

بررسی اثرات آمیگدالین بر ساختار بافتی کلیه موش سفید کوچک آزمایشگاهی

دکتر فرزاد رجایی* - دکتر رضا محمودی** - دکتر محمدرضا ساروخانی* - دکتر محمد ریاستی***

* دانشیار مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
** دانشیار مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
*** پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین

چکیده

زمینه و هدف: آمیگدالین با نام تجاری لیترایل یک گلوکوزید سیانوزن با فعالیت ضد سرطانی می باشد که سمیت آن بر بافت ها، مورد بحث می باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات هیستولوژیک آمیگدالین بر کلیه موش سوری بود.

روش بررسی: ۳۲ سر موش سفید آزمایشگاهی نر بالغ به ۴ گروه کنترل، آمیگدالین ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم، تقسیم شدند. به موش های گروه تجربی، به مدت ۳۰ روز، آمیگدالین با غلظت های مورد نظر و به موش های گروه کنترل سالیन نرمال تزریق گردید. سه روز بعد از آخرین تزریق، پس از بیهوش نمودن حیوانات و باز نمودن شکم، کلیه ها از بدن حیوانات خارج و توزین شدند. پس از رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و اتوزین، لام های میکروسکوپی تهیه شدند. تعداد و اندازه گلوله های کلیوی، قطر لوله های پروکسیمال و دیستال در گروه های مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار Image Tool تعیین گردیدند.

یافته ها: نتایج مطالعه حاضر هیچ گونه تغییر معنی داری در تعداد و اندازه جسمک های کلیوی، قطر لوله های پروکسیمال و دیستال و حتی وزن کلیه در گروه های مورد مطالعه نشان نداد.

نتیجه گیری: مطالعه حاضر نشان داد که آمیگدالین با غلظت های ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم وزن، نمی تواند تغییرات معنی داری را در ساختمان بافت شناسی کلیه ایجاد نماید.

واژه های کلیدی: آمیگدالین، موش سوری، کلیه، بافت

تأیید مقاله: ۱۳۹۱/۱۰/۴

وصول مقاله: ۱۳۹۱/۵/۲۸

نویسنده پاسخگو: مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، ایران. farzadraj@yahoo.co.uk

مقدمه

آن نقش ضد سرطانی دارد (۷، ۶). آنزیم رودانز^۲ موجود در میتوکندری سلول های طبیعی، مانع از رهایی سیانید از آمیگدالین می شود اما سلول های بدخیم به دلیل نداشتن این آنزیم، سیانید را رها می کنند. در نتیجه، برخلاف سلول های طبیعی، سلول های سرطانی تخریب می شوند (۷).

با وجودی که آمیگدالین به عنوان یک داروی ضد سرطان مورد استفاده قرار می گیرد، گزارش هایی مبنی بر سمی بودن آن در انسان و حیوانات وجود دارد و مصرف آن ممکن است حتی به مرگ افراد منجر شود (۸). به عنوان مثال گزارش مرگ یک بیمار مبتلا به سیروز و سرطان کبد در سال ۱۹۸۶ را می توان ذکر کرد که نشان می دهد، مصرف ۳ گرم لیترایل باعث کاهش فشار خون، اسیدوز و کومای عمیق

ویتامین B ۱۷ با نام علمی آمیگدالین، یک ترکیب گلوکوزید سیانوزن می باشد که به عنوان داروی ضد سرطان، با نام تجاری لیترایل^۱ به فروش می رسد (۱). آمیگدالین از آمیگدالا به معنی بادام گرفته شده است و در درمان آسم، آفمیژم، جذام، فشار خون بالا، بسیاری از سرطان ها و تسکین درد نقش مؤثری دارد (۳، ۲). آمیگدالین در دانه بسیاری از میوه ها مانند زرد آلو، بادام، هلو، سیب، گیلان، گردو، فندق و گیاه Armeniacae semen یافت می شود (۵، ۴). آمیگدالین از نظر ساختمان شیمیایی از دو ملکول گلوکز، یک بنزوالدئید و یک اسید هیدروسیانیک تشکیل شده است. بخش بنزوالدئید آمیگدالین دارای ویژگی بی حس کنندگی است در حالی که بخش اسید هیدروسیانیک

