

Original article

## Pretreatment with Chrysin Reduces Ifosfamide-Induced Acute Nephrotoxicity in Male Rats through Mitochondrial Protection

Ahmad Salimi\*<sup>1,2</sup>, Zhaleh Jamali<sup>3</sup>, Mohammad Shabani<sup>4</sup>, Deniz Bayrami<sup>4</sup>,  
Amin Ashena Moghadam<sup>4</sup>

1. Traditional Medicine and Hydrotherapy Research Center, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

2. Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

3. Social Determinants of Health Research Center, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

4. Students Research Committee, Faculty of Pharmacy, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

\*Corresponding author. Tel: +984533522437, Fax: + 984533522197, E-mail: [a.salimi@arums.ac.ir](mailto:a.salimi@arums.ac.ir)

### Article info

#### Article history:

Received: Dec 25, 2024

Accepted: Jan 25, 2025

#### Keywords:

Nephrotoxicity

Chrysin

Ifosfamide

### ABSTRACT

**Background:** Ifosfamide-induced kidney damage is an important toxicity in children and adults undergoing chemotherapy. Studies have previously demonstrated that toxic metabolites of ifosfamide, such as acrolein, are associated with depletion of antioxidants, oxidative stress, and mitochondrial impairment, which may predispose the kidney to ifosfamide toxicity. Plant-derived active compounds, such as chrysin, found in fruits and vegetables, are renowned for their antioxidant and mitochondrial protective effects against toxicity-related mitochondrial damage and oxidative stress.

**Methods:** In this work, the protective effects of chrysin on ifosfamide-induced nephrotoxicity in male Wistar rats were investigated using biochemical, histopathological, and mitochondrial approaches. The animals were randomly divided into four groups: control, ifosfamide, ifosfamide + chrysin, and chrysin groups. Chrysin (25 mg/kg, i.p. daily) was administered to rats for 2 consecutive days, and ifosfamide (500 mg/kg, i.p.) was administered on the third day.

**Results:** The data demonstrated that pretreatment with chrysin significantly increased mitochondrial succinate dehydrogenase activity and protected against mitochondrial swelling, mitochondrial membrane potential loss, reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and glutathione depletion ( $p < 0.001$ ). Histopathological results showed that chrysin had protective effects and reduced histopathological abnormalities caused by ifosfamide.

**Conclusion:** These observations confirmed that chrysin pretreatment protects the kidneys against mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and histopathological abnormalities induced by ifosfamide.

How to cite this article: Salimi A, Jamali Zh, Shabani M, Bayrami D, Ashena Moghadam A. Pretreatment with Chrysin Reduces Ifosfamide-Induced Acute Nephrotoxicity in Male Rats through Mitochondrial Protection. J Ardabil Univ Med Sci. 2024;24(3):265-282.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.

## Extended Abstract

**Background:** Ifosfamide, in combination with other chemotherapeutic agents, is used for the treatment of some refractory cancers in children and adults. Despite the effectiveness of ifosfamide, its structural similarity to cyclophosphamide leads to the production of active metabolites such as acrolein and chloroacetaldehyde, which can result in central nervous system (CNS) toxicity, cardiotoxicity, hepatotoxicity, and nephrotoxicity. One of the most common toxicities following treatment with ifosfamide is nephrotoxicity. Reports indicate that nephrotoxicity occurs with varying severity in patients treated with ifosfamide. The detailed mechanism of ifosfamide-related nephrotoxicity has not been fully elucidated, but it seems that the formation of active metabolites plays a significant role in inducing nephrotoxicity. The metabolites responsible for the toxicity of ifosfamide, such as acrolein and chloroacetaldehyde, can induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress, leading to inflammation, cell death, and tissue injury. A promising strategy to reduce nephrotoxicity is the use of antioxidants and mitochondrial protective agents that do not interfere with the therapeutic mechanisms of the drug. In recent years, several polyphenolic compounds, such as chrysin, have garnered attention as nephroprotective agents, particularly due to their antioxidant potential and mitochondrial protective effects. The antioxidant, anti-inflammatory, and mitochondrial protective effects of chrysin have been reported in various studies. Overall, previous studies suggest that chrysin deserves further investigation as a nephroprotective agent. Therefore, in the current study, we investigated a preventive strategy to reduce ifosfamide-induced nephrotoxicity through chrysin using mitochondrial, histopathological, and biochemical approaches in adult Wistar rats.

**Method:** For this purpose, we examined the injection of chrysin, as a polyphenolic compound, to reduce kidney toxicity induced

by ifosfamide in rats. The animals were randomly divided into four groups: control, ifosfamide (500 mg/kg, intraperitoneally), ifosfamide + chrysin (20 mg/kg per day for two consecutive days), and chrysin (20 mg/kg, per day for two consecutive days) alone. Chrysin was administered via intraperitoneal injection two days before exposure to ifosfamide. After four days, alterations in histopathology, biochemical markers, oxidative stress, and mitochondrial biomarkers were determined.

**Results:** Histological examination revealed that kidney sections from the control and chrysin-alone groups exhibited apparently normal morphology regarding tubules, glomeruli, and interstitial tissue. However, the histopathological evaluation of the kidneys from ifosfamide-treated animals showed severe renal damage, including vacuolar degeneration of tubules, cloudy swelling, interstitial hemorrhage, tubular casts, and moderate tubular necrosis, which were moderated by pretreatment with chrysin. In addition, ifosfamide treatment led to a significant increase in oxidative stress markers, such as GSH, GSSG, and MDA levels in kidney tissue, compared with the control group. Conversely, pretreatment with chrysin reduced oxidative stress markers and normalized these parameters. Moreover, mitochondrial toxicity parameters, such as mitochondrial succinate dehydrogenase (SDH) activity, reactive oxygen species (ROS) formation, mitochondrial swelling, and mitochondrial membrane potential collapse, were significantly ( $p < 0.01$ ) altered in animals exposed to ifosfamide compared with the control group. However, pretreatment with chrysin for two consecutive days significantly normalized mitochondrial toxicity parameters.

**Conclusion:** In summary, the current study demonstrates that chrysin can provide significant protective effects against ifosfamide-induced nephrotoxicity. Chrysin protected against the depletion of GSH and oxidative stress, as well as tissue damage and mitochondrial toxicity parameters. Our results support that pretreatment with chrysin before

ifosfamide administration may be effective for clinical purposes, due to the mechanism of action of ifosfamide and the anticancer properties of chrysin. The beneficial effect of chrysin against ifosfamide-induced nephrotoxicity warrants further investigation using cellular, animal, and clinical trial studies. This study suggests that chrysin has

the potential to protect against ifosfamide-induced mitochondrial toxicity and nephrotoxicity. It appears that this natural compound could be beneficial for medical applications as a nephroprotective agent with antioxidant and mitochondrial protective activities.

## پیش درمانی با کریسین سمیت کلیوی حاد ناشی از ایفوسگامید در رت‌های نر را از طریق محافظت میتوکندریایی کاهش می‌دهد

احمد سلیمی<sup>۱،۲\*</sup>، ژاله جمالی<sup>۳</sup>، محمد شعبانی<sup>۴</sup>، دنیز بایرامی<sup>۴</sup>، امین آشنا مقدم<sup>۴</sup>

۱. مرکز تحقیقات طب سنتی و آب درمانی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران  
۲. گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران  
۳. مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی موثر بر سلامت، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران  
۴. کمیته تحقیقات دانشجویان، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران  
\* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۵۳۳۵۲۲۴۳۷ فاکس: ۰۴۵۳۳۵۲۲۱۹۷ پست الکترونیک: a.salimi@arums.ac.ir

### چکیده

**زمینه و هدف:** آسیب کلیوی ناشی از ایفوسگامید یک سمیت مهم در کودکان و بزرگسالان تحت شیمی‌درمانی است. شواهد قبلی نشان می‌دهد که متابولیت‌های سمی ایفوسگامید مانند آکروئین با اختلال عملکرد میتوکندری، کاهش آنتی‌اکسیدان‌ها و استرس اکسیداتیو همراه هستند و ممکن است کلیه را مستعد سمیت به ایفوسگامید کنند. ترکیبات غذایی فعال زیستی مانند کریسین موجود در میوه‌ها به عنوان آنتی‌اکسیدان و عوامل محافظ میتوکندری در برابر آسیب میتوکندریایی مرتبط با سمیت و استرس اکسیداتیو توصیف شده‌اند.

**روش کار:** در مطالعه حاضر، اثرات محافظتی کریسین بر سمیت کلیوی ناشی از ایفوسگامید در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با روش‌های هیستوپاتولوژیک، بیوشیمیایی و میتوکندری مورد بررسی قرار گرفت. موش‌ها به طور تصادفی به چهار گروه کنترل، ایفوسگامید، کریسین + ایفوسگامید و کریسین تقسیم شدند. کریسین (۲۵ mg/kg، داخل صفاقی روزانه) به مدت ۲ روز متوالی و ایفوسگامید (۵۰۰ mg/kg، داخل صفاقی) در روز سوم به حیوانات داده شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان می‌دهد که پیش‌تیمار کریسین به طور قابل توجهی فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری را افزایش داد و از تورم میتوکندری، فروپاشی پتانسیل غشای میتوکندری، تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال، پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش گلوتاتیون محافظت می‌کند ( $p < 0.001$ ). یافته‌های هیستوپاتولوژیک نشان می‌دهد که کریسین اثرات محافظتی دارد و ناهنجاری‌های هیستوپاتولوژیک ناشی از ایفوسگامید را کاهش می‌دهد.

