



تحقیقی

اثر کروسین بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو و التهاب در آسیب حاد کلیوی ناشی از لیپوپلی ساکارید در موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر نژاد C57BL/6

دکتر پریناز زارع^۱، دکتر معین فرهنگ نسب^۱، دکتر مهدیه طاهری^۲، دکتر مهرداد روغنی^{۳*}

^۱ دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای در رشته پزشکی عمومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران. ^۲ دکتری تخصصی فیزیولوژی، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران. ^۳ استاد فیزیولوژی، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: لیپوپلی ساکارید (Lipopolysaccharide: LPS) با دوز بالا به عنوان یک اندوتوکسین منجر به ایجاد مدل آسیب حاد کلیه (Acute kidney injury: AKI) در جوندگان می‌شود. کروسین یک ترکیب کاروتنوئیدی در میان ترکیبات فعال زعفران با اثرات دارویی فراوان مانند فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی است. این مطالعه به منظور تعیین اثر کروسین بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو و التهاب در آسیب حاد کلیوی ناشی از لیپوپلی ساکارید در موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر نژاد C57BL/6 انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه تجربی روی ۲۴ سر موش کوچک آزمایشگاهی نر نژاد C57BL/6 در محدوده وزنی ۲۳-۱۹ گرم و سن ۸-۱۰ هفته در آزمایشگاه مطالعات تجربی دانشگاه شاهد انجام شد. حیوانات به طور تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی شامل گروه کنترل، گروه لیپوپلی ساکارید و گروه‌های لیپوپلی ساکارید تحت تیمار با کروسین در دوز ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تقسیم شدند. در گروه‌های تحت تیمار، تجویز داروی کروسین با دوزهای ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن حل شده با حلال کالیفور به صورت گاوژ در دو نوبت با فاصله زمانی ۲۴ ساعت تا یک ساعت قبل از تزریق لیپوپلی ساکارید انجام شد. برای القا آسیب حاد کلیه، لیپوپلی ساکارید حل شده در نرمال سالین به میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن یک ساعت بعد از تجویز آخرین نوبت کروسین به صورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد. بیومارکرهای عملکرد کلیه و استرس اکسیداتیو و همچنین فاکتورهای التهابی و ضد التهابی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: در گروه لیپوپلی ساکارید تحت تیمار با کروسین در دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید، سطح سرمی کراتینین ($P < 0.01$)، BUN ($P < 0.05$) و کاهش معنی‌داری یافت و نیز شاخص مرتبط با استرس اکسیداتیو کلیوی شامل MDA (2.75 ± 0.22) به طور معنی‌داری کاهش یافت و فعالیت SOD (5.07 ± 0.36) به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$). همچنین تیمار کروسین سبب کاهش معنی‌دار TNF- α (1.80 ± 0.50) و افزایش IL-10 (52.90 ± 3.30) در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید گردید.

نتیجه‌گیری: کروسین می‌تواند با مهار استرس اکسیداتیو و عوامل التهابی باعث کلیه از آسیب حاد کلیوی ناشی از لیپوپلی ساکارید جلوگیری نماید.

واژه‌های کلیدی: لیپوپلی ساکارید، آسیب حاد کلیه، کروسین، استرس اکسیداتیو، التهاب

* نویسنده مسؤول: دکتر مهرداد روغنی، پست الکترونیکی: mroghani@shahed.ac.ir

نشانی: تهران، خیابان کارگر شمالی، بین خیابان فرصت و نصرت، شماره ۱۴۷۱، ساختمان مراکز تحقیقاتی دانشگاه شاهد، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، تلفن ۰۲۱-۶۶۴۱۵۳۰۸

وصول ۱۴۰۴/۴/۳۱ اصلاح نهایی ۱۴۰۴/۹/۱۵ پذیرش ۱۴۰۴/۱۰/۱۶ انتشار In Press

مقدمه

آسیب حاد کلیه (Acute kidney injury: AKI) یک عارضه شایع در بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه است که با کاهش شدید و پایدار در عملکرد کلیه در یک دوره زمانی کوتاه مشخص می‌شود.^۱ AKI منجر به مرگ ۱/۷ میلیون نفر در سال می‌گردد^۲ و با افزایش خطر ابتلا به بیماری مزمن کلیوی مرتبط است.^۳ AKI به طور کلی به سه دسته پیش کلیوی، ذاتی و پس کلیوی تقسیم می‌شود.

آسیب‌ها می‌توانند در ساختارهای مختلف کلیه، از جمله گلوبول‌ها و توبول‌ها رخ دهند و هر کدام اثرات بالینی متفاوتی دارند. آسیب پیش کلیوی به دلیل کاهش خون‌رسانی به کلیه (پرفیوژن کاهش یافته) است. گلوبول‌ها در این حالت عمدتاً سالمند؛ اما عملکردشان به دلیل کمبود خون مختل شده است. از عوامل مسبب این بیماری می‌توان به کاهش حجم خون، نارسایی قلب، مصرف داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی و تنگی شریان کلیوی اشاره کرد. در این

گسترده برای مطالعه مکانیسم‌های اختلال عملکرد اندام و کشف درمان‌های جدید مورد استفاده قرار می‌گیرند.^{۱۱}

زعفران کلاله خشک گل‌های *Crocus sativus* از زمان‌های قدیم به عنوان ادویه و همچنین در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. اثرات محافظتی آن ناشی از اجزای فعال آن، مانند کروسین و کروسیتین است. کروسین یکی از ترکیبات فعال زعفران (*Crocus sativus* L.) گونه‌ای تک‌لپه‌ای از خانواده Iridaceae است که عمده‌ترین ترکیب ایجاد کننده رنگ در زعفران است. به عبارتی کروسین‌ها مشتقات گلوکوزیدی کروسیتین هستند.^{۱۲} کروسین دارای خواص دارویی متفاوتی از جمله اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدتوموری است.^{۱۳}

این مطالعه به منظور تعیین اثر کروسین بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو و التهاب در آسیب حاد کلیوی ناشی از لیپولی ساکارید در موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر نژاد C57BL/6 انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۲۴ سر موش کوچک آزمایشگاهی نر نژاد C57BL/6 در محدوده وزنی ۱۹-۲۳ گرم و سن ۸-۱۰ هفته خریداری شده از انستیتو پاستور در آزمایشگاه مطالعات تجربی دانشگاه شاهد طی سال ۱۳۹۸ انجام شد.

