مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ۹، شماره ۲ (پیاپی ۲۶) ، زمستان ۱۳۸۶

بررسی اثر فراکسیون‌های اتیل‌استات عصاره ۵۰٪ الکلی آبی سیاه دانه بر پیش‌گیری از سنگ اگزالات کلسیم کلیه در رت نژاد Wistar

ابولفضل خواجوی‌راد[*۱] (Ph.D.) ، موسی الرضا 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 زیست شناسی*

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 تقویت کننده ترمیم بافتی پس از ایجاد سمیت کلیوی اشاره کرد. در این پژوهش اثر فراکسیون‌های اتیل استات عصاره ۵۰٪ الکلی آبی سیاه دانه بر پیش‌گیری از سنگ اگزالات کلسیم کلیه در رت نژاد Wistar بررسی شد.

مواد و روش‌ها: برای انجام این پژوهش از ۳۱ سر رت نر 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 الکلی دانه سیاه دانه از فراکسیون باقی مانده اتیل استات و ۲۵۰ mg/kg عصاره آبی الکلی دانه سیاه دانه از فاز اتیل استات در آب آشامیدنی دریافت نمودند. میزان اگزالات، 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 اگزالات کلسیم در ۱۰ میدان میکروسکوپی (تعداد لوله های حاوی تجمعات) شمارش گردید. نتایج بصورت Mean±SEM محاسبه و با استفاده از تست ANOVA و سپس Tukey-Krammer مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تفاوت‌های با $p< ۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی شدند.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تجمع بلورهای اگزالات کلسیم در گروه دوم بطور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) بیش‌تر از گروه اول بود. علاوه بر این تجمع بلورهای اگزالات کلسیم در گروه دوم بطور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) بیش از گروه سوم (بدون تجمع بلور) بود اما اختلاف معنی‌داری با گروه چهارم نداشت. علاوه بر این غلظت اگزالات ادرار گروه های دوم، سوم و چهارم در روز ۲۸ نسبت به روز صفر بطور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) 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 باقی مانده از فاز اتیل استات عصاره ۵۰٪ الکلی آبی سیاه دانه در پیش‌گیری از تجمع بلورهای اگزالات کلسیم موثر است در حالی که فراکسیون اتیل استات عصاره فاقد چنین اثری است. اگرچه مکانیسم این اثر کاملا مشخص نیست اما شاید بتوان آنرا مربوط به اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و کاهش دهنده چربی خون سیاه دانه دانست و لذا می‌توان مصرف آنرا برای موارد انسانی نیز توصیه کرد.

کلید واژه: سیاه دانه، سنگ کلیه، اتیلن گلیکول، اگزالات کلسیم، فراکسیون اتیل استات سیاه دانه.

مقدمه

سیاه دانه (Nigella Sativa L.) ، متعلق به خانواده Runanculaceae، در برخی نواحی آسیا می‌روید و در ایران نیز به فراوانی در اصفهان، اراک و خراسان پرورش می‌یابد

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۱۱-۲۲۹۸۰۰۲ نمابر: ۰۵۱۱ -۸۸۲۸۵۶۴ Email: Khajavirada@MUMS.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۸۶/۱۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۴/۵

[۲و 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 [۴ و ۳] سیاه دانه دارای خواص فارماکولوژیک متعددی است که از این میان می‌توان به اثرات ضد التهابی، ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی، 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 [۶ و ۵]. 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 [۱۲ و ۱۱] 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 [۱۵، ۱۴]، استرس [۱۶] و انواع داروها [۱۸ و ۱۷] 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 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 ،۱] 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 اتیل استات 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 [۲۲، ۲۱] 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 پارافیلم بخوبی پوشانده شد و در انکوباتور با دمای ۴۰ 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