**نتیجه‌گیری:** این نتایج نشان داد که تجویز کریسین از کلیه‌ها در برابر اختلال عملکرد میتوکندری، استرس اکسیداتیو و ناهنجاری هیستوپاتولوژیک ناشی از ایفوسگامید محافظت می‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** سمیت کلیوی، کریسین، ایفوسگامید

پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۶

دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۵

می‌باشد [۱]. این دارو تقریباً در ترکیب با سایر عوامل شیمی‌درمانی برای درمان برخی از لنفوم‌های مقاوم، سارکوم و تومورهای بیضه، هم در کودکان و هم در

**مقدمه**  
ایفوسگامید یک عامل آلکیله‌کننده رایج در درمان سرطان است و متعلق به آنالوگ نیتروژن خردل

افراد بالغ، استفاده می‌شود [۱]. با وجود اثربخشی خوب ایفوسفامید در درمان سرطان‌های فوق، متأسفانه سمیت‌های مختلفی در کودکان و بزرگسالان پس از تجویز آن گزارش شده است [۲]. به دلیل شباهت ساختاری ایفوسفامید به سیکلوفسفامید و تولید متابولیت‌های فعال مانند آکروئین و کلرواستالدئید، احتمالاً باعث ایجاد سمیت سیستم عصبی مرکزی (CNS)، سمیت قلبی، سمیت کبدی و سمیت کلیوی می‌شود [۳]. یکی از شایع‌ترین مسمومیت‌ها پس از درمان با ایفوسفامید، سمیت کلیوی است. این اختلال حاد و همچنین مزمن کلیه با دامنه متوسط تا شدید در ۱۸ تا ۲۸ درصد از بیماران تحت درمان با ایفوسفامید گزارش شده است [۴]. سمیت کلیوی ناشی از ایفوسفامید عمدتاً با آسیب به توبول‌های کلیوی، سیستیت هموراژیک (به دلیل آسیب به اپیتلیوم مجاری ادراری)، گلیکوزوری در سطوح طبیعی گلوکز سرم، سندرم فانکونی (آسیب لوله پروگزیمال) همراه با هدر رفتن پتاسیم و فسفر ادرار، اسیدوز متابولیک (اسیدوز توبولار کلیه پروگزیمال) غیر آنیونی و آمینواسیدوری همراه است [۵]. مکانیسم سمیت عصبی مرتبط با ایفوسفامید به طور کامل مشخص نشده است، اما به نظر می‌رسد فعال شدن آن به متابولیت‌های سمی در آسیب‌القای کلیه توسط آن مهم باشد. گزارش شده است که این پیش‌دارو توسط خانواده سیتوکروم و CYP3A P450 3A، عمدتاً CYP3A4 و CYP3A5، به متابولیت‌های فعال خود متابولیزه می‌شود [۶]. این فرآیند منجر به هیدروکسیلاسیون ایفوسفامید و تولید متابولیت‌های درمانی و سمی فسفورامید خردل و آکروئین می‌شود [۶]. علیرغم مسیر فوق در متابولیسم ایفوسفامید، این دارو نیز به N-dechloroethylation سم‌زدایی می‌شود و 2-DCE (dechloroethylifosfamide) و 3-DCE (dechloroethylifosfamide) را ایجاد می‌کند. تولید 2-DCE و 3-DCE مقادیر مساوی

کلرواستالدئید را تولید می‌کند [۶]. متابولیت‌های مسئول سمیت ایفوسفامید عبارتند از آکروئین، کلرواستالدئید و خود متابولیت درمانی، فسفورامید خردل. خردل فسفورامید تولید شده، پس از فعال‌سازی متابولیک، در سلول‌های سرطانی و طبیعی، آلکیل می‌شود یا با بسیاری از ساختارهای مولکولی درون‌سلولی متصل می‌شود [۷]. علاوه بر این، آکروئین و کلرواستالدئید به عنوان متابولیت‌های سمی اصلی ایفوسفامید می‌توانند باعث اختلال عملکرد میتوکندری و استرس اکسیداتیو شوند [۸]. آسیب میتوکندری و استرس اکسیداتیو در کلیه‌ها با التهاب، مرگ سلولی از طریق نکروز/آپوپتوز و آسیب بافت مرتبط است [۹، ۱۰]. بنابراین، به نظر می‌رسد یک استراتژی امیدوارکننده برای کاهش سمیت ایفوسفامید، به ویژه سمیت کلیوی، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها و عوامل محافظ میتوکندری بدون تداخل با مکانیسم درمانی دارو باشد.

مطالعات گزارش کرده‌اند که ترکیبات پلی‌فنلی موجود در رژیم غذایی می‌تواند آسیب‌های کلیوی را تعدیل کند [۱۱]. این مطالعات نشان داده‌اند که رژیم غذایی غنی از غلات، میوه‌ها و سبزیجات با بروز کمتر بیماری‌های کلیوی مرتبط است [۱۱]. در سال‌های اخیر، چندین ترکیب پلی‌فنلی مانند کریسین به عنوان عوامل محافظت‌کننده کلیه، به ویژه به دلیل پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و اثرات محافظتی میتوکندریایی، مورد توجه قرار گرفته‌اند [۱۲]. کریسین یک فلاونوئید طبیعی با خواص ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی است. گزارش شده است که کریسین می‌تواند پاسخ التهابی و آسیب اکسیداتیو ناشی از ایندومتاسین را بهبود بخشد و رشد تومور ملانوم موش را سرکوب می‌کند [۱۳، ۱۴]. علاوه بر این، کریسین آسیب کانونی مغزی را در موش کاهش می‌دهد [۱۵]. در درمان فیروز کلیه، کریسین اثرات فارماکولوژیک بسیار خوبی از خود نشان داده است. گزارش شده است که کریسین با مهار استرس

MOPS<sup>۱</sup>. Ellman's reagent. Sucrose  
 .TRIS<sup>۱۱</sup>. MTT<sup>۱۰</sup>. Monopotassium phosphate  
 .Potassium chloride. Sodium succinate  
 Magnesium chloride. همگی از شرکت سیگما<sup>۱۲</sup>، از  
 بازارهای محلی تهیه شدند. ایفوسگامید با خلوص ۹۹  
 درصد از داروخانه آموزشی ۲۲ بهمن دانشگاه علوم  
 پزشکی (اردبیل، ایران) تهیه شد. پیش از  
 استفاده، کریسین در دی‌متیل سولفوکسید  
 (DMSO) با غلظت نهایی ۰٫۰۵ درصد حل شد.

#### بافرهای مورد استفاده

بافرهای ایزولاسیون و سنجش پارامترهای سمیت  
 میتوکندریایی عبارتند از: بافر ایزولاسیون (۷۵ mM  
 D-mannitol, sucrose 225 mM و ۰٫۲ mM  
 EDTA. pH 7.4)، بافر تنفسی (۵۰ mM EGTA،  
 0.5 mM sucrose، 10 mM Tris، 0.32 mM  
 MgCl<sub>2</sub>، 0.1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>،  
 5 mM sodium succinate، 20 mM MOPS،  
 10 μM H<sub>2</sub>DCF)، بافر سنجش  
 فروپاشی پتانسیل غشاء میتوکندری (۵ mM  
 D-mannitol، 68 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>،  
 2 μM sucrose، 2 mM MgCl<sub>2</sub>، 10 mM HEPES،  
 5 mM sodium، 50 μM EGTA، rotenone،  
 5 μM rhodamine 123، 10 mM KCl، succinate،  
 بافر تورم (۲۰ mM HEPES، 0.5 mmol/L،  
 10 mmol/L NaCl، 10 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>،  
 140 mmol/L KC، 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>، EGTA،  
 ۱۰ mmol/L succinate، 1 mg/ml rotenone).

#### حیوانات

در مجموع ۲۴ موش صحرایی نر ویستار با سن ۸  
 هفته و وزن ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم از انستیتو پاستور ایران  
 (تهران، ایران) تهیه شد. موش‌ها به مدت دو هفته در  
 خانه حیوانات دانشکده داروسازی دانشگاه علوم

اکسیداتیو، تنظیم عوامل التهابی و آپوپتوز، اثر  
 محافظتی بر کلیه‌ها اعمال می‌کند [۱۷، ۱۶]. علی و  
 همکاران دریافتند که کریسین بیماری مزمن کلیوی را  
 در مدل‌های موش درمان می‌کند و به‌طور  
 قابل توجهی اثرات نامطلوب موش‌ها را پس از القای  
 آدنین بهبود می‌بخشد [۱۸]. لی و همکاران گزارش  
 دادند که کریسین از تجمع سلول‌های شبه  
 میوفیبروبلاست و پروتئین‌های ماتریکس در گلومرول  
 دیابت غنی از AGEs<sup>۱</sup> جلوگیری می‌کند [۱۷]. روهان  
 و همکاران گزارش دادند که کریسین با مهار TGF-  
 از نارسایی کلیوی و فیروز بینابینی کلیه جلوگیری  
 می‌کند [۱۹]. همچنین، کریسین با تنظیم متابولیسم  
 لیپید با واسطه AMPK<sup>۳</sup>، نفروپاتی دیابتی را بهبود  
 می‌بخشد [۲۰]. این شواهد نشان می‌دهد که کریسین  
 ممکن است دارویی مؤثر برای پیشگیری از آسیب‌های  
 کلیوی باشد. به‌طور کلی، مطالعات فوق نشان می‌دهد  
 که کریسین به‌عنوان یک عامل محافظت‌کننده کلیه،  
 شایسته مطالعات بیشتر است. برای این منظور، در  
 مطالعه حاضر، ما یک استراتژی پیشگیرانه برای کاهش  
 سمیت کلیوی ناشی از ایفوسگامید توسط کریسین با  
 رویکردهای میتوکندریایی، هیستوپاتولوژیک و  
 بیوشیمیایی در موش‌های صحرایی بالغ ویستار بررسی  
 کردیم.

