گیری مارکرهای استرس اکسیداتیو و از کلیه چپ جهت بررسی مطالعات بافت شناسی استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز بروموبنزن سبب افزایش معنادار نیتروژن اوره خون، کراتینین، مالون دی آلدئید، نیتریک اکساید و کاهش معنادار سطح گلوتاتیون و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز نسبت به گروه کنترل می‌گردد ($p<۰/۰۵$). اما بربرین سبب کاهش معنادار نیتروژن اوره خون، کراتینین، مالون دی آلدئید، نیتریک اکساید و همچنین افزایش معنادار سطح گلوتاتیون و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز نسبت به گروه بروموبنزن گردید ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد که درمان با بربرین به‌طور معناداری منجر به بهبود عملکرد کلیوی و کاهش آسیب اکسیداتیو بافت کلیه در سمیت القا شده با بروموبنزن می‌شود.

کلیدواژه‌ها: استرس اکسیداتیو، بروموبنزن، بربرین، سمیت کلیوی، موش نر سفید

***نویسنده مسئول:** استادیار، دانشکده علوم پزشکی شوشتر، شوشتر، ایران

ایمیل: Kalantar-m@shoushtarums.ac.ir **تلفن:** ۰۶۱۳۶۲۲۴۲۴۲ **نمابر:** ۰۶۱۳۶۲۶۱۸۵

مقدمه

کلیه نقش مهمی در حذف داروها و همچنین آلاینده‌های سمی محیطی دارد. آسیب به کلیه سبب از دست رفتن پوشش اپیتلیالی، تغییرات آپوپتیک و نکروتیک در لوله‌های کلیوی می‌شود. مسمومیت کلیوی همچنین باعث آسیب به غشای گلومرولی و تغییرات هسته‌ای و تحلیل میتوکندریایی در سلول‌های توبولی کلیه و در نهایت اختلالات زیادی در بدن می‌شود (۱). انواع نفروپاتی‌های مزمن و حاد بعد از مصرف داروهای مختلف گزارش شده است که این سمیت کلیوی ناشی از آسیب به بخش لوله بینابینی می‌باشد. بیماری مزمن کلیه ممکن است در اثر ایجاد رادیکال‌های آزاد، آزاد شدن کموکاین‌ها و حرکت سلول‌های التهابی به محل آسیب دیده متعاقباً منجر به فیبروز بافتی شود (۲).

یکی از موادی که باعث سمیت و آسیب به کلیه می شود برموبنزن است. بروموبنزن یک ماده خام صنعتی است که در ساخت بسیاری از داروها و مواد شیمیایی استفاده می‌شود. بروموبنزن یک مایع بی‌رنگ و بی‌بو است که در طی فرآوری یا در طول تولید فنیل منیزیم بروماید، در اتمسفر آزاد می‌شود و به عنوان یک ماده سمی شناخته می‌شود که در صورت مصرف یا بلعیده شدن سبب مسمومیت می‌گردد (۳). بروموبنزن توسط آنزیم سیتوکروم P450 هیدرولیز و به متابولیت‌های مختلفی تبدیل می‌شود که سبب آسیب‌های کبدی و کلیوی می‌گردند (۴). این متابولیت‌ها در فاز II آنزیم‌های متابولیزه‌کننده داروها، توسط گلوتاتیون ترانسفراز به گلوتاتیون متصل می‌شود. این اتفاق سبب کاهش گلوتاتیون، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی از جمله کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، افزایش لیپید پراکسیداسیون، تخلیه ATP، اختلال در عملکرد میتوکندری و در نهایت از بین رفتن محافظت سلولی در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن و ایجاد آسیب به سلول‌ها می‌گردد (۵).

ترکیبات طبیعی گیاهی با خواص آنتی اکسیدانی، در برابر آسیب‌های بافتی کبدی و کلیوی ناشی از سموم، اثر محافظتی دارند. اکسید شدن این ترکیبات به‌وسیله رادیکال‌های آزاد منجر به ایجاد رادیکال‌هایی با فعالیت کمتر و پایداری بیشتر می‌شود و افزایش واکنش گروه هیدروکسیل موجود در این ترکیبات طبیعی، رادیکال‌ها را غیرفعال می‌کند (۶). بربرین یک آلکالوئید ایزوکوئینولین گیاهی است که با تاریخ درمانی بسیار طولانی در طب سنتی چین و هند به‌کار می‌رفته است. این آلکالوئید در بسیاری گیاهان وجود دارد از جمله: *Berberis aristata* و*Berberis vulgaris*. این ترکیب فیتوشیمیایی را می‌توان در ریشه، ریزوم و پوسته ساقه این گیاهان یافت. به دلیل خواص آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و ضد میکروبی، بربرین از مدت‌ها پیش در طب سنتی چین، هند و خاورمیانه به‌عنوان یک دارو استفاده شده است (۷). جالب توجه است تحقیقات کلینیکی دیگر بر روی بربرین اثرات دارویی دیگری برای آن برشمرده است که در درمان بسیاری از دردهای مزمن و بیماری‌ها از جمله سرطان، افسردگی، دیابت، چربی و فشارخون بالا سودمند می‌باشد (۸).

از آنجایی که کاربرد گیاهان دارویی در درمان بیماری‌های کلیوی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و به لحاظ نقش حیاتی کلیه در بدن، هدف از این مطالعه تعیین اثرات محافظتی بربرین در برابر سمیت کلیوی القا شده با بروموبنزن در موش نر سفید کوچک نژاد NMRI بود.

روش کار

مواد: بربرین (CAS No.:633-65-8) و بروموبنزن (CAS No.:108-86-1) از شرکت سیگما خریداری گردید. تترا اتوکسی پروپان، آلبومین سرم گاوی، تیوباربیتوریک اسید، دی تیو- بیس- نیترو بنزوئیک اسید، کوماسی بلو جی، تری کلرواستیک اسید، گلوتاتیون احیاء و دیگر مواد شیمیایی از شرکت مرک تهیه گردید.