1 - Laetrile
2 - Rhodanese

(Shandon-citadel 1000, UK) شامل فیکساسیون، آبگیری، شفاف سازی و آغشتگی انجام شد. سپس از نمونه‌ها توسط دستگاه میکروتوم دوار (Shandon-UK) برش‌های سریالی به ضخامت ۵ میکرون تهیه شد. در نهایت از هر نمونه، ۵ برش (برش‌های ۵ و ۸ و ۱۱ و ۱۷ و ۱۴)، به منظور پرهیز از شمارش مجدد یک سلول، انتخاب و پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین و تهیه لام‌های میکروسکوپی، از سه میدان دید از هر لام به طور تصادفی انتخاب و با دوربین دیجیتال (Coolpix-4500, Japan) با درشت‌نمایی ۴۰ میکروسکوپ (Olympus, AH2, Japan) عکس تهیه شد. سپس تعداد جسمک‌های مالپیگی، قطر جسمک‌های مالپیگی (فاصله‌ی بین غشاء پایه کپسول بومن تا نقطه متناظر در مقاطع گلوبمرول‌های کلیوی)، قطر لوله‌های دیستال و پروگزیمال (فاصله‌ی بین غشاء پایه لوله‌ها تا نقطه متناظر در مقطع عرضی) در گروه‌های چهارگانه، به کمک نرم‌افزار نیکون مدل Digital Sight DS-L2، تعیین شدند. داده‌های حاصله در گروه‌های مورد مطالعه، توسط نرم‌افزار آماری SPSS-Version 16 و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس، تحلیل شدند. $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

همان‌طور که در جدول شماره ۱ و شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود، میانگین وزن کلیه‌ها و میانگین تعداد جسمک‌های کلیوی

جدول ۱- میانگین وزن کلیه‌ها و تعداد جسمک‌های کلیوی در گروه‌های مورد مطالعه

گروه	وزن کلیه (گرم)	تعداد گلوبمرول
شاهد	(0.31 ± 0.16)	(9.75 ± 2.55)
آمیگدالین ۱۰	(0.27 ± 0.04)	(8.75 ± 2.81)
آمیگدالین ۲۵	(0.23 ± 0.03)	(9.75 ± 3.95)
آمیگدالین ۵۰	(0.25 ± 0.04)	(10.38 ± 3.4)

میانگین بصورت $SD \pm Mean$ داده شده است.

جدول ۲- میانگین قطر جسمک‌های کلیوی، لوله‌ی پروگزیمال، لوله‌ی دیستال در گروه‌های مورد مطالعه بر حسب میکرومتر

گروه	قطر گلوبمرول	قطر لوله‌ی پروگزیمال	قطر لوله‌ی دیستال
شاهد	(85.26 ± 6.78)	(9.75 ± 2.55)	(46.36 ± 10.54)
آمیگدالین ۱۰	(80.35 ± 11.58)	(8.75 ± 2.81)	(41.01 ± 5.08)
آمیگدالین ۲۵	(80.89 ± 5.51)	(9.75 ± 3.95)	(43.47 ± 3.49)
آمیگدالین ۵۰	(86.82 ± 14.40)	(10.38 ± 3.4)	(49.57 ± 7.06)