#### روش کار

##### ترکیبات شیمیایی

ترکیبات شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه، نظیر  
 BSA<sup>۵</sup>، Chrysin، DCFH-DA<sup>۴</sup>، Rhodamine 123  
 D-mannitol، HBSS<sup>۸</sup>، DMSO<sup>۷</sup>، HEPES<sup>۶</sup>

<sup>۱</sup> Advanced Glycation End-Products

<sup>۲</sup> Transforming Growth Factor Beta

<sup>۳</sup> AMP-Activated Protein Kinase

<sup>۴</sup> Diacetyldichlorofluorescein

<sup>۵</sup> Bovine Serum Albumin

<sup>۶</sup> N-(2-hydroxyethyl) Piperazine-N'-(2-Ethanesulfonic Acid)

<sup>۷</sup> Dimethyl Sulfoxide

<sup>۸</sup> Hank's Balanced Salt Solution

<sup>۹</sup> 3-morpholinopropane-1-Sulfonic Acid

<sup>۱۰</sup> 4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

<sup>۱۱</sup> 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

<sup>۱۲</sup> Sigma

فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند. به‌طور خلاصه، با استفاده از غلظت‌های صعودی الکل، نمونه‌های بافت آب‌گیری شدند و برای حذف الکل از زایلین استفاده شد. نمونه‌های بافت در پارافین قرار داده شدند و اجازه داده شد تا سفت شوند. سپس، بلوک‌های پارافینی توسط میکروتوم به بخش‌های ۵ میکرومتری بریده شدند و در حمام آب شناور شدند. پس از آن، برش‌ها بر روی لام‌های میکروسکوپی سوار شده و در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. سپس، برش‌ها با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند و با استفاده از میکروسکوپ نوری، بررسی بافت‌شناسی انجام شد. شدت ضایعات پاتولوژیک به شرح زیر تعیین شد: نمره «-» = نرمال؛ امتیاز «+» = خفیف؛ امتیاز «++» = متوسط؛ نمره «+++» = شدید [۲۱].

#### ارزیابی پراکسیداسیون لیپیدی در نمونه‌های بافت کلیه

اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدهید (MDA) به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی با استفاده از روش TBARS انجام گرفت. به‌طور خلاصه، ۱۰۰ میلی‌گرم بافت کلیه توسط یک هموژنایزر شیشه‌ای در ۱ میلی‌لیتر ۱/۰ درصد تری‌کلرواستیک اسید (TCA) همگن شد. هموژنات در  $10000 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی به‌دست آمده در ۴ میلی‌لیتر اسید تیوباربیتوریک ۵/۰ درصد (TBA) و ۲۰ درصد TCA قرار داده شد. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند و پس از سانتریفیوژ در  $10000 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه، جذب در طول موج ۵۳۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار MDA بافت کلیه به‌صورت درصدی از گروه کنترل ارائه شده است [۲۱].

**ارزیابی میزان گلوکوتایون احیا در نمونه‌های بافت کلیه**  
غلظت گلوکوتایون احیا شده (GSH) در بافت کلیه به‌عنوان نشانگر اکسیداتیو اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، ۱۰۰ میلی‌گرم بافت کلیه توسط یک

پزشکی اردبیل جهت سازگاری با محیط، در قفس‌های پلی‌کربنات با سیکل نور/ تاریکی ۱۲ ساعته، دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت  $50 \pm 20$  درصد نگهداری شدند. حیوانات به رژیم غذایی استاندارد و آب دسترسی آزاد داشتند. پروتکل‌های مورد استفاده در این مطالعه به تأیید کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل (شماره IR.ARUMS.AEC.1400.027) رسید.

#### طراحی مطالعه

دوزهای تجویز کریسین و ایفوسفامید بر اساس مطالعات قبلی انتخاب شدند [۲۱، ۲۲]. موش‌های صحرایی نر ویستار به‌طور تصادفی به ۴ گروه (۶ تایی) به شرح زیر تقسیم شدند:

- گروه I (شاهد): حیوانات به مدت ۳ روز نرمال سالین داخل صفاقی دریافت کردند.

- گروه II (ایفوسفامید): حیوانات ایفوسفامید (۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) را در روز سوم مطالعه دریافت کردند.

- گروه III (کریسین + ایفوسفامید): حیوانات کریسین (۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) را برای ۲ روز متوالی دریافت کردند و در روز سوم، ایفوسفامید (۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) به‌صورت تک دوز به آن‌ها تزریق شد.

- گروه IV (کریسین): حیوانات کریسین (۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) را برای ۲ روز متوالی دریافت کردند.

در روز چهارم، ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق، موش‌ها با استفاده از مخلوط کتامین (۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش شدند. نمونه‌های خون و کلیه‌ها برای انجام بررسی‌های بیوشیمیایی، میتوکندریایی و هیستوپاتولوژیک جمع‌آوری شدند.

#### ارزیابی تغییرات هیستوپاتولوژیک در بافت کلیه

۲۴ ساعت پس از آخرین تجویز، کلیه‌ها ( $n=2$ ) از همه گروه‌ها به‌طور همزمان برداشت و بلافاصله در

هموژنایزر شیشه‌ای در ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات همگن شد و در  $10000 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی به‌دست‌آمده جمع‌آوری و برای تشخیص GSH مورد استفاده قرار گرفت. برای اندازه‌گیری GSH، ۱۰۰ میکرولیتر مایع رویی با ۳ میلی‌لیتر محلول واکنش (حاوی GSH ردوکتاز، ۱ میلی‌مولار EDTA، ۱۵۰ میکرومولار NADPH، ۳ میلی‌مولار  $MgCl_2$ ، ۵۰۰ میلی‌مولار Tris-HCl و ۱۰ میلی‌مولار DTNB) مخلوط شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و جذب مخلوط در طول موج ۴۱۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار GSH بافت کلیه به‌صورت درصدی از گروه کنترل ارائه شده است [۲۱].

میتوکنندری استفاده شد. میتوکنندری‌های جدا شده از کلیه در بافر سنجش میتوکنندری قرار داده شدند. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از میتوکنندری جداشده (با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و ۲۵ میکرولیتر از محلول رنگ MTT (با غلظت ۵/۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک از صفحه ۹۶ چاهی اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. پس از انکوباسیون، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد تا بلورهای فورمازان حل شوند. جذب با استفاده از ELISA Reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [۲۴].

#### ارزیابی تورم میتوکنندری در میتوکنندری‌های جداشده از کلیه

تورم میتوکنندری به‌طور گسترده‌ای در سوسپانسیون میتوکنندری‌های جدا شده با اندازه‌گیری پراکندگی نور در ۵۴۰ نانومتر انجام شد. کاهش جذب در ۵۴۰ نانومتر نشان‌دهنده تورم میتوکنندری و باز شدن منافذ انتقال نفوذپذیری میتوکنندری (MPT) است [۲۵]. میتوکنندری‌های جدا شده از کلیه در بافر تورم میتوکنندری به میزان ۱۰۰ میکرولیتر میتوکنندری جدا شده (۱۰۰ میکروگرم در چاهک) به صفحات ۹۶ چاهی اضافه شد و میزان جذب در ۱۰ دقیقه در ۵۴۰ نانومتر قرائت شد.

#### ارزیابی فروپاشی پتانسیل غشای میتوکنندری در میتوکنندری‌های جدا شده از کلیه

فروپاشی پتانسیل غشای میتوکنندری با سنجش رنگ فلورسانس رودامین ۱۲۳ و با استفاده از فلوسیتومتری ارزیابی شد. یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئین میتوکنندری در بافر فروپاشی پتانسیل غشای میتوکنندری معلق شد. میتوکنندری‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و شدت رنگ رودامین ۱۲۳ توسط فلوسایتومتری (Cytofluor Space- Partec، آلمان) در کانال FL-1 برای ۲۰ هزار ذره اندازه‌گیری شد. نتایج به صورت شدت رنگ فلورسانس رودامین ۱۲۳، به عنوان

#### جداسازی میتوکنندری از بافت کلیه جهت سنجش پارامترهای سمیت میتوکنندریایی

به‌طور خلاصه، بعد از برداشتن کلیه، بافت کلیه از خون، چربی و بافت همبند پاکسازی شد و با محلول نرمال سالین (۴ درجه سانتی‌گراد) شستشو داده شد. کل بافت کلیه برش داده شد، خرد شد و با هموژنایزر شیشه‌ای در بافر ایزوله همگن شد. بافت هموژن شده در  $10000 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی به‌دست‌آمده در  $10000 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. تمام مراحل روی یخ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. ته‌نشین حاوی میتوکنندری روی یخ نگه‌داشته شد و در عرض ۴ ساعت برای اندازه‌گیری پارامترهای سمیت میتوکنندری استفاده شد [۲۳]. جهت استاندارد کردن میزان میتوکنندری در نمونه، از تعیین غلظت پروتئین میتوکنندری به روش برادفورد با آلبومین سرم گاوی (BSA) به‌عنوان استاندارد استفاده شد.