حیوانات

برای انجام این مطالعه از موش نر سفید کوچک جنس آلبینو در محدوده وزنی ۲۵-۲۰ گرم استفاده گردید. حیوانات از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز خریداری شدند. حیوانات در قفس‌هایی از جنس پلی کربنات در دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد در سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند و توسط غذای فشرده مخصوص خریداری شده از شرکت خوراک دام و آب لوله‌کشی شهری تغذیه گردیدند. برای سازگاری بیشتر با محیط آزمایشگاه یک هفته پیش از شروع مطالعه حیوانات در شرایط مذکور قرار داده شدند.

پروتکل مطالعه

۴۰ سر موش سفید کوچک جنس نر نژاد NMRI به صورت تصادفی در ۵ گروه (هر گروه دارای هشت حیوان) به شرح زیر تقسیم شدند:

-گروه یک (کنترل): دریافت محلول سرم فیزیولوژی با حجم ml/day ۲ به صورت خوراکی به مدت ۱۰ روز متوالی و دریافت تک دوز نرمال سالین (۰/۱ ml) به صورت داخل صفاقی در روز دهم.

-گروه دوم: دریافت تک دوز بروموبنزن (۰/۳۶ ml/kg) به صورت داخل صفاقی در روز دهم.

-گروه سه: دریافت بربرین با دوز ۲۵ mg/kg به صورت خوراکی به مدت ۱۰ روز متوالی (۹) و تک دوز بروموبنزن (۰/۳۶ ml/kg) به صورت داخل صفاقی در روز دهم.

-گروه چهار: دریافت بربرین با دوز ۵۰ mg/kg به صورت خوراکی به مدت ۱۰ روز متوالی (۹) و تک دوز بروموبنزن (۰/۳۶ ml/kg) به صورت داخل صفاقی در روز دهم.

-گروه پنج: دریافت بربرین با دوز ۱۰۰ mg/kg به صورت خوراکی به مدت ۱۰ روز متوالی (۹) و تک دوز بروموبنزن (۰/۳۶ ml/kg) به صورت داخل صفاقی در روز دهم.

به منظور ایجاد سمیت کلیوی از دوز ۰/۳۶ ml/kg بروموبنزن استفاده گردید، بدین صورت که: ml ۰/۳۶بروموبنزن خالص با روغن زیتون به حجم ml ۱۰ رقیق شد و به ازای هر گرم وزن بدن موش نر سفید کوچک نژاد NMRI، یک واحد انسولین به صورت داخل صفاقی تزریق شد (۱۰). بین تجویز برموبنزن و بربرین در روز دهم یک ساعت فاصله زمانی بود. ۲۴ ساعت بعد از تجویز آخرین دوز (روز یازدهم) و پس از القای بیهوشی با کتامین/ زایلازین با دوز ۹۰/۹ mg/kg، از قلب حیوان خونگیری به عمل آمد و حیوانات به‌وسیله گیوتن آسان-کشی شدند. نمونه‌های خون با دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. برای ارزیابی آسیب کلیوی، سرم جدا شده به آزمایشگاه بیوشیمی منتقل و شاخص‌های عملکرد کلیه از جمله کراتینین و نیتروژن اوره خون اندازه‌گیری گردید. از هر حیوان کلیه سمت راست جدا شد و در محلول فرمالین ۱۵٪ تثبیت و جهت تعیین میزان آسیب بافتی به آزمایشگاه پاتولوژی ارسال شد. کلیه سمت چپ برای ارزیابی میزان مالون دی آلدئید، نیتریک اکساید، گلوتاتیون، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز جدا گردید. برای این منظور ۰/۵ گرم از بافت کلیه در بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH= ۷/۴ و با غلظت ۱۰٪ حجمی/ وزنی هموژنیزه گردید. برای تعیین غلظت پروتئین، از روش Bradford استفاده شد (۱۱). در ابتدا معرف برادفورد که شامل کوماسی بلو، اسید فسفریک ۸۵٪ و اتانول ۹۶٪ می‌باشد، تهیه گردید. جذب رنگ حاصل از مخلوط ۵۰ میکرولیتر از هموژنه بافتی رقیق شده و ۲/۵ میلی‌لیتر از معرف برادفورد را با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر در معادله کالیبراسیون غلظت‌های مشخص ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آلبومین سرم گاوی قرار داده و غلظت پروتئین محاسبه گردید.

اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدئید

برای تعیین میزان مالون دی الدئید، از روش Satho استفاده شد (۱۲). به نیم میلی‌لیتر از بافت هموژنه، ۱/۵میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید ۱۰٪ اضافه نموده و سپس با دور ۴۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. به ۱/۵ میلی-لیتر از مایع رویی (سوپرناتانت)، ۲ میلی‌لیتر محلول ۰/۶۷٪ تیو باربیتوریک اسید اضافه نموده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب جوش انکوبه شد. سپس ۲۶ میلی‌لیتر محلول ۱- بوتانول به محلول اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. جذب محلول رویی صورتی رنگ به کمک اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت گردید. غلظت مالون دی آلدئید با استفاده از تترا اتوکسی پروپان به‌عنوان استاندارد تعیین شده و نتایج به صورت نانومول بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد. جهت رسم منحنی کالیبراسیون از غلظت‌های ۰/۲ تا ۲۰ میکرومولار تترا اتوکسی پروپان در اسید سولفوریک ۱۰٪ استفاده گردید.