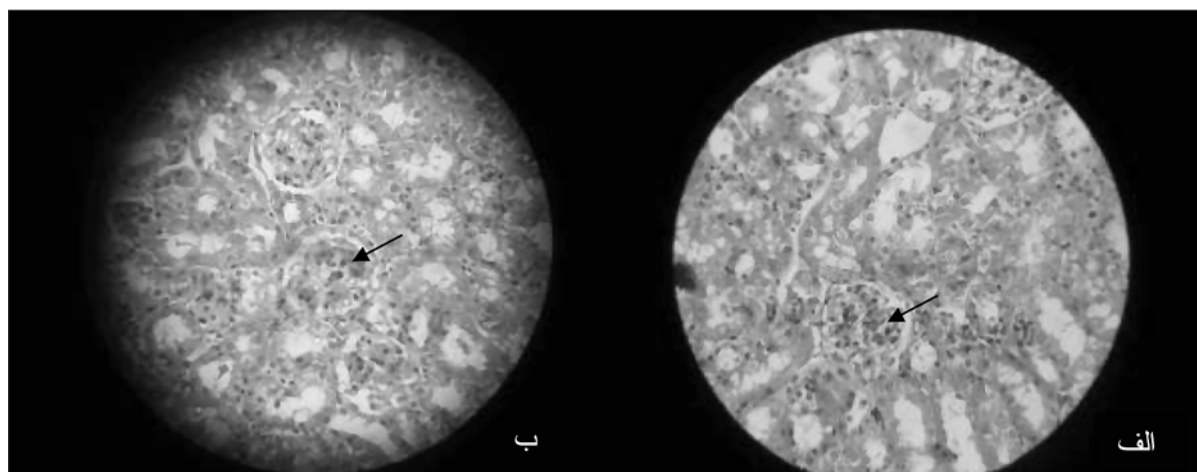
میانگین بصورت $SD \pm Mean$ داده شده است.

بیمار شد و در نهایت با آسیب شدید به کبد، منجر به مرگ وی گردید. این گزارش، نکروز شدید کبدی را با سمیت آمیگدالین در کبد مرتبط می‌داند (۹). در آزمایشات اولیه برای پیدا کردن غلظت مناسب آمیگدالین، مشاهده شد که تزریق ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم آمیگدالین، به صورت داخل صفاقی، باعث مرگ حیوانات می‌شود (۱۰). مطالعه دیگری نشان داد که مصرف بیش از حد بادام خام می‌تواند به بروز علائم مسمومیت با سیانید در بعضی از بیماران منجر شود (۱۱). مطالعات نشان داده‌اند که با توجه به حضور آنزیم بتا-گلوکوزیداز در کبد و فعالیت این آنزیم، بخش سیانید از ملکول آمیگدالین آزاد می‌شود که می‌تواند باعث بروز اثرات سمی این ماده بر کبد شود. افزایش نسبی غلظت این آنزیم در کبد، می‌تواند آسیب‌پذیر بودن این عضو در برابر آمیگدالین را توجیه نماید.