#### ارزیابی فعالیت سوکسینات دهیدروژناز میتوکنندری در میتوکنندری‌های جدا شده از کلیه

از رنگ MTT برای اندازه‌گیری فعالیت سوکسینات دهیدروژناز میتوکنندری به‌عنوان تست عملکرد



### یافته‌ها

#### اثر کریسین بر ناهنجاری‌های هیستوپاتولوژیک ناشی از ایفوسفامید

تمام مقاطع رنگ‌آمیزی H&E از گروه‌های آزمایشی مختلف مورد ارزیابی بافت‌شناسی قرار گرفتند. برش‌های کلیه از گروه کنترل، مورفولوژی ظاهراً طبیعی را در رابطه با توبول‌ها، گلمرول‌ها و بافت بینابینی نشان دادند. همچنین، برش‌های کلیه گروه کریسین هیچ ناهنجاری هیستوپاتولوژیک قابل توجهی را نشان نداد. با این حال، ارزیابی هیستوپاتولوژیک کلیه حیوانات تحت درمان با ایفوسفامید، آسیب شدید کلیوی مانند دژنراسیون واکوئولی لوله‌ها، تورم، خونریزی بینابینی و نکروز متوسط را نشان داد. در گروه کریسین + ایفوسفامید، شدت ناهنجاری‌های هیستوپاتولوژیک ناشی از ایفوسفامید که در بالا ذکر شد، در مقایسه با گروه ایفوسفامید کاهش یافت (شکل ۱ و جدول ۱).

#### اثر کریسین بر نشانگرهای استرس اکسیداتیو ناشی از ایفوسفامید

درمان ایفوسفامید منجر به افزایش قابل توجهی در نشانگرهای استرس اکسیداتیو مانند سطوح GSH و MDA در بافت کلیه در مقایسه با گروه کنترل شد ( $p < 0.001$ ). با این حال، پیش‌تیمار کریسین در گروه کریسین + ایفوسفامید، نشانگرهای استرس اکسیداتیو را کاهش داد ( $p < 0.001$ ) و این نشانگرها را در مقایسه با گروه ایفوسفامید نرمال کرد. درمان حیوانات با کریسین باعث ایجاد تغییرات در نشانگرهای استرس اکسیداتیو، در مقایسه با گروه کنترل (نرمال سالین) نشد (شکل ۲).

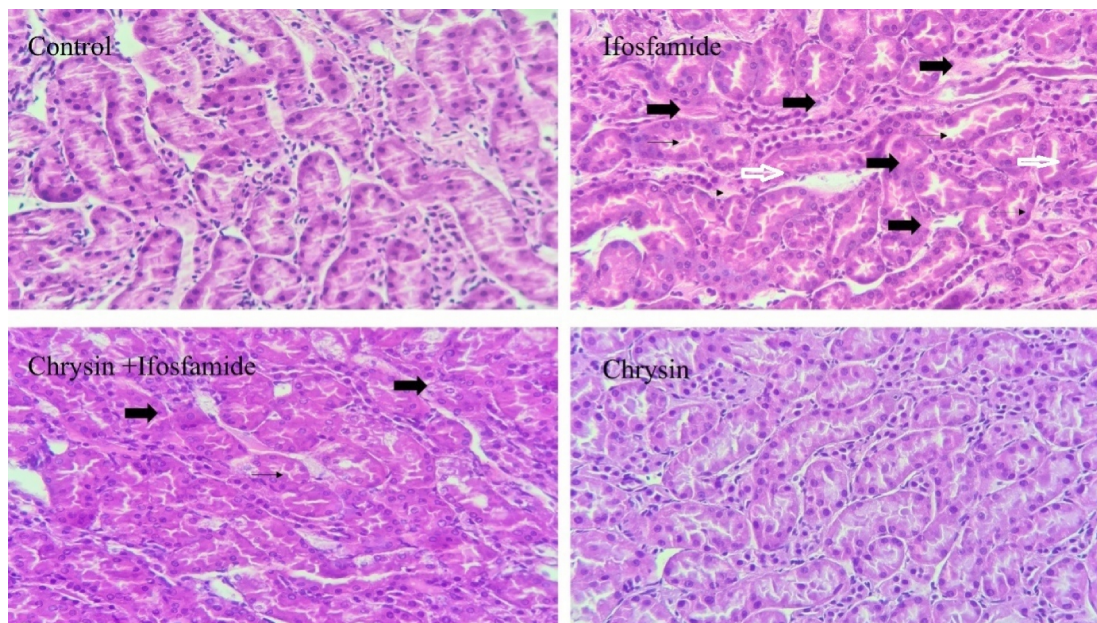
انعکاسی از تغییرات پتانسیل غشای میتوکندری، ارائه شده است [۲۱].

#### ارزیابی تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن در میتوکندری‌های جدا شده از کلیه

تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن در میتوکندری‌های ایزوله شده از کلیه با استفاده از رنگ H2DCF و فلوسایتومتری در کانال FL-1 ارزیابی شد. یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئین میتوکندری در بافر تنفسی به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی برای هر گروه انکوبه شد. شدت فلورسانس H2DCF برای ۲۰ هزار ذره در کانال FL-1 با استفاده از فلوسایتومتری (Cyflow Space-Partec، آلمان) اندازه‌گیری شد. نتایج به صورت شدت رنگ DCF، به عنوان انعکاسی از تغییرات پتانسیل غشای میتوکندری، ارائه شده است [۲۱].

#### تجزیه و تحلیل آماری

تمام نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین (SEM) ارائه شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری با واریانس یک‌طرفه و به دنبال آن آزمون توکی، با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism-9.0 (نرم‌افزار GraphPad، سن دیگو، کالیفرنیا، ایالات متحده آمریکا) برای ویندوز انجام شد. مقدار  $p < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌داری انتخاب شد.

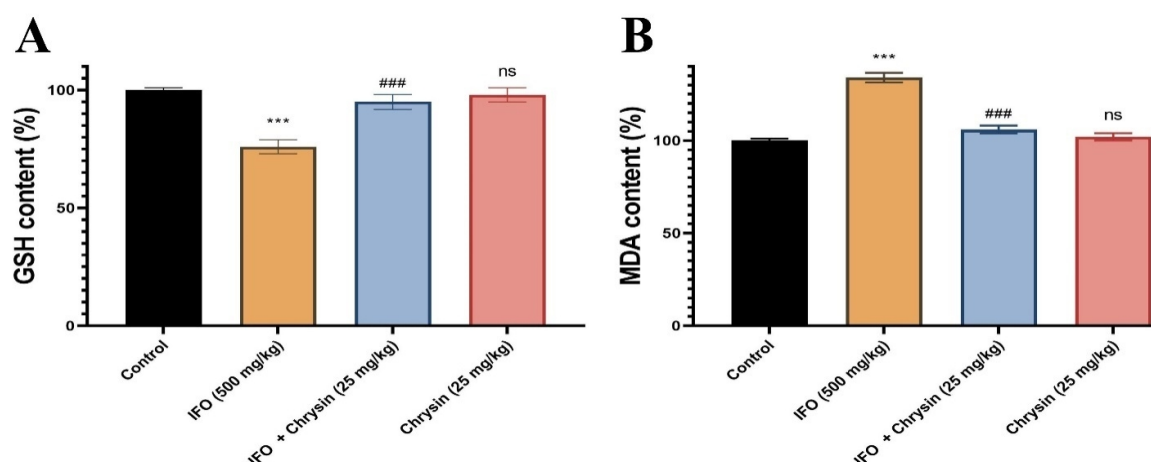


شکل ۱. بخش هیستوپاتولوژیک کلیه ها از گروه های تجربی مختلف. فلش های سیاه ضخیم = دژنراسیون واکوتولی لوله ها. فلش های نازک = خونریزی بینابینی؛ فلش های سفید = نکروز لوله ای. (الف) نمای عادی از گروه کنترل. (ب) ایفوسفامید باعث دژنراسیون واکوتولی توبول ها، تورم، خونریزی بینابینی و نکروز توبولی متوسط در بافت کلیه می شود. (ج) ظاهر میکروسکوپی گروه کریسین + ایفوسفامید در بافت کلیه. (د) ظاهر میکروسکوپی گروه کریسین در بافت کلیه. H&E 400، n=2

جدول ۱. امتیازدهی میکروسکوپی بافت کلیه، اثرات محافظتی کریسین در برابر آسیبهای هیستوپاتولوژیک ناشی از ایفوسفامید در کلیه موش صحرایی

پارامترها	کنترل	ایفوسفامید	ایفوسفامید + کریسین	کریسین
دژنراسیون واکوتولی لوله ها	-	++	+	-
تورم	-	+++	+	-
خونریزی بینابینی	-	++	+	-
نکروز	-	++	+	-

امتیازات: -، عادی؛ +، خفیف؛ ++، متوسط؛ +++، شدید.