اندازه‌گیری میزان گلوتاتیون

محتوای گلوتاتیون توسط واکنش گلوتاتیون با معرف المن (DTNB) و ایجاد رنگ زرد (TNB) شناسایی و اندازه‌گیری می‌شود (۱۳). به‌طور خلاصه ۱ میلی‌لیتر بافر Tris-EDTA با pH= ۸/۶ به ۵۰ میکرولیتر بافت هموژنه اضافه و مخلوط گردید. سپس ۲۰ میکرولیتر معرف المن ۰/۰۱ مولار در متانول به مخلوط بالا اضافه و بعد از ۱۵ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، رنگ زرد ایجاد شده در طول موج ۴۱۲ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. از استاندارد گلوتاتیون در غلظت‌های مختلف برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. با توجه به میزان پروتئین در هر میلی‌لیتر از سوپرناتانت، محتوای گلوتاتیون

بر حسب نانومول بر میلی‌گرم پروتئین به‌دست آمد.

اندازه‌گیری میزان نیتریک اکساید

سنجش میزان نیتریک اکساید بر اساس واکنش گریس انجام شد (۱۴). به علت این که سنجش مستقیم نیتریک اکساید در بافت‌های زنده مشکل است میزان نیتریت و نیترات به‌عنوان شاخصی برای نیتریک اکساید محسوب می‌شود. محلول کاری شامل سولفانیل آمید ۱٪، نفتیلن اتیلن دی آمید دی هیدرو کلرید آمید ۱٪ و ارتوفسفریک اسید ۲/۵٪ بود. برای سنجش آن ml ۱ بافت هموژنیزه و ml ۱ از محلول گریس استفاده شد. مخلوط این دو به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و جذب نوری آن در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد و برای منحنی استاندارد از رقت‌های مختلف نیتریت سدیم استفاده گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های فوق بر اساس دستورالعمل کیت ساخت شرکت ZellBio انجام گردید.

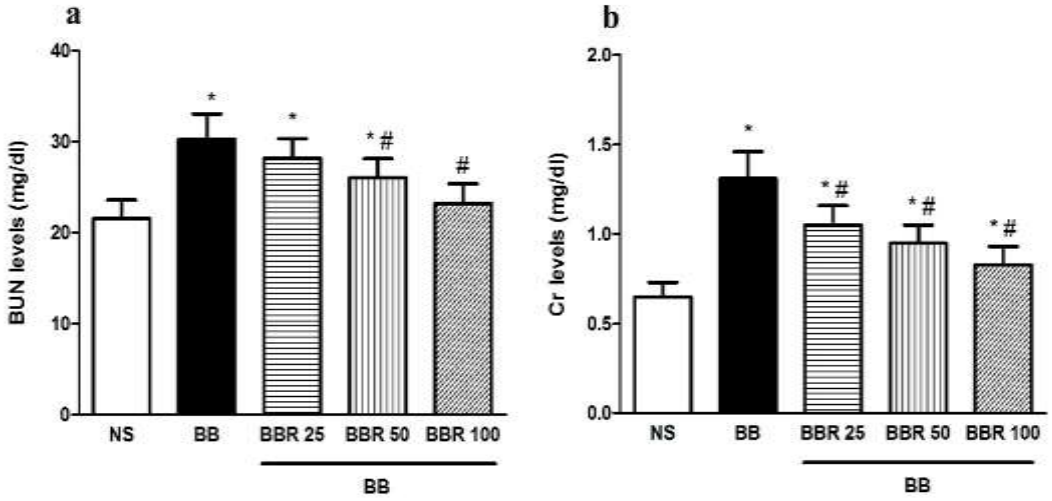
تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق نتایج به صورت Mean±SEM بیان شد. برای مقایسه داده‌های سنجش‌های بیوشیمیایی از آزمون way one ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. نرم‌افزار آماری مورد استفاده Graph Pad PRISM Software Inc, USA, نسخه ۸ بوده و ($p<۰/۰۵$) به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

اثرات بربرین و بروموبنزن بر میزان کراتینین و نیتروژن اوره خون

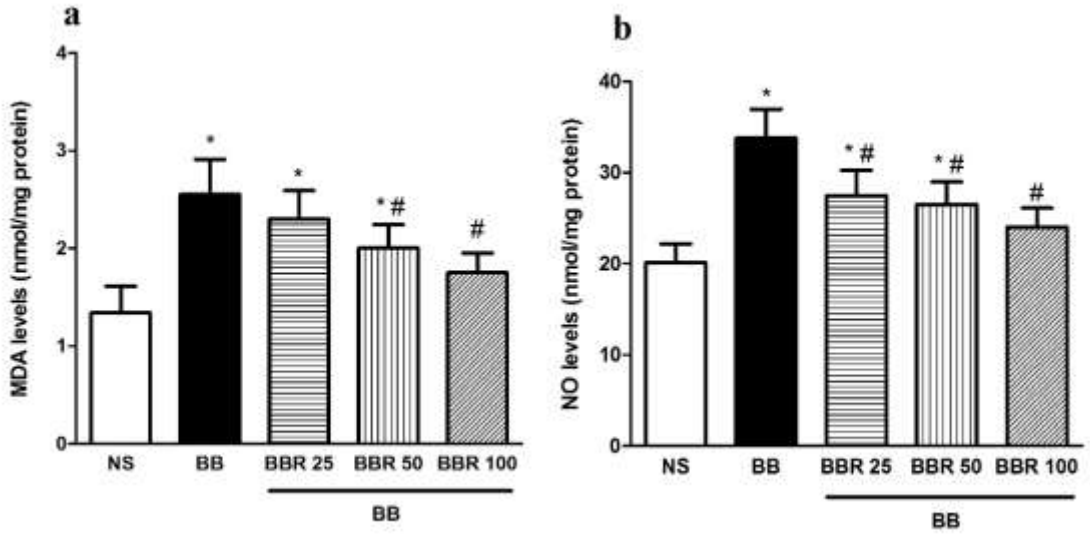
همان‌طور که در نمودار۱ (a, b) نشان داده شده است، تجویز بروموبنزن باعث افزایش معنادار میزان کراتینین و نیتروژن اوره خون نسبت به گروه نرمال سالین (کنترل) می‌گردد ($p<۰/۰۵$). با این حال، تجویز بربرین سبب کاهش معنادار میزان کراتینین و نیتروژن اوره خون نسبت به گروه بروموبنزن گردید ($p<۰/۰۵$).