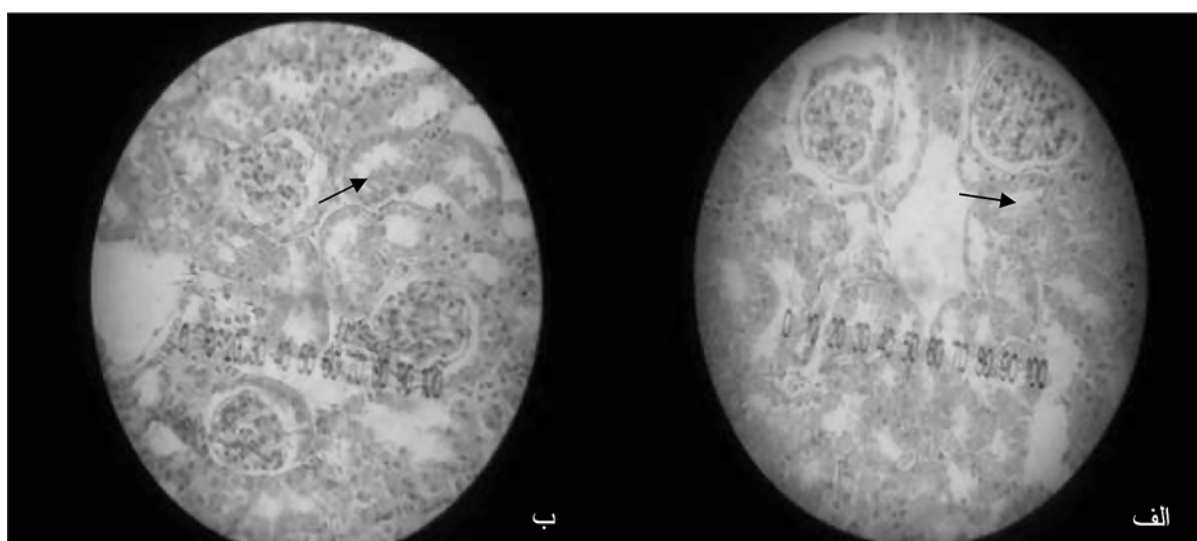
آمیگدالین در ناحیه ژنوم از روده باریک موش‌های صحرایی، در اثر فعالیت آنزیم (۶ و ۱) β گلوکوزیداز، به پرونازین هیدرولیز می‌شود. این فرآیند آنزیمی کاملاً وابسته به PH روده است. سیانید آزاد شده از آمیگدالین، باعث مسمومیت سلول‌ها و بافت‌ها می‌شود (۱۴-۱۲). با توجه به اهمیت کلیه در ترشح مواد دفعی و وجود مطالعات محدود در ارتباط با اثرات آمیگدالین بر ساختار بافتی کلیه، در مطالعه حاضر تغییرات مورفولوژیک کلیه موش سوری، به دنبال تجویز آمیگدالین، مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

این مطالعه از نوع تجربی در دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد. در ابتدا ۳۲ سر موش سفید کوچک آزمایشگاهی نر با وزن تقریبی ۲۰-۲۵ گرم از نژاد balb/c از انستیتو رازی کرج تهیه گردیدند. موش‌ها به مدت یک هفته در درجه حرارت 21 ± 2 سانتی‌گراد و دوره نوری طبیعی (۶ صبح تا ۶ عصر) در حیوانخانه دانشگاه به منظور تطابق با شرایط محیطی جدید نگهداری شده و امکان دسترسی به آب و غذای کافی فراهم گردید. موش‌ها، به صورت تصادفی، به ۴ دسته‌ی ۸ تایی تقسیم گردیدند. موش‌های هر گروه در قفس‌های مخصوص و مشابه به ابعاد $40 \times 20 \times 20$ سانتیمتر قرار گرفتند. یک گروه به عنوان شاهد و سه گروه دیگر به عنوان گروه‌های تجربی در نظر گرفته شدند. به هر کدام از گروه‌های تجربی آمیگدالین (Sigma, Germany) با دوزهای ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم و به صورت درون صفاقی به مدت ۳۰ روز تزریق گردید. به موش‌های گروه شاهد نیز سالیین نرمال به صورت درون صفاقی تزریق گردید. سه روز بعد از آخرین تزریق آمیگدالین، حیوانات در گروه‌های مورد مطالعه به روش جابجایی مهره‌های گردنی ۳ بیهوش شدند و سپس شکم حیوانات باز گردید. کلیه حیوان خارج شد و پس از اندازه‌گیری وزن کلیه، نمونه از بافت کلیه تهیه شده و نمونه‌های موردنظر در فرمالین ۱۰٪ ثابت (فیکس) شد. سپس مراحل پاساژ بافتی توسط دستگاه پردازش بافت



شکل ۱- نمای میکروسکوپ نوری از ناحیه ی قشری کلیه که در آن جسمک های مالپیگی با علامت پیکان در گروه کنترل (الف) و گروه آزمایش (ب) مشاهده می شوند. همان طور که مشاهده می شود قطر جسمک های کلیوی در دو گروه تغییری را نشان نمی دهد. بزرگ نمایی ۴۰۰ برابر.