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٪ الکلی آبی سیاه دانه به دفعات مکرر در دکانتور با ml ۵۰ اتیل‌استات 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 اتیل‌استات، فاز باقی مانده از قیف 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 ۲۵۰-۱۶۰ گرم از موسسه سرم سازی رازی مشهد تهیه شد. رت‌ها تحت شرایط استاندارد با دمای ۲±۲۵ 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= ۷) 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 mg/kg ۲۵۰ عصاره آبی الکلی سیاه دانه از فراکسیون باقی مانده اتیل‌استات در آب آشامیدنی دریافت نمودند. رت‌های گروه چهارم نیز علاوه بر ۱٪ اتیلن گلیکول معادل mg/kg ۲۵۰ عصاره آبی الکلی دانه سیاه دانه از فاز اتیل استات در آب آشامیدنی دریافت نمودند.

جمع آوری و بررسی ادرار: برای جمع آوری ادرار ۲۴ ساعته، رت‌ها در روزهای صفر، ۱۴ و ۲۸ بطور انفرادی در قفس متابولیک قرار گرفتند. در پایان ۲۴ ساعت حجم ادرار جمع آوری شده از هر رت اندازه‌گیری شد و مقدار ml ۱۰ از آن به لوله حاوی µl ۲۵ اسید کلریدریک ۱ نرمال منتقل و در آن با پارافیلم 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 کالریمتریک گزیلیدیل‌بلو استفاده شد.

تهیه و بررسی نمونه های 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 اندازه گیری کلسیم و منزیم سرم بترتیب از روش‌های کالریمتریک گزیلیدیل‌بلو و متیل‌تیمول بلو 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 ۱۸۰ C° قرار گرفتند. در مرحله آخر برش‌ها بر روی لام منتقل شده و با استفاده از هماتوکسیلین 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± 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

میکروسکوپی در برش‌های بافتی کلیه با استفاده از تست‌های one way ANOVA و Tukeyمورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. اختلافات در سطح $p<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

نتایج

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 ($p<0/001$) 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 معنی داری ($p<0/05$) افزایش یافته است.

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

	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 ± ۰/۱ ◘
گروه سوم	۰/۴۵±./۰۳	۱/۲۵±۰/۰۷ ◘**	۱/۰۹ ± ۰/۱۱ ◘*
گروه چهارم	۰/۴۷±۰/۰۲	۰/۷۶±۰/۱۱ ◘	۰/۸±۰/۰۸ ◘

نمایش داده ها به صورت Mean±SEM بوده و بررسی آماری با استفاده از تست‌های one way ANOVA و Tukey انجام شد. تعداد رت‌های گروه اول n=۷ و در سایر گروه ها n=۸ می‌باشد.

* افزایش معنی دار میزان اگزالات ادرار در مقایسه با گروه اول ($p<0/05$)

** افزایش معنی‌دار میزان اگزالات ادرار در مقایسه با گروه اول ($p<0/001$)

◘ 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 که 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 ($p<0/05$) کاهش یافته است در حالی که در گروه‌های سوم و چهارم غلظت سیترات تنها بین روزهای صفر و ۱۴ بطور معنی داری ($p<0/05$)کاهش یافته است.

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

	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 ± ۰/۱ ◘	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=۷ و در سایر گروه ها n=۸ می‌باشد.

◘ کاهش معنی دار میزان سیترات ادرار در مقایسه با روز صفر ($p<0/05$)

هیچ گونه اختلاف معنی داری بین میزان سیترات ادرار گروه های 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 معنی دار 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 معنی دار ($p<0/05$) است.

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

	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=۷ و در سایر گروه ها n=۸ می باشد.

◘ کاهش معنی دار میزان کلسیم ادرار در مقایسه با روز صفر ($p<0/05$)

نتایج حاصل از بررسی بیوشیمیایی سرم: همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود مقایسه منیزیم سرم گروه‌های مختلف نشان داد که در روز ۲۸ غلظت این عنصر در سرم گروه‌های دوم تا چهارم کاهش یافته است اما غلظت منیزیم هیچ یک از این گروه‌ها در روز ۲۸ اختلاف معنی‌داری با گروه اول نشان نمی‌دهد ($p>0/05$). کاهش غلظت منزیم در روز ۲۸ در گروه‌های سوم و چهارم در مقایسه با روز صفر معنی‌دار ($p<0/05$) است. نتایج حاصل از مقایسه کلسیم سرم در گروه‌های مختلف در روزهای صفر و ۲۸ اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد (نتایج نشان داده نشده است).