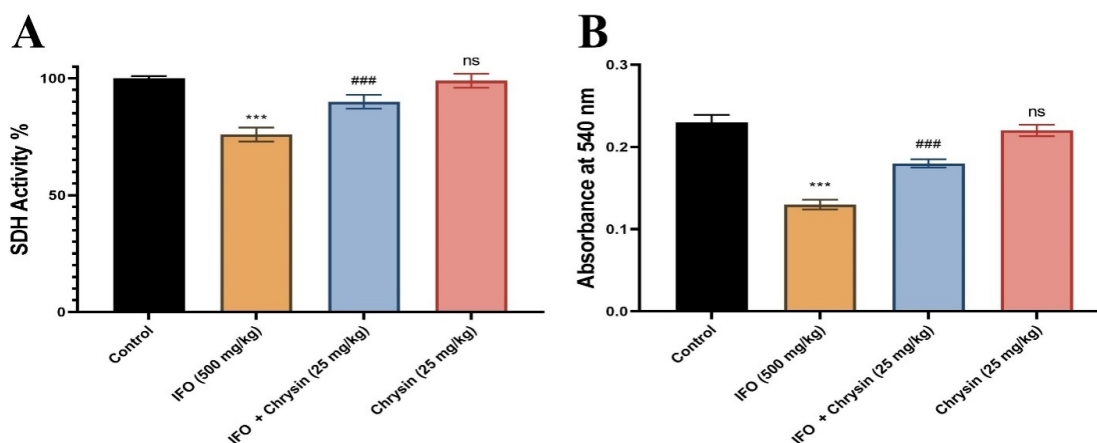
شکل ۲. تأثیر پیش درمان کریسین بر میزان GSH (A) و MDA (B) در موش های صحرایی مواجهه یافته با ایفوسفامید. \*\*\* نشان دهنده تفاوت معنی داری در رابطه با گروه کنترل است (P < 0.001). ### نشان دهنده تفاوت معنی داری در رابطه با گروه ایفوسفامید (P < 0.001). نتایج به صورت میانگین ± SEM گزارش شده است و با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون مقایسه چندگانه توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (n=4). IFO، ایفوسفامید؛ SEM، خطای استاندارد میانگین؛ MDA، مالون دی آلدئید؛ GSH، گلووتاتیون؛ ns، non-significant

### اثر کریسین بر اختلال عملکرد میتوکندری ناشی از ایفوسگامید

همان‌طور که در شکل A<sup>۳</sup> نشان داده شده است، فعالیت SDH میتوکندری به عنوان شاخص تست عملکرد میتوکندری در حیواناتی که در معرض ایفوسگامید قرار گرفته بودند، در مقایسه با گروه کنترل در میتوکندری‌های جدا شده از بافت کلیه موش صحرایی به طور قابل توجهی کاهش یافت ( $p < 0.001$ ). پیش‌تیمار کریسین برای دو روز متوالی به طور قابل توجهی فعالیت میتوکندری SDH را افزایش داد ( $p < 0.001$ ). بین فعالیت SDH میتوکندری گروه کریسین و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

### اثر کریسین بر اختلال عملکرد میتوکندری ناشی از ایفوسگامید

اطلاعات مربوط به وضعیت تورم میتوکندری در میتوکندری‌های جدا شده به دست آمده از بافت کلیه موش در شکل B<sup>۳</sup> نشان داده شده است. تورم میتوکندری در موش‌های صحرایی در معرض ایفوسگامید در مقایسه با گروه کنترل به ۱.۵ برابر افزایش یافت ( $p < 0.001$ ). در حالی که در گروه کریسین + ایفوسگامید، کریسین به طور قابل توجهی ( $p < 0.001$ ) تورم میتوکندری ناشی از ایفوسگامید را کاهش داد ( $p < 0.001$ ). موش‌هایی که ایفوسگامید به تنهایی برای دو روز متوالی دریافت کردند، در مقایسه با گروه کنترل، تغییر قابل توجهی در وضعیت تورم میتوکندری میتوکندری‌های جدا شده از بافت کلیه نشان دادند.



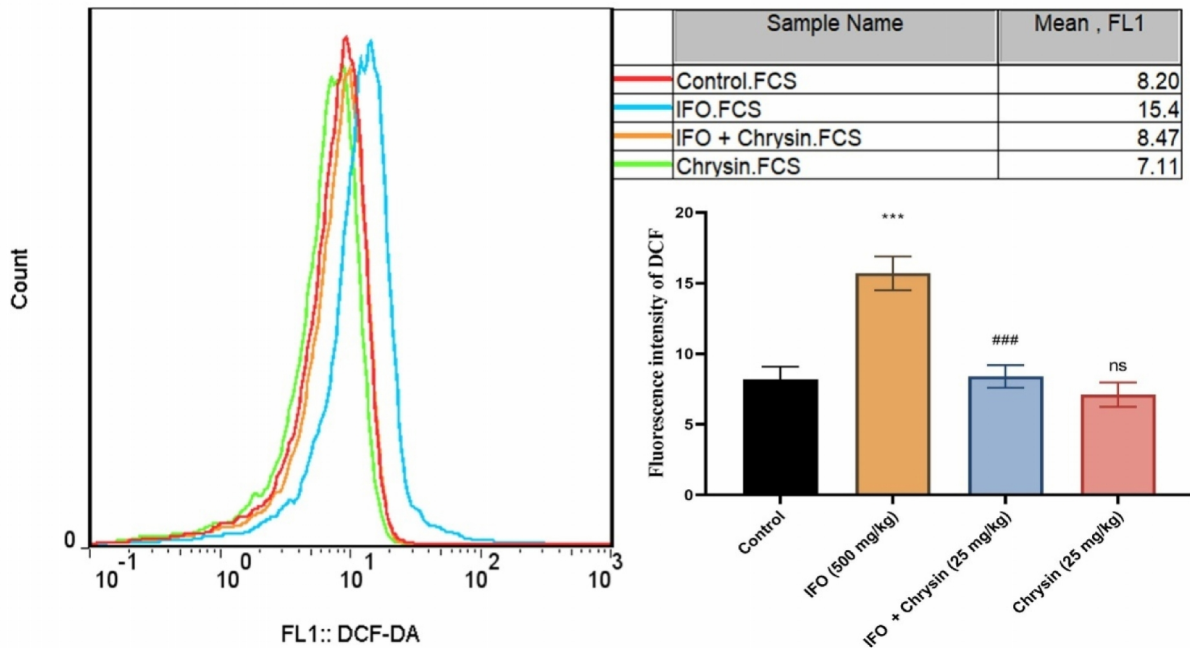
شکل ۳. تأثیر پیش‌درمان کریسین بر میزان SDH (A) و تورم میتوکندریایی (B) در موش‌های صحرایی مواجهه یافته با ایفوسگامید. \*\*\* نشان دهنده تفاوت معنی‌داری در رابطه با گروه کنترل است ( $P < 0.001$ ). ### نشان دهنده تفاوت معنی‌داری در رابطه با گروه ایفوسگامید ( $P < 0.001$ ). نتایج به صورت میانگین  $\pm$  SEM گزارش شده است و با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون مقایسه چندگانه توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند ( $n=4$ ). IFO، ایفوسگامید؛ SDH، سوکسینات دهیدروژناز؛ SEM، خطای استاندارد میانگین؛ ns، non-significant

### اثر کریسین بر تشکیل ROS میتوکندری ناشی از ایفوسگامید

اثر کریسین بر تشکیل ROS میتوکندری ناشی از ایفوسگامید در میتوکندری‌های جدا شده از بافت کلیه موش صحرایی، در شکل E نشان داده شده است. افزایش قابل توجهی در میانگین شدت فلورسانس DCF، به عنوان بازتاب تشکیل ROS، در گروه

ایفوسگامید در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد ( $p < 0.001$ ). در حالی که تیمار با کریسین در گروه کریسین + ایفوسگامید، به طور قابل توجهی میانگین شدت فلورسانس DCF را کاهش داد ( $p < 0.001$ ). موش‌هایی که کریسین به تنهایی برای دو روز متوالی دریافت کردند، در مقایسه با گروه کنترل، تغییر

معنی‌داری در میانگین شدت فلورسانس DCF مشاهده نشد.