نمودار ۱: میانگین سطح نیتروژن اوره خون و کراتینین در گروه‌های مورد مطالعه
NS: نرمال سالین، BB: بروبنزن، BBR: بربرین، BUN: نیتروژن اوره خون، Cr: کراتینین
* اختلاف معنی‌دار با گروه نرمال سالین ($p<۰/۰۵$)
# اختلاف معنی‌دار با گروه برموبنزن ($p<۰/۰۵$)

اثرات بربرین و بروموبنزن بر میزان مالون دی آلدئید و نیتریک اکساید

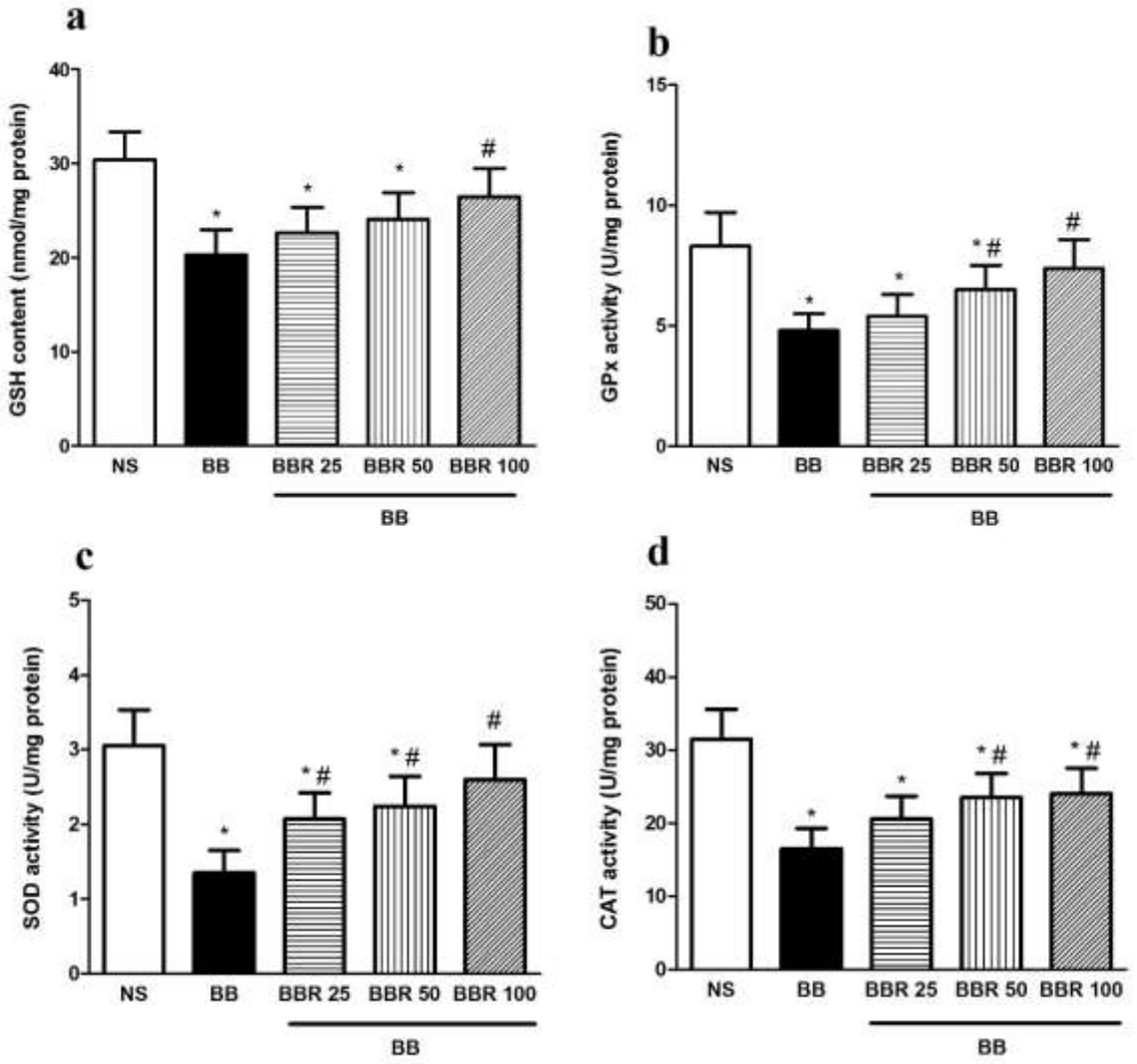
نتایج حاصل از نمودار ۲ (a, b) نشان می‌دهد که افزایش معناداری در میزان مالون دی آلدئید و نیتریک اکساید در گروه دریافت کننده بروموبنزن نسبت به گروه کنترل وجود دارد (p<۰/۰۵). همچنین کاهش معناداری در میزان مالون دی آلدئید و نیتریک اکساید در گروه‌های تحت درمان با بربرین نسبت گروه بروموبنزن وجود دارد (p<۰/۰۵).



نمودار ۲: میانگین سطح مالون دی آلدئید و نیتریک اکساید در گروه‌های مورد مطالعه
NS: نرمال سالین، BB: بروونزن، BBR: بربرین، MDA: مالون دی آلدئید، NO: نیتریک اکساید
* اختلاف معنی‌دار با گروه نرمال سالین (p<۰/۰۵)
# اختلاف معنی‌دار با گروه برموبنزن (p<۰/۰۵)

اثرات بربرین و بروموبنزن بر میزان گلوتاتیون احیاء و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی

نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز بروموبنزن باعث کاهش معنادار میزان گلوتاتیون احیاء و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز می‌گردد (p<۰/۰۵). همچنین تجویز بربرین توانسته بود که به‌طور معناداری از کاهش میزان گلوتاتیون احیاء و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسدانی ناشی از بروموبنزن جلوگیری کند (p<۰/۰۵). نتایج در نمودار ۳ (a, d) نشان داده شده است.