پروتکل کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. موش‌ها در گروه‌های ۴ تایی در هر قفس قرار داده شدند. حیوان‌ها در شرایط استاندارد آزمایشگاه با دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، چرخه ۱۲ ساعته روشنایی-تاریکی و دسترسی آزادانه به آب و غذای مخصوص موش (شرکت خوراک دام پارس، کرج) نگهداری شدند.

حیوانات به طور تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی شامل گروه اول کنترل، گروه دوم لیپولی ساکارید، گروه سوم لیپولی ساکارید تحت تیمار با کروسین در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و گروه چهارم لیپولی ساکارید تحت تیمار با کروسین در دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تقسیم شدند.

در گروه‌های تحت تیمار، تجویز داروی کروسین با دوزهای ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن^{۱۴} حل شده با حلال کالیفور، به صورت گاوآذ در دو نوبت با فاصله زمانی ۲۴ ساعت تا یک ساعت قبل از تزریق لیپولی ساکارید انجام شد.

برای القا آسیب حاد کلیه، لیپولی ساکارید حل شده در نرمال سالین به میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن یک ساعت بعد از تجویز آخرین نوبت کروسین به صورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد.^{۱۵}

اندازه‌گیری عملکرد کلیه: نمونه خون از حیوانات تحت بیهوشی عمیق جمع‌آوری شد. سرم با دستگاه سانتریفیوژ در ۳۰۰۰ دور در

بیماران کاهش ناگهانی در میزان فیلتراسیون گلومرولی باعث کاهش دفع مواد زائد می‌شود. آسیب مستقیم به ساختارهای کلیه، مخصوصاً توپول‌ها و گلومرول‌ها منجر به آسیب ذاتی می‌گردد. نکرور توپولی حاد که اصلی‌ترین آسیب توپولی است و گلومرولونفریت که باعث اختلال در فیلتر کردن خون و دفع مواد زائد می‌شود؛ از عوامل آسیب ذاتی کلیه محسوب می‌شوند. اثرات بالینی گلومرولونفریت شامل خون در ادرار، پروتئینوری، فشار خون بالا، تورم و کاهش عملکرد کلیه است. در موارد حاد، نارسایی حاد کلیه رخ می‌دهد. در نکرور توپولی حاد، اختلال در توپول‌ها باعث کاهش توانایی کلیه در بازیابی و فیلتر مواد می‌شود که ممکن است به نارسایی حاد کلیه منجر شود. انسداد خروجی ادرار (مثلاً به دلیل سنگ کلیه، تومور یا پروستات بزرگ شده) که باعث فشار به کلیه‌ها می‌شود و عملکرد آنها را مختل می‌کند؛ سبب آسیب پس کلیوی می‌گردد. این نوع آسیب معمولاً به توپول‌ها و کلیه‌ها فشار وارد می‌کند و اثرات بالینی آن شامل کاهش ادرار و احتباس ادراری است. به طور کلی اثرات بالینی AKI در انسان شامل کاهش ناگهانی عملکرد کلیه که موجب انباشت مواد زائد (اوره، کراتینین) در خون، کاهش حجم و تعداد دفعات ادرار (اولیگوری یا آنوری) در برخی موارد، وجود خون یا پروتئین در ادرار به ویژه در آسیب گلومرولی (گلومرولونفریت)، تورم (ادم)، فشار خون بالا، اختلال الکترولیتی و اسیدوز متابولیک است.^۴

درمان‌های فعلی برای بیماران مبتلا به AKI شامل آنتی‌بیوتیک‌ها و وازوپرسورها است؛ اما درمان خاصی برای این بیماری وجود ندارد.^۵ بنابراین توسعه راهبردهای درمانی موثر و خاص برای AKI مورد نیاز است.

لیپولی ساکارید (Lipopolysaccharide: LPS) جزء ساختاری اصلی غشای باکتری گرم منفی است^۶ که به‌طور گسترده برای القای پاتولوژی‌های مرتبط با AKI، از جمله التهاب و استرس اکسیداتیو استفاده شده است.^۷ LPS التهاب سیستمیک و کلیه را از طریق سیگنال‌دهی که با گیرنده TLR4 (Toll-like receptor 4) شناسایی می‌شود و بر روی سلول‌های کلیوی مانند سلول‌های اپیتلیال و همچنین سلول‌های ایمنی مانند ماکروفاژها بیان می‌شود؛ واسطه می‌کند.^۸ تحریک TLR4 توسط LPS در سلول‌های ایمنی منجر به تولید بیش از حد سایتوکاین‌های پیش التهابی، گونه‌های فعال اکسیژن و همچنین نفوذ سلول‌های ایمنی به اندام آسیب دیده می‌شود.^۹ قرارگرفتن سلول‌های اپیتلیال در معرض LPS همچنین باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن و مرگ سلولی آپوپتوز می‌گردد.^{۱۰} در نهایت این تغییرات منجر به آسیب ساختاری و عملکردی کلیه می‌شود. به این ترتیب، به دلیل نقش اساسی LPS در پاتوفیزیولوژی AKI، مدل‌های جوندگان با تزریق LPS به‌طور

دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه جدا شد و نشانگرهای عملکرد کلیه شامل BUN، کراتینین و آلبومین با استفاده از کیت‌های اختصاصی (پارس آزمون، تهران، ایران) اندازه‌گیری گردید.