جدول ۴. میانگین غلظت منیزیم سرم بر حسب mg/dl در رت‌های گروه‌های مورد آزمایش

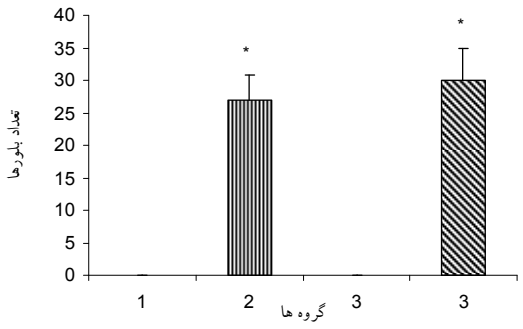
	روز صفر	روز ۲۸
گروه اول	۱/۸۶ ± ۰/۳۰	۲/۳۸ ± ۰/۱۴
گروه دوم	۲/۵۶ ± ۰/۲۴	۲/۲۱ ± ۰/۱۸
گروه سوم	۲/۶۴ ± ۰/۱۴	▪ ۱/۸۶ ± ۰/۲۲
گروه چهارم	۲/۹۲ ± ۰/۳۴	▪ ۱/۹۷ ± ۰/۱۶

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= ۷ و در سایر گروه ها n= ۸ می باشد.

▪ کاهش معنی دار میزان منیزیم سرم در مقایسه با روز صفر ($p<0/05$)

هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین میزان منیزیم سرم گروه‌های دوم تا چهارم با گروه اول وجود ندارد.

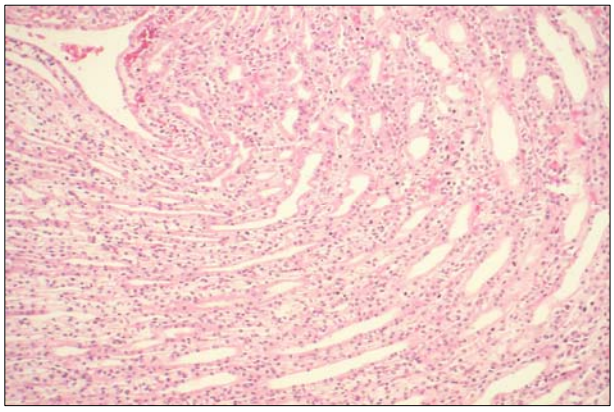
نتایج حاصل از بررسی پاتولوژیک کلیه: مقایسه تعداد تجمعات بلورهای اگزالات کلسیم در لوله‌های حاوی تجمعات اگزالات کلسیم که در ده میدان میکروسکوپی شمارش شدند. شکل ۱ نشان داد که تعداد بلورها در گروه‌های دوم و چهارم بطور معنی‌داری ($p<0/001$). بیش از گروه اول است. در گروه سوم در ده میدان شمارش شده هیچ‌گونه تجمع بلوری اگزالات کلسیم مشاهده نشد و تعداد تجمعات صفر می‌باشد. بررسی مقاطع میکروسکوپی گروه اول و سوم نشان داد که هیچ‌گونه بلوری در لوله‌های ادراری بافت کلیه رت‌های این دو گروه وجود نداشت. (شکل‌های ۲ تا ۴) بررسی وضعیت بلورها در گروه دوم نشان داد که تجمعات گسترده‌ای از بلورهای اگزالات کلسیم در تعداد زیاد و بخش‌های گوناگونی از لوله‌های ادراری مانند بخش پروگزیمال و دیستال، لوله هنله، لوله‌های جمع کننده و حتی در کالیس‌ها تشکیل شده بود (شکل ۵).