نمودار ۳: میانگین سطح گلوتاتیون و گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در گروه‌های مورد مطالعه

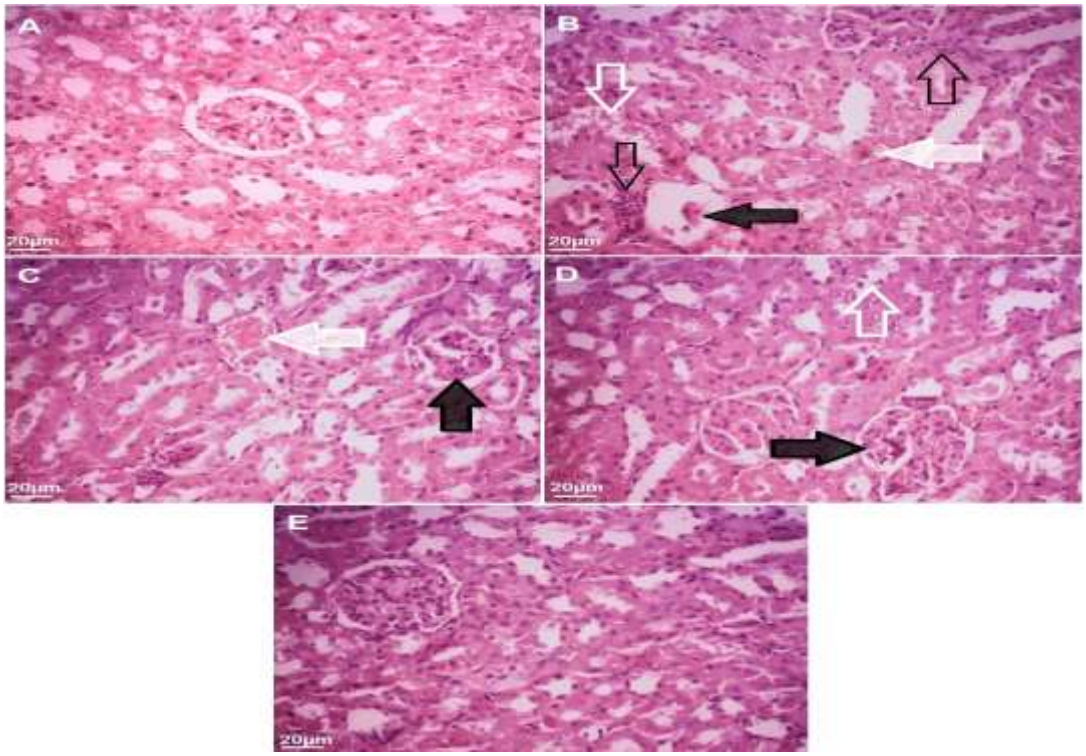
NS: نرمال سالین، BB: بروبنزن، BBR: بربرین، GSH: گلوتاتیون، GPx: گلوتاتیون پراکسیداز، SOD: سوپراکسید دیسموتاز، CAT: کاتالاز

* اختلاف معنی‌دار با گروه نرمال سالین ($p<۰/۰۵$)

اختلاف معنی‌دار با گروه برموبنزن ($p<۰/۰۵$)

اثرات بربرین و بروموبنزن بر هیستوپاتولوژی بافت کلیه

در گروه کنترل بافت کلیه دارای ساختار نرمال بوده و ساختمان لوله‌های پیچیده پروگزیمال و دیستال، کپسول بومن و گلومرول‌ها طبیعی می‌باشد و ضایعه پاتولوژیک خاصی مشاهده نگردید (تصویر A ۱، جدول ۱). در گروه دریافت کننده بروموبنزن مشاهده شد که این ماده باعث آسیب بافتی شده و تغییرات تخریبی در گلومرول‌ها و لوله‌های پروگزیمال ایجاد می کند. همچنین برموبنزن باعث تجمع سلول‌های التهابی و سلول های خونی در بافت کلیه شده بود (تصویر B ۱، جدول ۱). در گروهی که تحت درمان با بربرین قرار گرفته بودند میزان آسیب وارده به ساختمان کلیه نسبت به گروه بروموبنزن به‌طور معناداری کمتر بود (تصویر C-D ۱، جدول ۱).



تصویر ۱: تصویر میکروسکوپی بافت کلیه موش سفید کوچک در گروه‌های مورد مطالعه. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی X40
A: تصویر میکروسکوپی بافت کلیه موش سفید کوچک در گروه کنترل، B: تصویر میکروسکوپی بافت کلیه موش سفید کوچک در گروه بروموبنزن، C: تصویر میکروسکوپی بافت کلیه موش سفید کوچک در گروه‌های دریافت کننده بربرین با دوز ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم. پیکان سفید توخالی: تخریب لوله پروگزیمال، پیکان سفید توپر، تجمع گلبول‌های قرمز، پیکان سیاه توخالی: ارتشاح سلول‌های التهابی، پیکان سیاه توپر: تخریب گلومرول.