سنجش بیومارکرهای مرتبط با استرس اکسیداتیو کلیه: بعد از جداسازی بافت کلیه، برای تهیه هموژنه آن، از بافر لیز ۱۵۰ میلی‌مولار تریس هیدروکلراید با pH 7.4 استفاده شد. پس از سانتریفیوژ کردن، از مایع رویی آن برای سنجش فاکتورهای مورد نظر استفاده شد. سپس نمونه‌ها در میکروتیوب‌ها تقسیم‌بندی شده و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان بررسی نگهداری شدند.

اندازه‌گیری محتوای پروتئین طبق روش برادفورد و جذب نوری نمونه‌ها توسط دستگاه میکروپلیت خوان در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد در نظر گرفته شد.^{۱۶}

طبق روشی که اساس آن واکنش تیوباربتوریک اسید به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای جوش، میزان مالون‌دی‌آلدهید مورد سنجش قرار گرفت. هموژنه بافت کلیه با ترکیبی از تیوباربتوریک اسید و تری‌کلرواستیک اسید در هیدروکلریک اسید برای ایجاد رسوب پروتئین، مخلوط شدند. سپس این مخلوط در دمای آزمایشگاه و با دور ۳۰۰۰ به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ و رسوب حاصل از آن تفکیک گردید. در طول موج ۵۳۲ نانومتر جذب نمونه‌ها انجام شد و غلظت نهایی مالون‌دی‌آلدهید به صورت نانومول بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد.^{۱۷}

سطح نیتريت با استفاده از روش گریس^{۱۸} مورد سنجش قرار گرفت. در این روش، مایع رویی به معرف گریس حاوی سولفانیل آمید و N-نفتیل اتیلن دی آمین در محیط اسیدی اضافه شد. جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر تعیین شد.

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز با توجه به مطالعه قبلی^{۱۹} تعیین شد. به عبارتی، مایع رویی با گزانتین و گزانتین اکسیداز در بافر فسفات پتاسیم (pH 7.8، ۳۷ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۴۰ دقیقه انکوبه شد و ترازولیوم نیتروبلو اضافه شد. پس از آن، در طول موج ۵۵۰ نانومتر بررسی شد. مقدار پروتئینی که کاهش ترازولیوم نیتروبلو را تا حداکثر ۵۰ درصد مهار کرد؛ به عنوان یک واحد نیتريت فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در نظر گرفته شد.

فعالیت کاتالاز مطابق با پروتکل Claiborne^{۲۰} به دست آمد. به‌طور

خلاصه، پراکسید هیدروژن به مخلوط ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات پتاسیم (pH 7.0) اضافه شد و سرعت تخریب مایع رویی و پراکسید هیدروژن در ۲۴۰ نانومتر دنبال شد.

سنجش بیومارکرهای مرتبط با التهاب کلیه: سطوح کلیوی فاکتورهای التهابی و ضدالتهابی با استفاده از پروتکل الایزا تعیین شد. آنتی‌بادی برای فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا از SigmaAldrich (آمریکا) و آنتی‌بادی برای اینترلوکین-۱۰ از Santa Cruz Biotechnology, Inc (آمریکا) به دست آمد. میزان جذب نمونه‌ها توسط میکروپلیت خوان در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری Graphpad Prism 8 تجزیه و تحلیل و نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار گزارش شدند. از آزمون آماری پارامتریک آنوای یک طرفه و در صورت اختلاف معنی‌دار از آزمون توکی استفاده شد. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

سطح سرمی نیتروژن اوره خون در گروه‌های مورد مطالعه در **جدول یک** آمده است.

در گروه‌های لیپوپلی ساکارید و لیپوپلی ساکارید تحت تیمار با کروسین ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار نشان داد (به ترتیب $P < 0/001$ ، $37/80 \pm 2/70$ و $P < 0/001$ ، $34/90 \pm 2/80$). در گروه لیپوپلی ساکارید دریافت‌کننده کروسین ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن کاهش معنی‌دار ($P < 0/05$) در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید و افزایش معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل ($P < 0/05$) در سطح سرمی فاکتور مذکور ($25/80 \pm 2/40$) مشخص شد.

در **جدول یک**، میزان کراتینین سرم در گروه‌های لیپوپلی ساکارید و لیپوپلی ساکارید تحت تیمار با کروسین ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار نشان داد (به ترتیب $P < 0/001$ ، $0/83 \pm 0/06$ و $P < 0/001$ ، $0/79 \pm 0/07$). سطح این فاکتور در گروه لیپوپلی ساکارید دریافت‌کننده کروسین ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن کاهش معنی‌دار ($P < 0/01$) در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید و افزایش معنی‌دار ($P < 0/05$) در مقایسه با گروه کنترل ($0/54 \pm 0/05$) نشان داد.