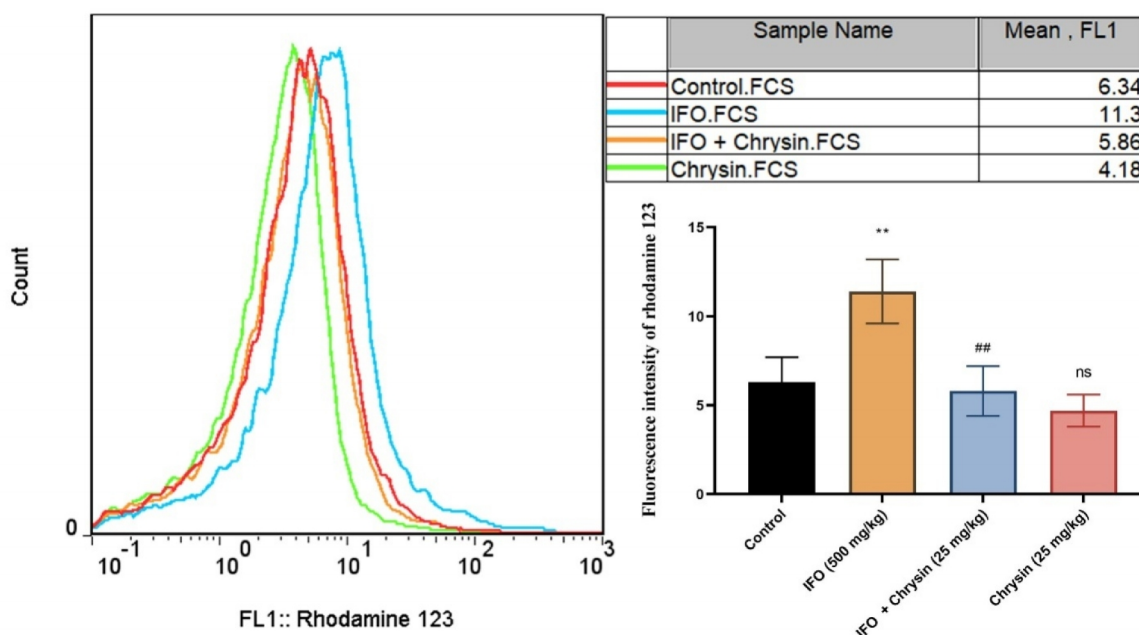


شکل ۵. تأثیر پیش درمان کریسین بر میزان ROS میتوکندریایی در موش‌های صحرایی مواجهه یافته با ایفوسفامید. تغییرات میانگین شدت فلورسانس رنگ DCF به عنوان بازتاب تشکیل ROS در میتوکندری‌های جدا شده به دست آمده از بافت کلیه موش صحرایی، در بین گروه‌ها مختلف مقایسه شد. \*\*\* نشان دهنده تفاوت معنی‌داری در رابطه با گروه کنترل است ( $P < 0.001$ ). ### نشان دهنده تفاوت معنی‌داری در رابطه با گروه ایفوسفامید ( $P < 0.001$ ). نتایج به صورت میانگین  $\pm$  SEM گزارش شده است و با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون مقایسه چندگانه توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (n=4). IFO، ایفوسفامید؛ SEM، خطای استاندارد میانگین؛ ROS، گونه‌های فعال اکسیژن؛ DCF، دی کلروفورسئین؛ ns، non-significant.

رودامین ۱۲۳ را، به عنوان بازتاب فروپاشی پتانسیل غشای میتوکندریایی، کاهش داد ( $p < 0.01$ ). موش‌هایی که کریسین به تنهایی برای دو روز متوالی دریافت کردند، در مقایسه با گروه کنترل، تغییر معنی‌داری در میانگین شدت فلورسانس رودامین ۱۲۳ مشاهده نشد.

### اثر کریسین بر فروپاشی پتانسیل غشای میتوکندری ناشی از ایفوسفامید

قرار گرفتن در معرض ایفوسفامید در گروه ایفوسفامید، منجر به افزایش قابل توجهی در میانگین شدت فلورسانس رنگ رودامین ۱۲۳ و جابجایی هیستوگرام از چپ به راست شد ( $p < 0.01$ ) (شکل ۵). پیش‌درمان با کریسین در گروه کریسین + ایفوسفامید، به طور قابل توجهی میانگین شدت فلورسانس



شکل ۵. تأثیر پیش درمان کریسین بر میزان فروپاشی پتانسیل غشای میتوکندریایی در موش‌های صحرایی مواجهه یافته با ایفوسفامید. تغییرات میانگین شدت فلورسانس رنگ رودامین ۱۲۳ به عنوان بازتاب فروپاشی پتانسیل غشای میتوکندریایی در میتوکندری های جدا شده به دست آمده از بافت کلیه موش صحرایی، در بین گروه‌ها مقایسه شد. \*\* نشان دهنده تفاوت معنی داری در رابطه با گروه کنترل است ( $P < 0.01$ ). ## نشان دهنده تفاوت معنی داری در رابطه با گروه ایفوسفامید ( $P < 0.01$ ). نتایج به صورت میانگین  $\pm$  SEM گزارش شده است و با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون مقایسه چندگانه توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند ( $n=4$ ). IFO، ایفوسفامید؛ SEM، خطای استاندارد میانگین؛ ns، non-significant

### بحث

دارد. در توبول، بخش پروگزیمال بیشترین تعداد میتوکندری را دارد، زیرا محل ترشح و بازجذب مواد مختلف است. علاوه بر این، سلول‌های لوله‌ای پروگزیمال دارای یک سری انتقال‌دهنده املح چندگانه هستند که در انتقال داروها از خون اطراف توبول‌ها به ادرار یا برعکس نقش دارند [۲۹]. بنابراین، اثرات سمی بر روی میتوکندری کلیه می‌تواند منجر به تغییر در عملکرد میتوکندری، کاهش تولید انرژی، افزایش تشکیل آسیب سلولی مضر نظیر استرس اکسیداتیو و مرگ بافت شود. در مطالعات تجربی و بالینی مختلف نشان داده شده است که داروها می‌توانند آسیب حاد کلیه<sup>۱</sup>، آسیب مزمن کلیه<sup>۲</sup>، سمیت کلیوی و آسیب‌های کلیوی را از طریق تغییرات عملکرد میتوکندری ایجاد کنند [۳۰، ۳۲]. اثرات سمی داروها و مواد شیمیایی با افزایش تولید رادیکال‌های

گزارش شده است که میتوکندری‌ها نقش مهمی در پاتوژنز بیماری کلیوی و سمیت کلیوی ناشی از مواد شیمیایی و داروها ایفا می‌کنند [۲۶]. به دلیل عملکردهایی مانند فیلتراسیون و بازجذب، سلول‌های کلیوی یکی از سلول‌های با نیاز زیاد به انرژی هستند و به میتوکندری خود برای تولید انرژی از طریق فسفوریلاسیون اکسیداتیو وابستگی جدی دارند [۲۷]. در کلیه‌ها، میتوکندری‌ها فعالیت‌های حیاتی برای بقای سلول‌های کلیوی، مانند کاتابولیسم اسیدهای آمینه شاخه‌دار، گلوتامینولیز، مدیریت محصولات جانبی متابولیک، بیوسنتز نوکلئوتید، بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب، تعادل ردوکس، متابولیسم هم، هموستاز کلسیم، تنظیم مرگ سلولی و غیره را انجام می‌دهند [۲۸]. در سلول کلیه، به‌ویژه در سلول‌های توبول، برای حفظ فعالیت گرادیان‌های الکتروشیمیایی و پمپ‌های ATPase، تعداد زیادی میتوکندری وجود

<sup>1</sup> Acute Kidney Injury

<sup>2</sup> Chronic Kidney Injury

فعال اکسیژن، کاهش فعالیت زنجیره انتقال الکترون<sup>۱</sup>، از دست دادن پتانسیل غشا، تورم میتوکنندری و استرس اکسیداتیو مرتبط است [۳۲]. نتایج مطالعه حاضر تأیید کرد که سمیت کلیوی ناشی از ایفوسفامید با کاهش فعالیت سوکسینات دهیدروژناز، تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن، از دست دادن پتانسیل غشاء میتوکنندری، تورم میتوکنندری، که منجر به کاهش گلوتاتیون، استرس اکسیداتیو و ناهنجاری هیستوپاتولوژیک در بافت کلیه می‌شود، مرتبط است. به‌عنوان نتیجه نهایی، مطالعات قبلی منطبق با نتایج ما نشان داده‌اند که ایفوسفامید می‌تواند آسیب توبولو-بینابینی، اختلال عملکرد لوله پروگزیمال، سندرم فانکونی کامل یا ناقص را از طریق آسیب‌های میتوکنندری، به‌ویژه در آسیب لوله‌های پروگزیمال، ایجاد کند [۳۳-۳۵]. همان‌طور که در بالا ذکر شد، در میان بخش‌های نفرون، سلول‌های لوله‌ای پروگزیمال دارای تعداد زیادی میتوکنندری هستند، مقادیر زیادی انرژی مصرف می‌کنند و در معرض غلظت‌های بالایی از ایفوسفامید و متابولیت‌های سمی آن هستند [۳۴]. ایفوسفامید از طریق ناقل کاتیون آلی انسانی ۲ به سلول‌های لوله پروگزیمال نفوذ می‌کند و به یک نیتروژن فعال خردل (آسیب DNA) و دو عامل نفروتوکسیک (آکروئین و کلرواستالدئید) متابولیزه می‌شود [۳۶]. آکروئین و کلرواستالدئید می‌توانند از طریق مهار زنجیره انتقال الکترون به میتوکنندری و متابولیسم انرژی سلولی آسیب بزنند و آسیب‌پذیری سلولی را در برابر استرس اکسیداتیو افزایش دهند [۳۷-۳۸]. در این مطالعه، مطالعات هیستوپاتولوژیک و نشانگرهای استرس اکسیداتیو نشان داد که ایفوسفامید باعث خونریزی بینابینی و نکروز لوله‌ای در بافت کلیه می‌شود که با کاهش گلوتاتیون و پراکسیداسیون لیپیدی مرتبط است.