جدول ۱: اثر بربرین و بروموبنزن بر میانگین و انحراف معیار نتایج هیستوپاتولوژی بافت کلیه

معیارهای هیستوپاتولوژی	گروه				
	نرمال سالین (کنترل)	بروموبنزن	بروموبنزن+ بربرین ۲۵	بروموبنزن+ بربرین ۵۰	بروموبنزن+ بربرین ۱۰۰
قطر گلومرول (µm)	۸۷/۳۶±۲/۸	۲۷/۹±۰/۲۶ *	۴۲/۳۸±۰/۲۳ #*	۶۶/۲۸±۱/۹ #*	۸۷±۱/۸ #
آسیب لوله پروگزیمال (%)	۱۶/۶۷±۱/۶	۳۰±۱ *	۲۶/۶±۲/۱ *#	۱۵±۲/۲ #	۱۶/۶±۰/۲۱ #
آسیب لوله پروگزیمال (%)	۰	۲/۸±۰/۱۶ *	۲/۵±۰/۱۶ *	۱/۳±۰/۵۱ *#	۰/۳۳±۰/۲۱ #
ارتشاح سلول‌های التهابی	۰/۱۶±۰/۱۲	۲/۸±۰/۱۶ *	۲/۳±۰/۲۱ *#	۱/۳±۰/۲۱ *#	۰/۱۶±۰/۱۶ #

* اختلاف معنی‌دار با گروه نرمال سالین ($p<۰/۰۵$)
# اختلاف معنی‌دار با گروه برموبنزن ($p<۰/۰۵$)

بحث

نتایج بررسی‌های بافت کلیه در این مطالعه نشان داد که بروموبنزن باعث بروز آسیب کلیوی می‌شود. بر این اساس دستیابی به روش‌هایی جهت کاهش عوارض سوء این ماده امری ضروری به نظر می‌رسد. در مطالعه کنونی، مشخص گردید که تجویز بربرین سبب پیشگیری از آسیب کلیوی ناشی از مصرف بروموبنزن در موش سفید کوچک می‌گردد. نکروز سلول‌های کلیوی سبب کاهش سرعت فیلتراسیون گلومرولی می‌گردد که منجر به کاهش کلیرانس اوره و کراتینین شده که در نهایت باعث افزایش غلظت آنها در خون می‌شود (۱۵). نیتروژن اوره خون و کراتینین به‌عنوان دو مارکر اصلی در سمیت کلیوی به شمار می‌روند که در بیماری‌های کلیوی افزایش می‌یابند (۱۶). در مطالعه ما افزایش قابل توجهی در میزان نیتروژن اوره خون و کراتینین در گروه دریافت کننده بروموبنزن وجود داشت که نشان دهنده سمیت کلیوی ناشی از بروموبنزن بود. در گروهی که با بربرین پیش‌تیمار شده بودند، میزان نیتروژن اوره خون و کراتینین به‌طور قابل توجهی کاهش یافت که این کاهش می‌تواند به علت اثرات آنتی اکسیدانی بربرین باشد. در مطالعه رحمانی و همکاران، میکروامولسیون عصاره هیدروالکلی مریم نخودی توانسته بود افزایش اوره و کراتینین سرمی ناشی از تجویز بروموبنزن را کاهش دهد. آنها کاهش میزان اوره و کراتینین را با اثر آنتی اکسیدانی آن مرتبط می‌دانند (۱۷). یکی از مکانیسم‌های مهم در بروز سمیت حاد کلیوی بروموبنزن ایجاد آسیب اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد است (۱۸). متابولیزه شدن بروموبنزن به متابولیت‌های مختلف و کونژوگاسیون آنها با گلوتاتیون باعث تولید رادیکال-های آزاد می‌گردد که مهمترین آنها رادیکال هیدروکسیل می باشد و منجر به استرس اکسیداتیو، کاهش گلوتاتیون احیاء، غیرفعال شدن آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، پراکسیداسیون چربی-ها، تخریب پروتئین‌ها، آسیب به DNA و در نهایت نکروز سلول‌های کلیوی می‌شود (۱۸). پراکسیداسیون لیپید منجر به تولید آلدئیدهای سمی گردیده که یکی از سمی‌ترین آنها، مالون دی آلدئید است. این ماده محصول نهایی تجزیه پراکسید چربی است که در حال حاضر به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در نظر گرفته می‌شود (۱۹). علاوه بر این، یکی دیگر از شاخص‌های معتبر برای ارزیابی استرس اکسیداتیو، نیتریک اکساید است. نیتریک اکساید پس از سنتز قادر است با مولکول اکسیژن واکنش داده و N_2O_3 تولید کند که N_2O_3 نیز به نوبه خود با مولکول اکسیژن‌های از قبیل سوپر اکسید واکنش داده و پراکسی نیتریت تولید می‌کند که این ماده موجب تخریب بافت-ها می‌شود (۲۰)، لذا میزان نیتریت می‌تواند به‌عنوان شاخصی معتبر برای ارزیابی استرس اکسیداتیو به کار رود (۲۱). در این مطالعه میزان مالون دی آلدئید و نیتریک اکساید در گروه دریافت کننده بروموبنزن به تنهایی، افزایش چشمگیری یافت که مشابه با نتایج مطالعات قبلی بود (۲۲). همچنین در مطالعه ما مشخص گردید که پیش‌درمانی با بربرین موجب کاهش میزان مالون دی آلدئید و نیتریک اکساید می‌گردد. در مطالعه Chen و همکاران نیز مشخص شده است که بربرین می‌تواند از طریق کاهش میزان مالون دی آلدئید و نیتریک اکساید سبب کاهش سمیت کلیوی ناشی از داروهای مختلف از جمله دوکسوروبیسین گردد (۲۳). گلوتاتیون احیاء جزء مهمی از سیستم آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی بوده و نقش مهمی را در کنترل اثرات توکسیک رادیکال‌های آزاد بر عهده دارد (۲۴). بنابراین کاهش میزان گلوتاتیون احیاء می‌تواند به‌عنوان عاملی مستقیم در پراکسیداسیون چربی ناشی از بروموبنزن مطرح باشد. هم‌راستا با نتایج مطالعه کنونی، در مطالعات قبلی نشان داده شده است که میزان گلوتاتیون احیاء در اثر تجویز بروموبنزن کاهش می‌یابد (۱۷). سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز آنزیم‌های آنتی اکسیدانی هستند که سیستمی تدافعی را علیه گونه‌های فعال اکسیژن تشکیل داده‌اند (۲۵).