جدول ۱: میزان عملکرد کلیه موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر نژاد C57BL/6 به روش رنگ سنجی در گروه‌های مورد مطالعه

میانگین و انحراف معیار			گروه‌ها
Alb (g/dl)	Cr (mg/dl)	BUN (mg/dl)	
$2/14 \pm 0/12$	$0/31 \pm 0/03$	$14/30 \pm 2/10$	کنترل (n=۶)
$1/78 \pm 0/15$	$0/83 \pm 0/06^{**}$	$37/70 \pm 2/70^{**}$	لیپوپلی ساکارید (n=۶)
$1/73 \pm 0/16$	$0/79 \pm 0/07^{**}$	$34/90 \pm 2/80^{**}$	لیپوپلی ساکارید + کروسین ۱۰ mg/kg/bw (n=۶)
$1/89 \pm 0/18$	$0/54 \pm 0/05^{***}$	$25/80 \pm 2/40^{**}$	لیپوپلی ساکارید + کروسین ۵۰ mg/kg/bw (n=۶)

* $P < 0/05$ ، ** $P < 0/01$ ، # $P < 0/05$ ، ## $P < 0/01$ (در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید)

جدول ۲: میزان فاکتورهای استرس اکسیداتیو و فعالیت آنتی اکسیدانی در موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر نژاد C57BL/6 در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	MDA (nmol/mg)	Nit (nmol/mg)	SOD (Unit/mg)	CAT (Unit/mg)	میانگین و انحراف معیار
کنترل (n=۶)	۱/۶۵±۰/۲۱	۰/۴۳±۰/۰۴	۶/۱۷±۰/۳۵	۸/۲۵±۰/۳۷	
لیپوپلی ساکارید (n=۶)	۳/۹۱±۰/۲۶ ***	۰/۸۳±۰/۰۸ **	۳/۹۵±۰/۳۲ ***	۵/۹۱±۰/۳۹ **	
لیپوپلی ساکارید + کروسین ۱۰ mg/kg/bw (n=۶)	۳/۷۵±۰/۲۹ ***	۰/۸۷±۰/۰۸ **	۴/۱۹±۰/۳۴ **	۵/۸۷±۰/۴۳ **	
لیپوپلی ساکارید + کروسین ۵۰ mg/kg/bw (n=۶)	۲/۷۵±۰/۲۲ * #	۰/۷۱±۰/۰۷ *	۵/۵۷±۰/۳۶ #	۷/۰۳±۰/۳۸	

*P<۰/۰۵، **P<۰/۰۱، ***P<۰/۰۰۱ (درمقایسه با گروه کنترل)، #P<۰/۰۵ (درمقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید)

جدول ۳: میزان فاکتورهای التهابی و ضد التهابی در موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر نژاد C57BL/6 به روش الایزا در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	TNFα (pg/mg)	IL-10 (pg/mg)	میانگین و انحراف معیار
کنترل (n=۶)	۲۵/۹۰±۲/۸۰	۴۲/۸۰±۳/۱۰	
لیپوپلی ساکارید (n=۶)	۶۱/۷۰±۴/۵۰ *	۳۷/۹۰±۳/۵۰	
لیپوپلی ساکارید + کروسین ۱۰ mg/kg/bw (n=۶)	۵۴/۳۰±۴/۷۰ *	۴۳/۵۰±۳/۷۰	
لیپوپلی ساکارید + کروسین ۵۰ mg/kg/bw (n=۶)	۴۱/۸۰±۳/۵۰ ** ##	۵۲/۹۰±۳/۳۰ #	

*P<۰/۰۰۱، **P<۰/۰۰۱، ##P<۰/۰۰۱، #P<۰/۰۰۱ (درمقایسه با گروه کنترل)، P<۰/۰۱ (درمقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید)

میزان آلبومین سرم (جدول یک) در گروه لیپوپلی ساکارید کاهش غیرمعنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشت ($P>۰/۰۵$ ، $۱/۷۸±۰/۱۵$). تیمار با کروسین در دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم باعث افزایش مختصر آلبومین نسبت به گروه لیپوپلی ساکارید گردید؛ اما این افزایش نسبت به گروه لیپوپلی ساکارید از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$ ، $۱/۸۹±۰/۱۸$).

در جدول ۲ میزان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی (مالون‌دی‌آلدهید) در گروه‌های مختلف مورد مطالعه نشان داده شده است. میزان مالون‌دی‌آلدهید در گروه‌های لیپوپلی ساکارید و لیپوپلی ساکارید تحت تیمار با کروسین ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار نشان داد (به ترتیب $P<۰/۰۰۱$ ، $۳/۹۱±۰/۲۶$ و $P<۰/۰۰۱$ ، $۳/۷۵±۰/۲۹$). به علاوه در گروه لیپوپلی ساکارید تحت تیمار با کروسین ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن افزایش معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) این فاکتور نسبت به گروه کنترل بارز بود. در گروه لیپوپلی ساکارید دریافت کننده کروسین ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن کاهش معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) در میزان مالون‌دی‌آلدهید در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید ($۲/۷۵±۰/۲۲$) مشخص گردید.

نتایج حاصل از سنجش میزان نیتريت در واحد حجم بافت هموژنه کلیه نمونه‌ها در جدول ۲ آمده است. اندازه‌گیری غلظت نیتريت در گروه لیپوپلی ساکارید و گروه‌های لیپوپلی ساکارید تحت تیمار با کروسین با دوزهای ۱۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم افزایش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل نشان داد (به ترتیب $P<۰/۰۰۱$ ، $۰/۸۳±۰/۰۸$ ؛ $P<۰/۰۰۱$ ، $۰/۸۷±۰/۰۸$ و $P<۰/۰۰۵$ ، $۰/۷۱±۰/۰۷$). به علاوه، کاهش میزان این پارامتر در گروه لیپوپلی ساکارید دریافت کننده کروسین در دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در مقایسه با گروه