شکل ۲: نمای میکروسکوپ نوری از ناحیه ی قشری کلیه که در آن لوله های پروگزیمال با علامت پیکان در گروه کنترل (الف) و گروه آزمایش (ب) مشاهده می شوند. همان طور که مشاهده می شود قطر لوله های پروگزیمال در دو گروه تغییری را نشان نمی دهد. رنگ آمیزی H&E و بزرگ نمایی ۴۰۰ برابر.

در گروه شاهد، گروه آمیگدالین ۱۰، گروه آمیگدالین ۲۵ و در گروه آمیگدالین ۵۰ نیز اختلاف آماری معنی داری را با یکدیگر نشان ندادند ($p=0.08$). همان طور که جدول و شکل شماره ۲ نیز نشان می دهند، میانگین اندازه ی قطر لوله های دیستال در گروه شاهد، گروه آمیگدالین ۱۰، گروه آمیگدالین ۲۵ و در گروه آمیگدالین ۵۰ اختلاف آماری معنی داری را با یکدیگر نشان ندادند ($p=0.06$).

در گروه شاهد، گروه آمیگدالین ۱۰، گروه آمیگدالین ۲۵ و در گروه آمیگدالین ۵۰ اختلاف آماری معنی داری را با یکدیگر نشان ندادند (به ترتیب $p=0.176$ و $p=0.123$). همچنین، مقایسه نتایج نشان داد که میانگین اندازه قطر جسمک های کلیوی در گروه شاهد، گروه آمیگدالین ۱۰، گروه آمیگدالین ۲۵ و در گروه آمیگدالین ۵۰ اختلاف آماری معنی داری با یکدیگر ندارند ($p=0.176$). میانگین اندازه ی قطر لوله های پروگزیمال در گروه شاهد، گروه آمیگدالین ۱۰، گروه

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، اثر سمیت آمیگدالین به دنبال استفاده از غلظت‌های مختلف آن بر روی تغییرات مورفومتریک بافت کلیه، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میانگین وزن کلیه‌ها، میانگین تعداد و اندازه‌ی قطر گلومرول‌ها، اگرچه با افزایش غلظت‌های مختلف تزریقی آمیگدالین تغییراتی را نشان می‌دهند ولی آنالیز آماری، اختلاف معنی‌داری را بین آن‌ها نشان نداد. بیشتر مطالعات قبلی به خصوصیات ضد سرطانی و ضد دردی این ماده و عوارض ناشی از سمیت کبدی این ماده پرداخته‌اند (۱۷-۱۵) و مطالعه‌ای که اثرات سمی آمیگدالین را بر تغییرات مورفومتریک کلیه مورد بررسی قرار دهد، وجود ندارد. در مطالعه‌ای نشان داده شده است که تزریق آمیگدالین به صورت داخل صفاقی در غلظت‌های ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌تواند به افزایش تعداد سلول‌های چند هسته‌ای کبدی و سلول‌های کوپفر منجر شود ولی بر تعداد سلول‌های نکروزه در کبد موش سفید آزمایشگاهی اثری نداشته است (۱۸). مطالعه دیگری نقش دوگانه آمیگدالین بر رشد و تکثیر سلول‌های پوششی را در محیط کشت سلولی نشان می‌دهد که از آلوئول ریه جنین ۲۰ روزه‌ی موش صحرایی تهیه شده بود. بر اساس این مطالعه، آمیگدالین در غلظت‌های پایین ($200-50 \mu\text{mol/L}$)، باعث تحریک تقسیم سلولی و در غلظت‌های بالا ($400 \mu\text{mol/L}$)، باعث مهار رشد و تکثیر سلولی می‌شود (۱۵). مطالعه حاضر نیز نشان داد که آمیگدالین با غلظت پایین‌تر از دوز آستانه‌ای، یعنی ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، نمی‌تواند تغییرات مورفومتریک در بافت کلیه موش کوچک آزمایشگاهی ایجاد کند. مطالعات نشان می‌دهند که تجویز خوراکی آمیگدالین با غلظت مشابه (600 mg/kg) در موش‌های صحرایی با نژادهای متفاوت، باعث تولید سطوح متفاوت از سیانید در خون حیوانات می‌شود و ممکن است علائم متفاوتی از مسمومیت در حیوانات مشاهده شود. بنابراین میزان سمیت آمیگدالین به نژاد حیوان بستگی دارد (۱۵). از طرف دیگر، گزارش‌ها نشان می‌دهند که فعالیت فلور میکروبی روده در حیوانات مختلف و حتی نژادهای مختلف، متفاوت است (۱۶). بنابراین، تفاوت در نوع حیوانات در مطالعه حاضر (موش سفید آزمایشگاهی)