سوپراکسید دسموتاز، آنیون سوپراکسید را از طریق تبدیل آن به پراکسید هیدروژن زدوده و بدین ترتیب اثرات توکسیک آن را کاهش می‌دهد. در بررسی حاضر، فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز در موش‌های تیمار شده با بروموبنزن به دلیل تشکیل فراوان آنیون‌های سوپراکسید، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت که در پی آن فعالیت آنزیم‌های زداینده پراکسید هیدروژن یعنی کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز نیز در این موش-ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافته بود که مطابق با گزارشات قبلی بود (۲۶، ۲۷). به نظر می‌رسد که غیرفعال شدن سوپراکسید دسموتاز توسط آنیون‌های افزایش یافته سوپراکسید، منجر به غیرفعال شدن سایر آنزیم‌های آنتی اکسیدانی می‌شود. آنزیم کاتالاز H_2O_2 را به اکسیژن و آب تجزیه می‌کند. همچنین این آنزیم یکی از مهم‌ترین آنزیم‌ها در محافظت از

سلول در مقابل آلودگی اکسیدی به‌وسیله H_2O_2 را دارد (۲۸). آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز با استفاده از گلوتاتیون، پراکسیدها را به الکل کاهیده و از تشکیل رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کنند. در واقع گلوتاتیون پراکسیدازها کاهش پراکسید هیدروژن (آب اکسیژنه) و طیف گسترده‌ای از پراکسیدهای آلی به الکل مربوطه و آب را با استفاده از گلوتاتیون سلولی کاتالیز می‌کنند (۲۹). در مطالعه کنونی، مصرف بربرین مانع از کاهش گلوتاتیون احیاء و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز ناشی از بروموبنزن گردید که این ممکن است در اثر زدایش رادیکال‌ها توسط بربرین باشد که منجر به حفظ و بقاء این عوامل آنتی اکسیدانی شده است. اثر بربرین بر روی فاکتورهای آنتی اکسیدانی در این مطالعه مطابق با گزارشات قبلی بود (۳۰).

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده از این مطالعه موید این مطلب است که بربرین در جلوگیری از آسیب کلیوی حاصل از بروموبنزن موثر می‌باشد و می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب محافظ کلیوی در نظر گرفته شود. اثرات محافظت کلیوی این ترکیب را می‌توان به خاصیت آنتی اکسیدانی بالقوه آن و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی در بافت کلیه نسبت داد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از کلیه عزیزانی که در اجرای این پژوهش نهایت همکاری را داشتند؛کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید. تمام نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش همه بخش‌های پژوهش حاضر مشارکت داشته‌اند. پروپوزال این تحقیق توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی تبریز تأیید شده است (کد اخلاق IR.IAU.TABRIZ.REC.1400.075). این مقاله، حاصل پایان نامه دانشجوی دکترای فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز استخراج شده است و هیچ کمک مالی خاصی از سوی سازمان‌های تأمین مالی دریافت نکرده است.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافعی بین نویسندگان وجود نداشت.

References

1. Rehman MU, Tahir M, Ali F, Qamar W, Lateef A, Khan R, et al. Cyclophosphamide-induced nephrotoxicity, genotoxicity, and damage in kidney genomic DNA of Swiss albino mice: the protective effect of Ellagic acid. Molecular and Cellular Biochemistry. 2012;365(1-2):119-27.
2. Elseweidy MM, Askar ME, Elswefy SE, Shawky M. Nephrotoxicity induced by cisplatin intake in experimental rats and therapeutic approach of using mesenchymal stem cells and spironolactone. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2018;184(4):1390-1403
3. El-Sharaky A, Newairy A, Kamel M, Eweda S. Protective effect of ginger extract against bromobenzene-induced hepatotoxicity in male rats. Food and Chemical Toxicology. 2009;47(7):1584-90.
4. Peter SJ, Kumar CR, Vijay K, Ravivarma K, Kaleem S ,Sabina EP. Preventive measures of CoQ10 against bromobenzene-induced toxicity in rats. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2020;12(5):712-9.
5. Reid W, Christie B, Krishna G, Mitchell J, Moskowitz J, Brodie B. Bromobenzene metabolism and hepatic necrosis. Pharmacology. 1971;6(1):41-55.
6. Ishige K, Schubert D, Sagara Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. Free Radical Biology and Medicine. 2001;30(4):433-46.
7. Kong W-J, Zhang H, Song D-Q, Xue R, Zhao W, Wei J, et al. Berberine reduces insulin resistance through protein kinase C–dependent up-regulation of insulin receptor expression. Metabolism. 2009;58(1):109-19.
8. Zhou J, Zhou S, Tang J, Zhang K, Guang L, Huang Y, et al. Protective effect of berberine on beta cells in streptozotocin-and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats. European Journal of Pharmacology. 2009;606(1-3):262-8.
9. Kalalian Moghadam H, Balochnejadmojarad P, Roghani M, Khaksari M, Norouzi P, Fazli M, et al. The effect of berberine chloride on oxidative stress in hippocampus of streptozotocin-diabetic rats. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2014;22(4):123-31. (in Persian)
10. Kalantari A, Salimi A, Kalantari H, Broojeni JE, Rashidi I, Vanani AR, et al. The hepatoprotective effect of livergol microemulsion preparation (nanoparticle) against bromobenzene induced toxicity in mice. Toxicology Reports. 2019;6:444-8.

11. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976;72(1-2):248-54.
12. Kei S. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 1978;90(1):37-43.
13. Sadegh C ,Schreck RP. The spectroscopic determination of aqueous sulfite using Ellman's reagent. Murj. 2003;8(3):39-43.
14. Oktem G, Uysal A, Oral O, Sezer ED, Olukman M, Erol A, et al. Resveratrol attenuates doxorubicin-induced cellular damage by modulating nitric oxide and apoptosis. Experimental and Toxicologic Pathology. 2012;64(5):471-9.
15. Hamed M, El-Rigal N, Ali S. Effects of black seed oil on resolution of hepato-renal toxicity induced by bromobenzene in rats. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 2013;17(5):569-81.
16. Tavafi M, Ahmadvand H. Effect of rosmarinic acid on inhibition of gentamicin induced nephrotoxicity in rats. Tissue and Cell. 2011;43(6):392-7.
17. Rahmani A, Rashidi N M, Houshmand Gh, Goudarzi M. Study of the protective effect of hydroalcoholic extract microemulsion of teucrium polium L. Against bromobenzene- induced hepatotoxicity in mice. Yafteh. 2014;3(61):93-101. (in Persian)
18. Heijne WH, Slitt AL, Van Bladeren PJ, Groten JP, Klaassen CD, Stierum RH, et al. Bromobenzene-induced hepatotoxicity at the transcriptome level. Toxicological Sciences. 2004; 79(2):411-22.
19. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Free Radical Biology and Medicine. 1990;9(6):515-40.
20. Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, Romitelli F, Santini SA, Zuppi C, et al. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. The Review of Disability Studies. 2010;7(1):15-25.
21. Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1992;298(2):446-51.
22. Vedi M, Rasool M, Sabina EP. Protective effect of administration of withania somifera against bromobenzene induced nephrotoxicity and mitochondrial oxidative stress in rats. Renal Failure. 2014;36(7):1095-103.
23. Chen X, Zhang Y, Zhu Z, Liu H, Guo H, Xiong C, et al. Protective effect of berberine on doxorubicin-induced acute hepatorenal toxicity in rats. Molecular Medicine Reports. 2016;13(5):3953-60.
24. Yüncü M, Eralp A, Celõk A. Effect of aged garlic extract against methotrexate-induced damage to the small intestine in rats. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives. 2006;20(6):504-10.
25. Ghaznavi R, Kadkhodaee M, Khastar H, Zahmatkesh M. Renal oxidative stress status and histology in gentamicin nephrotoxicity: The effects of antioxidant vitamins. Tehran University Medical Journal. 2006;64(5):15-22. (in Persian)
26. Zhao H, Cheng N, He L, Peng G, Liu Q, Ma T, et al. Hepatoprotective effects of the honey of apis cerana fabricius on bromobenzene-induced liver damage in mice. Journal of Food Science. 2018;83(2):509-16.
27. Kalantari H, Shamsi Ehsan T, Samimi A, Kheradmand P, Shirani M, Zeidooni L. Histopathological and biomedical parameters determination in the protective effect of hydroalcoholic extract of allium jesdianum on hepatotoxicity induced by bromobenzene in mice. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2018;14(2):15-24. (in Persian)
28. Özgöçmen M, Yeşilot Ş. The role of resveratrol in hepatatoxicity caused by methotrexate. Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University. 2021;6(2):57-63.
29. Ighodaro O, Akinloye O. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria Journal of Medicine. 2018;54(4):287-93.
30. Xiong C, Wu YZ, Zhang Y, Wu ZX, Chen XY, Jiang P, et al. Protective effect of berberine on acute cardiomyopathy associated with doxorubicin treatment. Oncology Letters. 2018;15(4):5721-9.

Protective Effects of Berberine on Bromobenzene-Induced Nephrotoxicity in Mice

Received: 1 Feb 2022 Accepted: 18 Apr 2022

Hadi Kalantar[1], Mehdi Goudarzi[2], Mohammad Javad Khodayar[3], Elahe Sadeghi[4], Zahra Basir[5], Mojtaba Haghi Karamallah[6], Mojtaba Kalantar[6]*

1. Assistant professor, Toxicology Research Center, Medical Basic Sciences Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran 2. Assistant professor, Medicinal Plant Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran 3. Associate Professor, Toxicology Research Center, Medical Basic Sciences Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran 4. Doctor of Pharmacy, Toxicology Research Center, Medical Basic Sciences Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran 5. Assistant professor, Depatment of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran 6. Assistant professor, Shoushtar Faculty of Medical Sciences, Shoushtar, Iran

Abstract

Introduction: Bromobenzene is an environmental toxin whose metabolites cause renal toxicity. The mechanism involved in toxicity includes oxidative stress. The aim of this study was to investigate the protective effects of berberine against bromobenzene-induced renal toxicity in male NMRI mice.

Materials and Methods: In this experimental study, subjects were divided into five groups. Group I: control: recipient of normal salineGroup II: recipient of bromobenzene at a dose of 0.36 ml/kg intraperitoneally on the tenth day. Third, fourth and fifth groups: recipient of berberine at doses of 25, 50, 100 mg/kg, orally for 10 days successively, and bromobenzene at a dose of 0.36 ml/kg intraperitoneally. 24 hours after the last administration, blood samples were taken from animals and renal markers were measured. The right kidney was used to measure markers of oxidative stress and the left kidney was used for histological studies.

Results: The results of this study revealed that bromobenzene administration causes a significant increase in blood urea nitrogen creatinine, malondialdehyde and nitric oxide, as well as a significant reduction of glutathione levels and activity of catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes than the control group ($p<0.05$). But berberine causes a significant decrease in blood urea nitrogen creatinine, malondialdehyde and nitric oxide, as well as a significant increase of glutathione levels and activity of catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes than the bromobenzene group ($p<0.05$).

Conclusion: The present study indicates that treatment with berberine significantly improved renal function and reduced oxidative damage to kidney tissue in bromobenzene-induced toxicity.

Keywords: Oxidative stress, Bromobenzene, Berberine, Nephrotoxicity, Mice

***Corresponding Author:** Assistant professor, Shoushtar Faculty of Medical Sciences, Shoushtar, Iran

Email: Kalantar-m@shoushtarums.ac.ir **Tel:** +986136224242 **Fax:** +986133738381