لیپوپلی ساکارید مشهود بود که از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. جدول ۲ نتایج حاصل از فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز را مشخص می‌کند. در گروه‌های لیپوپلی ساکارید و لیپوپلی ساکارید تحت تیمار با کروسین ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی کاهش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل نشان داد (به ترتیب $P<۰/۰۰۱$ ، $۳/۹۵±۰/۳۲$ و $P<۰/۰۰۱$ ، $۴/۱۹±۰/۳۴$). افزایش معنی‌دار این پارامتر در گروه لیپوپلی ساکارید دریافت کننده کروسین با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید ($P<۰/۰۵$ ، $۵/۵۷±۰/۳۶$) مشاهده گردید. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در جدول ۲ گزارش شده است. فعالیت این آنزیم در گروه‌های لیپوپلی ساکارید و لیپوپلی ساکارید دریافت کننده کروسین با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار نشان داد (به ترتیب $P<۰/۰۰۱$ ، $۵/۹۱±۰/۳۹$ و $P<۰/۰۰۱$ ، $۵/۸۷±۰/۴۳$). در گروه لیپوپلی ساکارید تحت تیمار با کروسین ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن افزایش غیرمعنی‌دار در فعالیت این آنزیم آنتی اکسیدانی نسبت به گروه لیپوپلی ساکارید مشاهده گردید.

میزان فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا در جدول ۳ آمده است. در گروه‌های لیپوپلی ساکارید و لیپوپلی ساکارید دریافت کننده کروسین با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار در میزان این سایتوکاین پیش التهابی مشخص شد (به ترتیب $P<۰/۰۰۱$ ، $۶۱/۷۰±۴/۵۰$ و $P<۰/۰۰۱$ ، $۵۴/۳۰±۴/۷۰$). در گروه لیپوپلی ساکارید دریافت کننده کروسین ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن کاهش معنی‌دار ($P<۰/۰۰۱$) در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید و افزایش معنی‌دار ($P<۰/۰۰۵$) در مقایسه با گروه کنترل در میزان فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا ($۴۱/۸۰±۳/۵۰$)

مشخص گردید.

سطح فاکتور ضد التهابی اینترلوکین-۱۰ در جدول ۳ در گروه‌های مورد مطالعه آمده است. در گروه لیپوپلی ساکارید کاهش غیرمعنی‌داری ($P>0/05$)، $37/90 \pm 3/50$) از لحاظ آماری مشاهده گردید. به علاوه افزایش غیرمعنی‌دار این فاکتور در گروه لیپوپلی ساکارید دریافت کننده کروسین با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به گروه لیپوپلی ساکارید ($P>0/05$)، $43/50 \pm 3/70$) مشاهده گردید. گروه لیپوپلی ساکارید تحت تیمار با کروسین با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم افزایش معنی‌دار در میزان اینترلوکین-۱۰ نسبت به گروه لیپوپلی ساکارید ($P<0/05$)، $52/90 \pm 3/30$) نشان داد.

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه، LPS یک اثر برجسته بر روی سیستم اکسیدان و یک اثر تضعیف کننده بر روی سیستم آنتی اکسیدانی بافت کلیه نشان داد. این یافته‌ها با کاهش قابل توجه فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز و افزایش قابل توجهی در مالون‌دی‌آلدهید و نیتريت توجیه شد.

استرس اکسیداتیو افزایش یافته به عنوان یک عامل غالب در فرآیند پاتولوژیک AKI در نظر گرفته شده است.^{۲۱} افزایش استرس اکسیداتیو یک واسطه حیاتی برای پاسخ ایمنی ذاتی است که می‌تواند به رهایش سایتوکاین‌ها کمک کند.^{۲۲} در این مطالعه، LPS باعث افزایش قابل توجه فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که استرس اکسیداتیو از طریق فعال شدن TLR باعث مرگ سلولی مرتبط با التهاب می‌گردد.^{۲۳} یافته‌های ما نشان داد که تزریق داخل صفاقی LPS با تغییر معنی‌دار در میزان اینترلوکین-۱۰ همراه نبود. برخلاف مطالعه ما، Zhao و همکاران گزارش کردند میزان اینترلوکین-۱۰ در سرم و بافت مغزی در موش‌ها دریافت کننده LPS داخل صفاقی (۵۰۰ یا ۷۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم) یا داخل بطنی مغزی (۱۲ میکروگرم) به مدت ۱ یا ۷ روز متوالی؛ به‌طور قابل توجهی کاهش یافت.^{۲۴} این اختلاف ممکن است به دلیل تفاوت زمانی در تزریق LPS، میزان دوز تزریقی و اختلاف در مدل طراحی شده باشد. مطالعات نشان داده‌اند سطوح سرمی نیتروژن اوره خون، کراتینین نشان‌دهنده وضعیت عملکرد کلیه است. به دنبال التهاب ناشی از LPS، تولید گونه‌های فعال نیتروژن منجر به آسیب اکسیداتیو در لوله‌های پروگزیمال می‌شود که برون‌ده ادرار و مواد زائد نیتروژنی را افزایش می‌دهد.^{۲۵} بهشتی و همکاران مطالعه‌ای به منظور تعیین اثر *N. Sativa* بر اختلالات عملکرد کلیوی و کبدی ناشی از LPS انجام داده‌اند و نتایج نشان داد که تزریق LPS سبب کاهش آلبومین سرم نسبت به گروه کنترل شده که نشان‌دهنده اثرات مضر LPS بر

عملکرد کبد و کلیه است.^{۲۶} با توجه به نتایج مطالعه حاضر تزریق داخل صفاقی لیپوپلی ساکارید به میزان ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم با افزایش سطح نیتروژن اوره خون و کراتینین در مقایسه با گروه کنترل همراه بود. اگرچه اختلاف آماری معنی‌داری از نظر میزان آلبومین در گروه‌های مورد مطالعه یافت نشد که ممکن است به دلیل میزان دوز مورد استفاده LPS و مدل ایجاد شده باشد. بنابراین، عواملی که می‌توانند مسیرهای التهابی و استرس اکسیداتیو را مهار کنند؛ می‌توانند در بهبود AKI موثر باشند.