با مطالعات قبلی (موش‌های صحرایی)، از یک طرف و غلظت‌های کمتر آمیگدالین تزریقی در مطالعه حاضر نسبت به مطالعات قبلی (50 mg/kg در برابر 500 mg/kg) از طرف دیگر، ممکن است توجه‌کننده نتایج متفاوت مطالعات باشد.

Sadettin و همکاران نشان دادند که غلظت‌های مختلف آمیگدالین باعث کاهش معنی‌داری در سه پارامتر مهم اسپرم یعنی تحرک، مورفولوژی و فعالیت هیالورونیداز اسپرم می‌شود و آمیگدالین به عنوان ماده‌ای با اثرات منفی بر باروری اسپرم‌ها معرفی شد (۱۷). همچنین نشان داده شد که آمیگدالین با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، تکثیر سلول‌های فیبروبلاست تهیه شده از پاپیلای کلیوی را مهار می‌کند و غلظت 100 mg/L بیشترین اثر مهاری را دارد (۱۹). تفاوت نتایج مطالعه فوق با نتایج مطالعه حاضر می‌تواند به دلیل تفاوت در غلظت‌های تزریقی آمیگدالین و تفاوت در روش مطالعه باشد. در مطالعه حاضر، غلظت‌های آمیگدالین تزریقی کمتر از مطالعات قبلی بوده است (50 mg/kg در برابر 100 mg/kg تا 500 mg/kg) و این محدوده غلظتی از آمیگدالین قادر به ایجاد تغییرات مورفومتریک در حیوان نبوده است. در ضمن، مطالعه حاضر به صورت درون تنی (In vivo) بوده در حالی که، مطالعه قبلی به صورت برون تنی (In vitro) بوده و نتایج مطالعات برون تنی به دلیل تأثیر عوامل مضر در محیط‌های کشت می‌تواند با نتایج درون تنی متفاوت باشد (۲۰).

بنابراین مطالعه‌ی حاضر نشان داد که آمیگدالین با غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن، نمی‌تواند تغییرات معنی‌داری را در ساختار بافت شناسی کلیه ایجاد نماید و جهت تأیید نتایج مطالعه حاضر، لازم است مطالعات دیگری با غلظت‌های بالاتری از آمیگدالین و به روش خوراکی و حتی در حیوانات دیگر انجام شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین برای تأمین هزینه انجام این مطالعه و خانم حاجی آقایی به جهت همکاری در تهیه مقاطع میکروسکوپی تقدیر و تشکر می‌شود.