نتایج ما در این مطالعه و شواهد قبلی نشان می‌دهد که بازیابی عملکردهای میتوکنندری و مسدود کردن

تولید بیش‌ازحد رادیکال‌های فعال اکسیژن، یک استراتژی درمانی مکمل مناسب برای سمیت کلیوی ناشی از ایفوسفامید است. بر این اساس، شواهد فزاینده نشان می‌دهد که ترکیبات پلی‌فنلی موجود در میوه‌ها و سبزیجات می‌توانند اختلال عملکرد میتوکنندری و استرس اکسیداتیو را در مدل‌های سمیت کلیوی ناشی از داروها و مواد شیمیایی کاهش دهند [۴۱-۳۹]. این مطالعه نشان داد که کریسین، به‌عنوان ترکیب پلی‌فنولی شناخته‌شده، قادر به کاهش آسیب‌های کلیوی ناشی از ایفوسفامید از طریق محافظت میتوکنندری و خواص آنتی‌اکسیدانی است که با افزایش فعالیت سوکسینات دهیدروژناز، مهار فروپاشی پتانسیل غشاء میتوکنندریایی، کاهش تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن و تورم میتوکنندری، مهار گلوتاتیون و استرس اکسیداتیو در بافت کلیه مرتبط است. مطابق با مطالعه حاضر، چندین مطالعه نشان داده‌اند که کریسین می‌تواند از میتوکنندری محافظت کند و استرس اکسیداتیو و سمیت ناشی از مواد شیمیایی و داروها را کاهش دهد [۴۳، ۴۲، ۲۵]. یک مطالعه اخیر گزارش داده است که کریسین از کلیه موش در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از پاراستامول، التهاب، آپوپتوز و اتوفاژی محافظت می‌کند. اثر محافظتی کلیوی کریسین در این مطالعه با کاهش تنظیم نشانگرهای سمیت کلیوی سرم و افزایش تنظیم فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همراه بود [۴۴]. مطالعه دیگری وجود دارد که نشان می‌دهد کریسین می‌تواند سبب مهار استرس اکسیداتیو، التهاب و مرگ سلولی وابسته به میتوکنندری در سمیت کلیوی القاء‌شده توسط کادمیوم شود [۴۵]. Xu و همکاران نشان دادند که پیش‌درمان با کریسین می‌تواند بیان ژن Bax و کاسپاز-۳ را کاهش داده و سبب افزایش بیان ژن Bcl-2 در آسیب کلیوی ناشی از ایسکمی-رپرفیوژن شود [۴۶]. همچنین آن‌ها نشان دادند که تجویز کریسین سطح mRNA و پروتئین فاکتور نکروز تومور- $\alpha$ ، اینترلوکین ( $IL-1\beta$ ،  $IL-6$ ) و مسیر

<sup>1</sup> Electron Transport Chain

### نتیجه‌گیری

روی هم‌رفته، تحقیق فعلی نشان داد که کریسین می‌تواند اثرات محافظتی قابل‌توجهی در برابر سمیت کلیوی ناشی از ایفوسفامید ارائه دهد. کریسین از ناهنجاری‌های هیستوپاتولوژیک، کاهش گلوکوتایون، استرس اکسیداتیو و همچنین سمیت میتو‌کندری که از ویژگی‌های ایفوسفامید و متابولیت سمی آن است، محافظت می‌کند. به دلیل مکانیسم اثر ایفوسفامید (عامل آلکیله‌کننده) و همچنین خواص ضدسرطانی کریسین، یافته‌های ما تأیید می‌کند که پیش‌درمان با کریسین قبل از تجویز ایفوسفامید ممکن است برای اهداف بالینی مؤثر باشد. این مطالعه نشان داد که کریسین دارای پتانسیل محافظتی در برابر سمیت میتو‌کندری و سمیت کلیوی ناشی از ایفوسفامید است و به نظر می‌رسد این ترکیب طبیعی برای مصارف پزشکی، مانند عامل محافظت‌کننده کلیه با فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و حفاظتی میتو‌کندری، مفید باشد. از محدودیت‌های مطالعه فعلی می‌توان به مدت زمان مواجهه (۴ روز) اشاره کرد که بیشتر هدف مطالعه سمیت حاد دارو بوده است. پیشنهاد می‌شود اثر مفید کریسین در برابر سمیت کلیوی ناشی از ایفوسفامید در زمان‌های طولانی‌تر (اثرات مزمن) در مدل‌های سلولی، حیوانی و کارآزمایی بالینی مدنظر باشد.

### تأمین‌کننده مالی

این مطالعه با پشتیبانی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل با کد اخلاقی IR.ARUMS.AEC.1400.027 انجام شده است.

سیگنالینگ  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ /فاکتور هسته‌ای- $\kappa\text{B}$  را کاهش می‌دهد [۴۶]. همسو با نتایج مطالعه حاضر، در این مطالعه ثابت شده است که پیش‌درمانی با کریسین به‌طور قابل‌توجهی آسیب اکسیداتیو کلیوی ناشی از سیس‌پلاتین را با کاهش آسیب DNA و نشانگرهای سمیت، مانند کراتینین و نیتروژن اوره خون، پراکسیداسیون لیپیدی و فعالیت گزانتین اکسیداز، همراه با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیمی (کاتالاز، گلوکوتایون پراکسیداز و گلوکوتایون-S-ترانسفراز) و غیر آنزیمی (گلوکوتایون) و بهبود آسیب‌های بافتی کاهش می‌دهد [۴۷]. ایجاز و همکاران نشان دادند که آسیب‌های DNA و بافت کلیوی ناشی از آرسنیک به‌طور قابل‌توجهی توسط کریسین مهار می‌شود [۴۸]. علاوه بر موارد بالا، مطالعات متعددی وجود دارد که نشان می‌دهد کریسین از طریق خواص آنتی‌اکسیدانی، استرس اکسیداتیو، ضدالتهابی و کاهش بیومارکرهای آپوپتوزی سبب کاهش آسیب‌های کلیوی در مواجهه با عوامل شیمیایی، دارویی و بیماری می‌شود [۵۱-۴۹]. در مطالعه ما، ارزیابی‌های هیستوپاتولوژیک نشان داد که کریسین می‌تواند تغییرات پاتوفیزیولوژیکی ناشی از ایفوسفامید را کاهش دهد. بسیاری از مطالعاتی که در بالا به آن‌ها اشاره شد، نشان داده‌اند که کریسین می‌تواند از کلیه‌ها در برابر عوامل سمی و بیماری‌های کلیوی از طریق مکانیسم‌های مختلفی مانند آنتی‌اتوپتوزیک، ضدالتهاب، ضدآپوپتوز و آنتی‌اکسیدانی محافظت کند [۵۱-۴۹]. یافته‌های مطالعه حاضر نقش کریسین را به‌عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدانی و محافظ میتو‌کندری در برابر سمیت کلیوی ناشی از ایفوسفامید برجسته می‌کند.

### References

- 1- Ralhan R, Kaur J. Alkylating agents and cancer therapy. *Expert Opin Ther Pat.* 2007;17(9):1061-75.
- 2- McCune JS, Friedman DL, Schuetze S, Blough D, Magbulos M, Hawkins DS. Influence of age upon ifosfamide-induced nephrotoxicity. *Pediatr Blood Cancer.* 2004;42(5):427-32.