در بافت کلیه که به شدت در برابر مواد سمی حساس است؛ سطوح غیرطبیعی اسید اوریک پلاسما، کراتینین و اوره شاخص‌های مهم آسیب کلیه هستند.^{۲۷} مطالعات قبلی نشان دادند که پیش‌تیمار با کروسین سطوح بالای سرمی کراتینین و نیتروژن اوره خون، تولید مالون‌دی‌آلدهید و فعالیت گزانتین اکسیداز را در بافت کلیه کاهش می‌دهد. در حالی که سطح گلوکاتایون را در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی دیابتی افزایش می‌دهد.^{۲۸}

نتایج این مطالعه نشان داد که تیمار با کروسین در دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب کاهش معنی‌دار مقادیر نیتروژن اوره خون و کراتینین در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید گردید؛ اگرچه تاثیر معنی‌داری بر مقادیر آلبومین نداشت. در حالی که گزارش شده کروسین و دیوسمین مقاومت به انسولین، فشار خون، اسید اوریک، لیپوپروتئین‌ها، میزان دفع آلبومین و نسبت آلبومین به کراتینین و نفروپاتی ناشی از سندرم متابولیک را بهبود بخشیدند. به علاوه این دو ماده با کاهش فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا و سلول‌های التهابی سرم، استرس اکسیداتیو را کاهش دادند.^{۲۹} که تناقض نتایج این مطالعه با تحقیق حاضر در تاثیر کروسین بر میزان آلبومین سرم با تفاوت در نوع طراحی آزمایش قابل توجه است.

رجبعلی زاده و همکاران گزارش کردند تیمار همزمان کروسین با کولستین در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار منجر به کاهش معنی‌دار نیتروژن اوره خون و کراتینین، افزایش سطح گلوکاتایون و بهبود تغییرات هیستوپاتولوژیک در نمونه‌های خون و بافت کلیه در مقایسه با گروه کولستین شد.^{۳۰} بنابراین، کروسین به عنوان یک آنتی اکسیدان اثرات محافظتی در برابر آسیب کلیوی ناشی از کولستین نشان می‌دهد و می‌تواند به عنوان مکملی برای کاهش آسیب بافتی و بیوشیمیایی ناشی از تزریق کولستین استفاده شود. مطالعات گزارش کرده‌اند کلسترول تام، تری گلیسیرید، کراتینین، نیتروژن اوره خون، حجم ادرار و آلبومین ادرار به‌طور قابل توجهی در مدل نفروپاتی غشایی توسط کروسین کاهش می‌یابد. علاوه بر این، کروسین تغییرات هیستوپاتولوژیک کلیه و آسیب استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد.^{۳۱} گزارش شده است که

آنتی اکسیدانی کروسین است که همراستا با نتایج مطالعه حاضر است.

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به عدم وجود گروه کنترل تحت تیمار با کروسین با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن اشاره نمود. علاوه بر این انجام ارزیابی‌های عوامل مرتبط با آپوپتوز و اثر حفاظتی کروسین بر آن می‌تواند در بررسی‌های بعدی لحاظ گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که کروسین در دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن یک اثر محافظتی در برابر آسیب ساختاری و عملکردی کلیوی ناشی از لیپوپلی ساکارید اعمال می‌کند. کروسین استرس اکسیداتیو ناشی از LPS را از طریق تعدیل سیستم‌های اکسیدان و آنتی اکسیدان مهار کرد. این ترکیب همچنین تولید سایتوکاین پیش التهابی فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا را کاهش و منجر به افزایش فاکتور ضد التهابی اینترلوکین-۱۰ گردید. اگرچه مطالعات آینده برای توضیح بیشتر مکانیسم اثر کروسین و سیگنالینگ‌های مولکولی مداخله کننده آن، مورد نیاز خواهد بود؛ با این حال یافته‌های ما نشان می‌دهد که این ترکیب موثر زعفران می‌تواند یک گزینه درمانی بالقوه برای آسیب حاد کلیوی باشد.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه شاهد (IR.SHAHED.REC.1397.105) قرار گرفت.

حمایت مالی

این مقاله حاصل پایان نامه خانم پریناز زارع برای اخذ درجه دکتری حرفه‌ای در رشته پزشکی عمومی از دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد بود. بخشی از حمایت‌های مالی این مطالعه توسط دانشگاه شاهد (کد ۱۰۵) انجام شد.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض منافع وجود ندارد.

مشارکت نویسندگان

پریناز زارع: انجام پروژه، جمع‌آوری داده‌ها، آنالیز داده‌ها، تفسیر نتایج، نوشتن نسخه اولیه مقاله و تایید نسخه نهایی مقاله. **معین فرهنگ**: نسب: انجام پروژه، جمع‌آوری داده‌ها، آنالیز داده‌ها، تفسیر نتایج، نوشتن نسخه اولیه مقاله و تایید نسخه نهایی مقاله. **مهديه طاهری**: آنالیز داده‌ها، تفسیر نتایج، نوشتن نسخه اولیه مقاله و تایید نسخه نهایی مقاله. **مهرداد روغنی**: مدیریت و طراحی پروژه، آنالیز داده‌ها، تفسیر نتایج، نوشتن نسخه اولیه مقاله و تایید نسخه نهایی مقاله.

کروسین با کاهش سطح سرمی آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز، آنزیم آلانین آمینوترانسفراز و نیتروژن اوره خون، افزایش فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز از بافت کلیه در برابر آسیب ایسکمی-پرفیوژن مجدد محافظت می‌کند.^{۲۲} لذا نتایج مطالعات گذشته با پژوهش حاضر مطابقت داشته و مؤید اثرات سودمند کروسین بر بهبود عملکرد کلیوی است.