شکل ۱. تعداد بلورهای اگزالات کلسیم در ده میدان میکروسکوپی بافت کلیه رت‌های گروه‌های مورد آزمایش.

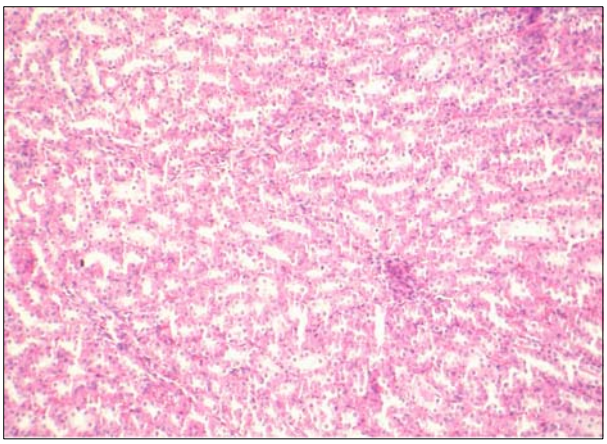
نمایش داده‌ها به صورت Mean±SEM بوده و بررسی آماری با استفاده از تست‌های one way ANOVA و Tukey انجام شد. تعداد رت‌های گروه اول n= ۷ و در سایر گروه ها n= ۸ می‌باشد.

* افزایش معنی‌دار تعداد بلورهای اگزالات کلسیم در مقایسه با گروه اول ($p<0/001$)

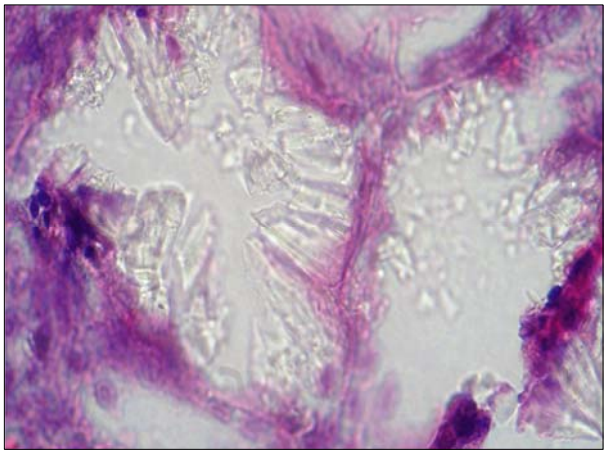


شکل ۲. کالیس و مجاری جمع کننده کلیه طبیعی (۱۰×۱۰)

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



شکل ۳. لوله‌های ادراری طبیعی (۱۰×۱۰)



شکل ۴. بلورهای اگزالات کلسیم در لوله‌های ادراری (۱۰۰×۱۰)

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 اتیل‌استات با دوز معادل ۲۵۰ 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 اصلا بلوری تشکیل نشد.

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 ۰/۴ 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 ($p > ۰/۰۵$) 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 اتیل‌استات 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

ریزاندن آن می‌شوند ولی از افزایش غلظت اگزالات ادرار که به دنبال مصرف اتیلن گلیکول ایجاد شده بود جلوگیری نمی‌کنند که این یافته‌ها با نتایج حاصل از این پژوهش هماهنگ است.

یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد که متعاقب مصرف اتیلن‌گلیکول غلظت سیترات ادرار تنها در گروه دوم به طور معنی‌داری (p<۰/۰۵) نسبت به گروه اول کاهش می‌یابد که این یافته‌ها نیز با مطالعات قبلی [۲۵] هماهنگ بوده و نشان دهنده دخالت هیپوسیتراتوری در تشکیل سنگ اگزالات کلسیم است. در مطالعه حاضر سیترات ادرار در گروه‌های تیمار شده با فراکسیون‌های عصاره تفاوت معنی‌داری با گروه اول ندارد و با توجه به اینکه در گروه دریافت کننده فراکسیون اتیل‌استات 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 نمی‌توان به این پارامتر نسبت داد. یافته‌های این پژوهش اختلاف معنی‌داری 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 اتیل‌استات نشان نمی‌دهد و لذا تاثیر فراکسیون باقی مانده در جلوگیری از تشکیل سنگ اگزالات کلسیم را به تغییرات کلسیم ادراری نیز نمی‌توان نسبت داد.