- 3- Han H-Y, Choi M-S, Yoon S, Ko J-W, Kim S-K, Kim T-W. Investigation of ifosfamide toxicity induces common upstream regulator in liver and kidney. *Int J Mol Sci.* 2021;22(22):12201.
- 4- Di Cataldo A, Astuto M, Rizzo G, Bertuna G, Russo G, Incorpora G, et al. Neurotoxicity during ifosfamide treatment in children. *Med Sci Monit.* 2009;15(1):25-30.
- 5- Kashoor I, Batlle D. Proximal renal tubular acidosis with and without Fanconi syndrome. *Kidney Res Clin Pract.* 2019;38(3):267-81.
- 6- Chugh R, Wagner T, Griffith KA, Taylor JM, Thomas DG, Worden FP, et al. Assessment of ifosfamide pharmacokinetics, toxicity, and relation to CYP3A4 activity as measured by the erythromycin breath test in patients with sarcoma. *Cancer.* 2007;109(11):2315-22.
- 7- Willits I, Price L, Parry A, Tilby M, Ford D, Cholerton S, et al. Pharmacokinetics and metabolism of ifosfamide in relation to DNA damage assessed by the COMET assay in children with cancer. *Br J Cancer.* 2005;92(9):1626-35.
- 8- Wu X, Cui W, Guo W, Liu H, Luo J, Zhao L, et al. Acrolein aggravates secondary brain injury after intracerebral hemorrhage through Drp1-mediated mitochondrial oxidative damage in mice. *Neurosci Bull.* 2020;36(11):1158-70.
- 9- Singh S, Kumar A. Protective effect of edaravone on cyclophosphamide induced oxidative stress and neurotoxicity in rats. *Curr Drug Saf.* 2019;14(3):209-16.
- 10-Duann P, Lin P-H. Mitochondria damage and kidney disease. *Adv Exp Med Biol.* 2017;982:529-551.
- 11-Mafra D, Gidlund EK, Borges NA, Magliano DAC, Lindholm B, Stenvinkel P, et al. Bioactive food and exercise in chronic kidney disease: Targeting the mitochondria. *Eur J Clin Invest.* 2018;48(11):e13020.
- 12-Ashkar F, Bhullar KS, Wu J. The effect of polyphenols on kidney disease: Targeting mitochondria. *Nutrients.* 2022;14(15):3115.
- 13-Mani R, Natesan V. Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. *Phytochemistry.* 2018;145:187-96.
- 14-Naz S, Imran M, Rauf A, Orhan IE, Shariati MA, Shahbaz M, et al. Chrysin: Pharmacological and therapeutic properties. *Life Sci.* 2019;235:116797.
- 15-Garg A, Chaturvedi S. A comprehensive review on chrysin: Emphasis on molecular targets, pharmacological actions and bio-pharmaceutical aspects. *Curr Drug Targets.* 2022;23(4):420-36.
- 16-Soliman MM, Aldahrani A, Gaber A, Alsanie WF, Mohamed WA, Metwally MM, et al. Ameliorative impacts of chrysin against gibberellic acid-induced liver and kidney damage through the regulation of antioxidants, oxidative stress, inflammatory cytokines, and apoptosis biomarkers. *Toxicol Res.* 2022;11(1):235-44.
- 17-Lee E-J, Kang M-K, Kim DY, Kim Y-H, Oh H, Kang Y-H. Chrysin inhibits advanced glycation end products-induced kidney fibrosis in renal mesangial cells and diabetic kidneys. *Nutrients.* 2018;10(7):882.
- 18-Ali BH, Adham SA, Al Za'abi M, Waly MI, Yasin J, Nemmar A, et al. Ameliorative effect of chrysin on adenine-induced chronic kidney disease in rats. *PLoS One.* 2015;10(4):e0125285.
- 19-Nagavally RR, Sunilkumar S, Akhtar M, Trombetta LD, Ford SM. Chrysin ameliorates Cyclosporine-A-induced renal fibrosis by inhibiting TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Int J Mol Sci.* 2021;22(19):10252.
- 20-Zhou Y, Tao H, Xu N, Zhou S, Peng Y, Zhu J, et al. Chrysin improves diabetic nephropathy by regulating the AMPK-mediated lipid metabolism in HFD/STZ-induced DN mice. *J Food Biochem.* 2022;46(12):e14379.
- 21-Shabani M, Bayrami D, Moghadam AA, Jamali Z, Salimi A. Pretreatment of ellagic acid protects ifosfamide-induced acute nephrotoxicity in rat kidneys: A mitochondrial, histopathological and oxidative stress approaches. *Toxicol Rep.* 2023;10:441-7.
- 22-Salimi A, Shabani M, Mohammadi H, Sudi V. Intraperitoneal pretreatment of ellagic acid and chrysin alleviate ifosfamide-induced neurotoxicity, but betanin induces death in male wistar rats. *Hum Exp Toxicol.* 2023;42:09603271221147883.



- 23-Micakovic T, Banczyk WZ, Clark E, Kränzlin B, Peters J, Hoffmann SC. Isolation of pure mitochondria from rat kidneys and western blot of mitochondrial respiratory chain complexes. *Bio-protocol*. 2019;9(19):e3379.
- 24-Sadighara M, Amirshardost Z, Minaiyan M, Hajhashemi V, Naserzadeh P, Salimi A, et al. Toxicity of atorvastatin on pancreas mitochondria: A justification for increased risk of diabetes mellitus. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2017;120(2):131-7.
- 25-Shirmard LR, Shabani M, Moghadam AA, Zamani N, Ghanbari H, Salimi A. Protective effect of curcumin, chrysin and thymoquinone injection on trastuzumab-induced cardiotoxicity via mitochondrial protection. *Cardiovasc Toxicol*. 2022;22(7):663-75.
- 26-Eirin A, Lerman A, Lerman LO. The emerging role of mitochondrial targeting in kidney disease. *Handb Exp Pharmacol*. 2017;240:229-250.
- 27-Bhargava P, Schnellmann RG. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(10):629-46.
- 28-Spinelli JB, Haigis MC. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat Cell Biol*. 2018;20(7):745-54.
- 29-Fisel P, Renner O, Nies AT, Schwab M, Schaeffeler E. Solute carrier transporter and drug-related nephrotoxicity: The impact of proximal tubule cell models for preclinical research. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014;10(3):395-408.
- 30-Kwiatkowska E, Domański L, Dziedziejko V, Kajdy A, Stefańska K, Kwiatkowski S. The mechanism of drug nephrotoxicity and the methods for preventing kidney damage. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11):6109.
- 31-Gyurászová M, Kovalčíková AG, Renczés E, Kmet'ová K, Celec P, Bábíčková J, et al. Oxidative stress in animal models of acute and chronic renal failure. *Dis Markers*. 2019;2019:8690805.
- 32-Gai Z, Gui T, Kullak-Ublick GA, Li Y, Visentin M. The role of mitochondria in drug-induced kidney injury. *Front Physiol*. 2020;11:1079.
- 33-Ensergueix G, Pallet N, Joly D, Levi C, Chauvet S, Trivin C, et al. Ifosfamide nephrotoxicity in adult patients. *Clin Kidney J*. 2020;13(4):660-5.
- 34-Ciarimboli G, Holle SK, Vollenbröcker B, Hagos Y, Reuter S, Burckhardt G, et al. New clues for nephrotoxicity induced by ifosfamide: Preferential renal uptake via the human organic cation transporter. *Mol Pharm*. 2011;8(1):270-9.
- 35-Ommati MM, Farshad O, Ghanbarinejad V, Mohammadi HR, Khadijeh M, Azarpira N, et al. The nephroprotective role of carnosine against ifosfamide-induced renal injury and electrolytes imbalance is mediated via the regulation of mitochondrial function and alleviation of oxidative stress. *Drug Res*. 2020;70(1):49-56.
- 36-Springate J, Chan K, Lu H, Davies S, Taub M. Toxicity of ifosfamide and its metabolite chloroacetaldehyde in cultured renal tubule cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1999;35(6):314-7.
- 37-Wang H-T, Lin J-H, Yang C-H, Haung C-H, Weng C-W, Lin AM-Y, et al. Acrolein induces mtDNA damages, mitochondrial fission and mitophagy in human lung cells. *Oncotarget*. 2017;8(41):70406-23.
- 38-Knouzy B, Dubourg L, Baverel G, Michoudet C. Targets of chloroacetaldehyde-induced nephrotoxicity. *Toxicol In Vitro*. 2010;24(1):99-107.
- 39-Rodrigo R, Bosco C. Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent kidney. A review. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2006;142(3-4):317-27.
- 40-Gorlach S, Fichna J, Lewandowska U. Polyphenols as mitochondria-targeted anticancer drugs. *Cancer Lett*. 2015;366(2):141-9.
- 41-Rehman H, Krishnasamy Y, Haque K, Thurman RG, Lemasters JJ, Schnellmann RG, et al. Green tea polyphenols stimulate mitochondrial biogenesis and improve renal function after chronic cyclosporin A treatment in rats. *PLoS One*. 2013;8(6):e65029.
- 42-Khezri S, Sabzalipour T, Jahedsani A, Azizian S, Atashbar S, Salimi A. Chrysin ameliorates aluminum phosphide-induced oxidative stress and mitochondrial damages in rat cardiomyocytes and isolated mitochondria. *Environ Toxicol*. 2020;35(10):1114-24.

- 43-Izuta H, Shimazawa M, Tazawa S, Araki Y, Mishima S, Hara H. Protective effects of Chinese propolis and its component, chrysin, against neuronal cell death via inhibition of mitochondrial apoptosis pathway in SH-SY5Y cells. *J Agric Food Chem*. 2008;56(19):8944-53.
- 44-Kandemir FM, Kucukler S, Eldutar E, Caglayan C, Gülçin İ. Chrysin protects rat kidney from paracetamol-induced oxidative stress, inflammation, apoptosis, and autophagy: A multi-biomarker approach. *Sci Pharm*. 2017;85(1):4.
- 45-Şimşek H, Akaras N, Gür C, Küçükler S, Kandemir FM. Beneficial effects of chrysin on cadmium-induced nephrotoxicity in rats: Modulating the levels of Nrf2/HO-1, RAGE/NLRP3, and caspase-3/Bax/Bcl-2 signaling pathways. *Gene*. 2023;875:147502.
- 46-Xu M, Shi H, Liu D. Chrysin protects against renal ischemia reperfusion induced tubular cell apoptosis and inflammation in mice. *Exp Ther Med*. 2019;17(3):2256-62.
- 47-Sultana S, Verma K, Khan R. Nephroprotective efficacy of chrysin against cisplatin-induced toxicity via attenuation of oxidative stress. *J Pharm Pharmacol*. 2012;64(6):872-81.
- 48-Ijaz MU, Jabeen F, Ashraf A, Imran M, Ehsan N, Samad A, et al. Evaluation of possible protective role of chrysin against arsenic-induced nephrotoxicity in rats. *Toxin Rev*. 2022;41(4):1237-45.
- 49-Samarghandian S, Farkhondeh T, Azimi-Nezhad M. Protective effects of chrysin against drugs and toxic agents. *Dose-Response*. 2017;15(2):1559325817711782.
- 50-Zeinali M, Rezaee SA, Hosseinzadeh H. An overview on immunoregulatory and anti-inflammatory properties of chrysin and flavonoids substances. *Biomed Pharmacother*. 2017;92:998-1009.
- 51-Ileriturk M, Benzer F, Aksu EH, Yildirim S, Kandemir FM, Dogan T, et al. Chrysin protects against testicular toxicity caused by lead acetate in rats with its antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic properties. *J Food Biochem*. 2021;45(2):e13593.