نتایج این مطالعه نشان داد که در گروه لیپوپلی ساکارید تحت تیمار با ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن کروسین، افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاهش معنی‌داری در میزان مالون‌دی‌آلدئید که یک شاخص پراکسیداسیون لیپیدی است؛ در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید مشاهده شد. در حالی که این اختلاف بین این دو گروه در مورد مقادیر نیتريت و فعالیت آنزیم کاتالاز از نظر آماری معنی‌دار نبود.

نتایج مطالعه Altinoz و همکاران نشان داد که تیمار کروسین بیان اینترلوکین-۱ بتا و فاکتور رشد تغییر شکل دهنده بتا را در سمیت کلیوی ناشی از دوکسوروبیسین بهبود می‌بخشد. کروسین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، محتوای گلوتاتیون را افزایش می‌دهد و سبب سرکوب التهاب و استرس اکسیداتیو در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی در معرض دوکسوروبیسین می‌گردد. همچنین کروسین با تثبیت هموستاز ردوکس سلولی، کاهش فیروز کلیه و سرکوب التهاب، اثرات محافظتی کلیوی کافی را در برابر سمیت کلیوی ناشی از دوکسوروبیسین بر روی ساختار کلیه و عملکرد بافت موش نشان می‌دهد.^{۲۳} به عبارتی اختلالات التهابی با آزاد شدن گونه‌های فعال اکسیژن با مولکول‌های پیش التهابی مرتبط هستند^{۱۲} و اثر ضد التهابی کروسین بر اساس خواص آنتی اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد آن است. همچنین نشان داده شده است که تیمار کروسین با تعدیل بار اکسیداتیو و آشکار التهابی، پیشرفت نفروپاتی دیابتی را کند می‌کند.^{۲۴} در نهایت کروسین از افزایش mRNA فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا مرتبط با آسیب‌های کلیوی ناشی از ایسکمی-پرفیوژن مجدد در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی جلوگیری می‌کند.^{۲۵}

Masalegoo و همکاران نشان دادند تیمار کروسین در موش بزرگ آزمایشگاهی به طور معنی‌داری عوامل التهابی (اینترلوکین-۱۰، اینترلوکین-۶ و فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا) و استرس اکسیداتیو (مالون دی‌آلدئید) را کاهش و منجر به افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی (گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز) بافت هیپوکامپ گردید.^{۲۶} نتایج کلی این مطالعات نشان دهنده اثر ضد التهابی و