مقایسه میانگین غلظت منیزیم سرم بین گروه‌های مختلف نشان می‌دهد که در روز ۲۸ پس از شروع اتیلن‌گلیکول میانگین غلظت منیزیم و کلسیم سرم گروه‌های دریافت کننده اتیلن گلیکول سرم نسبت به گروه کنترل سالم تفاوت معنی‌داری ندارد (p>۰/۰۵) به همین دلیل می‌توان نتیجه گرفت که تیمار رت‌ها با اتیلن‌گلیکول و فراکسیون‌های اتیل استات عصاره ۵۰٪ الکلی آبی سیاه دانه تاثیری بر میزان منیزیم و کلسیم سرم ندارد. اگرچه منیزیم با کاهش جذب سیترات از لوله‌های کلیوی باعث افزایش دفع ادراری آن می‌گردد [۲۶] اما یافته‌های ما تغییرات یونی سرم را در طول تیمار با اتیلن‌گلیکول تایید نمی‌کند زیرا احتمالاً تاثیر فراکسیون‌های عصاره سیاه دانه در پیش‌گیری از سنگ اگزالات کلسیم ارتباطی با مکانیسم اثر منیزیم در مهار تشکیل بلورهای اگزالات کلسیم ندارد.

پژوهش‌های محققین نشان داده است که تیمار رت‌های مبتلا به هیپراگزالوری، هیپرکلسیوری، نفروکلسینوز کلسیم و سنگ کلیه با عصاره سیاه دانه باعث جلوگیری و رفع سنگ‌های کلیوی می‌شود به همین دلیل پژوهش‌گران 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 سل‌ها و مهار لیپواکسیژناز دارای اثرات ضد التهابی می‌باشد [۲۸]. لذا ممکن است بخشی از اثر سیاه دانه در جلوگیری و درمان سنگ‌های کلیوی که در این پژوهش دیده شد به علت اثرات ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی ترکیبات موجود در عصاره ۵۰٪ الکلی 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 می‌نماید. مطالعات جدید نشان داده است که سنگ‌های 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 پیش‌گیری و درمان سنگ کلیه بنحوی مرتبط با اثر آن در مهار عوامل عفونی باشد.

نتیجه گیری: یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر به وضوح نشان می‌دهد که فراکسیون باقی مانده اتیل استات بطور معنی‌داری مانع از تشکیل سنگ اگزالات کلسیم در کلیه رت می‌شود و لذا این فراکسیون می‌تواند بعنوان یک فراورده سیاه دانه برای پیش‌گیری از سنگ اگزالات کلسیم مد نظر قرار گیرد. تعیین مکانیسم دخیل در این اثرات نیازمند بررسی‌های بیش‌تر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به خاطر تامین 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,s 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.

[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, Bargy 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, Qualitaive and quantitative evaluation of the active coxstiuents and control methods for medicinal plants Mani press, first ed. 1992, 20-23(Persian).

[22] Narin Jamal. Solution, emulsions, suspensions and extracts. In: Remmgtons pharmaceutical sciences. 18th ed, Pennsylvania: Mack Publication; 1990. p.1543.

[23] Eftekhari M. The effect of timoquinone 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 ratUrol J. (in press).

[25] Chapple CR. Potassium-mangnesium 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 excetion. 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. Kiney Int 2005; 67: 53-60.

[28] El-Dakhakhny M, Madi NJ, Lembert 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 thymohydroquinines of morracan 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.

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± 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