References

- 1- Yıldırım AN, San B, Koyuncu F, Yıldırım F. Variability of phenolics, α -tocopherol and amygdalin contents of selected almond (*Prunus amygdalus Batsch.*) genotypes. *JFAE*. 2010; 8 (1): 76 - 9.
- 2- Milazzo S, Lejeune S, Ernst E. Laetrile for cancer: A systematic review of the clinical evidence. *Support Care Cancer*. 2007; 15(6): 583-95.
- 3- Chang HK, Yang HY, Lee TH, Shin MC, Lee MH, Shin MS, et al. Amygdalin Induces Apoptosis through Regulation of Bax and Bcl-2 Expressions in Human DU145 and LNCaP Prostate Cancer Cells. *Biol Pharm Bull*. 2006; 29(8): 1597-602
- 4- Park HJ, Yoon SH, Han LS, Zheng LT, Jung KH, Uhm YK, et al. Amygdalin inhibits genes related to cell cycle in SNU-C4 human colon cancer cells. *World J Gastroenterol*. 2005; 11(33): 5156-61.
- 5- Milbury PE, Chen CY, Dolnikowski GG and Blumberg JB. Determination of flavonoids and phenolics and their distribution in almonds. *J Agric Food Chem*. 2006; 54(14): 5027-33.
- 6- Hwang HJ, Lee HJ, Kim CJ, Shim I, Hahm DH. Inhibitory effect of amygdalin on lipopolysaccharide-inducible TNF- α and IL-1 β mRNA expression and carrageenan-induced rat arthritis. *J Microbiol Biotechnol*. 2008; 18(10):1641-7.
- 7- Haisman DR, Knight DJ, The enzymic hydrolysis of amygdalin. *Biochem J*. 1967; 103(2): 528-34.
- 8- Rosen GM, Shorr RI. Laetrile: End play around the FDA. A review of legal developments. *Ann Intern Med*. 1979; 90(3): 418-23.
- 9- Leor R, Michaeli J, Brezis M, Stessman J. Laetrile intoxication and hepatic necrosis: A possible association. *South Med J*. 1986; 79(2): 259-60
- 10- Greenberg DM. The case against laetrile: The fraudulent cancer remedy. *Cancer J*. 1980; 45(4): 799-807.
- 11- Moertel CG, Fleming TR, Rubin J, Kvols LK, Sarna G, Koch R, et al. A clinical trial of amygdalin (Laetrile) in the treatment of human cancer. *N Engl J Med*. 1982; 306(4): 201-6.
- 12- Adewusi SR, Oke OL, On the metabolism of Amygdalin: The LD50 and biochemical changes in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 1985; 63(9): 1080-3.
- 13- Hays SW, Wheeler ED, Eghtesad B, Glew HR, Johnston AE, The American Association for the Study of Liver Diseases: Hepatology. 1998; 28: 156-63.
- 14- Strugala GJ, Rauws AG, Elbers R. Intestinal first pass metabolism of amygdalin in the rat in vitro. *Biochem Pharmacol*. 1986; 35(13): 2123-8.
- 15- Zhu H, Chang L, Li W, Liu H. Effect of amygdalin on the proliferation of hyperoxia-exposed type II alveolar epithelial cells isolated from premature rat. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2004; 24(3): 223-5
- 16- Carter JH, McLafferty MA, Goldman P. Role of the gastrointestinal microflora in amygdalin (laetrile)-induced cyanide toxicity. *Biochem Pharmacol*. 1980; 29(3): 301-4.
- 17- Sadettin T, Tanzer B. In Vitro effects of Linamarin, Amygdalin and Gossypol Acetic Acid on Hyaluronidase Activity, Sperm Motility and Morphological Abnormality in Bull Sperm. *Turk J Vet Anim Sci*. 2004; 28: 819-24.
- 18- Rajaei F., Mohammadian A. The histologic effects of amygdalin on mouse liver, *Journal of Birjand University of Medical Sciences*. 2011; 18(4): 242-9. [persian]
- 19- Guo JQ, Sheng M X, Wang L J, Tan J M , Wu W Z , Yang S L . Inhibitory effect of amygdalin on human renal fibroblast proliferation. *CRTER*. 2008; 12 (18): 3575-8.
- 20- Brison DR., Schultz RM. Apoptosis during mouse blastocyst formation: Evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol Reprod*. 1997; 56: 1088-1096.