References

- Gonzalez SR, Cortés AL, Silva RCD, Lowe J, Prieto MC, Silva Lara LD. Acute kidney injury overview: From basic findings to new prevention and therapy strategies. *Pharmacol Ther.* 2019 Aug;200:1-12. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.04.001>.
- Zhang H, Chen MK, Li K, Hu C, Lu MH, Situ J. Eupafolin nanoparticle improves acute renal injury induced by LPS through inhibiting ROS and inflammation. *Biomed Pharmacother.* 2017 Jan;85:704-11. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.083>.
- Chawla LS, Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome. *Kidney Int.* 2012 Sep;82(5):516-24. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.208>.
- Makris K, Spanou L. Acute Kidney Injury: Definition, Pathophysiology and Clinical Phenotypes. *Clin Biochem Rev.* 2016 May;37(2):85-98.
- He FF, Wang YM, Chen YY, Huang W, Li ZQ, Zhang C. Sepsis-induced AKI: From pathogenesis to therapeutic approaches. *Front Pharmacol.* 2022 Sep;13:981578. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.981578>.
- Gabarin RS, Li M, Zimmer PA, Marshall JC, Li Y, Zhang H. Intracellular and Extracellular Lipopolysaccharide Signaling in Sepsis: Avenues for Novel Therapeutic Strategies. *J Innate Immun.* 2021;13(6):323-32. <https://doi.org/10.1159/000515740>.
- Liu X, Lu J, Liao Y, Liu S, Chen Y, He R, et al. Dihydroartemisinin attenuates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by inhibiting inflammation and oxidative stress. *Biomed Pharmacother.* 2019 Sep;117:109070. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109070>.
- Anders HJ, Banas B, Schlöndorff D. Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Apr;15(4):854-67. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000121781.89599.16>.
- Peerapornratana S, Manrique-Caballero CL, Gómez H, Kellum JA. Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment. *Kidney Int.* 2019 Nov;96(5):1083-99. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.05.026>.
- Kim K, Leem J. Hispidulin Ameliorates Endotoxin-Induced Acute Kidney Injury in Mice. *Molecules.* 2022 Mar;27(6):2019. <https://doi.org/10.3390/molecules27062019>.
- Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Star RA. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest.* 2009 Oct;119(10):2868-78. <https://doi.org/10.1172/jci39421>.
- Korani S, Korani M, Sathyapalan T, Sahebkar A. Therapeutic effects of Crocin in autoimmune diseases: A review. *Biofactors.* 2019 Nov;45(6):835-43. <https://doi.org/10.1002/biof.1557>.
- Baradaran Rahim V, Khammar MT, Rakhshandeh H, Samzadeh-Kermani A, Hosseini A, Askari VR. RETRACTED ARTICLE: Crocin protects cardiomyocytes against LPS-Induced inflammation. *Pharmacol Rep.* 2019 Dec;71(6):1228-34. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2019.07.007>.
- Ghofrani S, Joghataei M-T, Afshin-Majd S, Baluchnejadmojarad T, Roghani M. [Crocin, a bioactive constituent of *Crocus sativus*, alleviates trimethyltin-induced cognitive deficits through down-regulation of hippocampal apoptosis and oxidative stress]. *Journal of Basic and Clinical Pathophysiology.* 2022;10(1):38-44. <https://doi.org/10.22070/jbcp.2022.16405.1160>.
- Wang J, Kuai J, Luo Z, Wang W, Wang L, Ke C, et al. Crocin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology.* 2015;8(5):4844-50.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May;72:248-54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Sedaghat R, Roghani M, Khalili M. Neuroprotective effect of thymoquinone, the nigella sativa bioactive compound, in 6-hydroxydopamine-induced hemi-parkinsonian rat model. *Iran J Pharm Res.* 2014;13(1):227-34.
- Majithiya JB, Balaraman R. Metformin reduces blood pressure and restores endothelial function in aorta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* 2006 Apr;78(22):2615-24. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.10.020>.
- Kiasalari Z, Roghani M, Khalili M, Rahmati B, Baluchnejadmojarad T. Antiepileptogenic effect of curcumin on kainate-induced model of temporal lobe epilepsy. *Pharm Biol.* 2013 Dec;51(12):1572-78. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.803128>.
- Claiborne A. Catalase activity. In: Greenwald RA. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research.* Boca Raton: CRC Press. 1985; pp:283-84.
- Sureshbabu A, Ryter SW, Choi ME. Oxidative stress and autophagy: crucial modulators of kidney injury. *Redox Biol.* 2015;4:208-14. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.001>.
- Chen Y, Jin S, Teng X, Hu Z, Zhang Z, Qiu X, et al. Hydrogen Sulfide Attenuates LPS-Induced Acute Kidney Injury by Inhibiting Inflammation and Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2018 Jan;2018:6717212. <https://doi.org/10.1155/2018/6717212>.
- Pavlaou P, Liakopoulos V, Eleftheriadis T, Mitsis M, Dounousi E. Oxidative Stress and Acute Kidney Injury in Critical Illness: Pathophysiologic Mechanisms-Biomarkers-Interventions, and Future Perspectives. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:6193694. <https://doi.org/10.1155/2017/6193694>.
- Zhao J, Bi W, Xiao S, Lan X, Cheng X, Zhang J, et al. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Sci Rep.* 2019 Apr;9(1):5790. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42286-8>.
- Zhang C, Walker LM, Mayeux PR. Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced oxidant stress in the rat kidney. *Biochem Pharmacol.* 2000 Jan;59(2):203-209. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(99\)00324-x](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(99)00324-x).
- Beheshti F, Norouzi F, Abareshi A, Khazaei M, Alikhani V, Moussavi S, et al. Nigella sativa prevented liver and renal tissue damage in lipopolysaccharide-treated rats. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2018 May-Jun;29(3):554-66. <https://doi.org/10.4103/1319-2442.235184>.
- Kang S, Chen T, Hao Z, Yang X, Wang M, Zhang Z, et al. Oxymatrine Alleviates Gentamicin-Induced Renal Injury in Rats. *Molecules.* 2022 Sep;27(19):6209. <https://doi.org/10.3390/molecules27196209>.
- Altinoz E, Oner Z, Elbe H, Cigremis Y, Turkoz Y. Protective effects of saffron (its active constituent, crocin) on nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Hum Exp Toxicol.* 2015 Feb;34(2):127-34. <https://doi.org/10.1177/0960327114538989>.
- El-Fawal R, El Fayoumi HM, Mahmoud MF. Diosmin and crocin alleviate nephropathy in metabolic syndrome rat model: Effect on oxidative stress and low grade inflammation. *Biomed Pharmacother.* 2018 Jun;102:930-37. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.162>.
- Rajabalizadeh R, Ghasemzadeh Rahbardar M, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Renoprotective effects of crocin against

- colistin-induced nephrotoxicity in a rat model. *Iran J Basic Med Sci.* 2024;27(2):151-56. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2023.72808.15843>.
31. Liu H, Cheng H, Wang H, Wang Q, Yuan J. Crocin improves the renal autophagy in rat experimental membranous nephropathy via regulating the SIRT1/Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Ren Fail.* 2023;45(2):2253924. <https://doi.org/10.1080/0886022x.2023.2253924>.
32. Mard SA, Azad SM, Ahangarpour A. Protective Effect of Crocin on Gastric Mucosal Lesions Induced by Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Iran J Pharm Res.* 2016;15(Suppl):93-99.
33. Altinoz E, Cetinavci D, Abdulkareem Aljumaily SA, Elbe H, Cengil O, et al. Crocin, the compound of the dried stigma of *Crocus sativus* L (saffron), restores doxorubicin-induced disturbances in kidney functioning, oxidative stress, inflammation, renal tissue morphology and TGF- β signalling pathways. *Nat Prod Res.* 2025 Aug;39(16):4609-22. <https://doi.org/10.1080/14786419.2024.2344180>.
34. Abou-Hany HO, Atef H, Said E, Elkashef HA, Salem HA. Crocin mediated amelioration of oxidative burden and inflammatory cascade suppresses diabetic nephropathy progression in diabetic rats. *Chem Biol Interact.* 2018 Mar;284:90-100. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.02.001>.
35. Yarijani ZM, Pourmotabbed A, Pourmotabbed T, Najafi H. Crocin has anti-inflammatory and protective effects in ischemia-reperfusion induced renal injuries. *Iran J Basic Med Sci.* 2017 Jul;20(7):753-59. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2017.9005>.
36. Masalegoo A, Pirzad Jahromi G, Sahraei H, Alimohamadi Y. [Investigating the Effects of Crocin- Nanoparticle on Inflammatory Factors and Serum Oxidative Stress in the Chronic Stress Model of Male Rats]. *Journal of Military Medicine.* 2024;26(4):2409-19. <https://doi.org/10.30491/jmm.2024.1006752.1239>. [Article in Persian]