



تاثیر عصاره هیدروالکلی پوست میوه هندوانه (*Citrullus vulgaris Schrad.*) بر جلوگیری از کریستالیزاسیون اگزالات کلسیم در *In vitro*

مریم عیدی*

دانشیار فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین، ورامین

مسیح بهار

دانشجوی دکتری ژنتیک پزشکی، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

اکرم عیدی

دانشیار فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران

امید پویان

اورولوژیست، بخش اورولوژی، بیمارستان لاله، تهران

پونه شاه محمدی

کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین، ورامین، ایران

محل انجام پژوهش: گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین

تاریخ پذیرش: ۸۹/۶/۲۷

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۲۵

چکیده

در طب سنتی ایران، از گیاهان و روش‌های درمانی متعددی برای درمان سنگ‌های کلیوی استفاده می‌شود، ولی هنوز هم تشکیل این سنگ‌ها و درمان آن، از مشکلات مهم جامعه پزشکی و بیماران است. هدف پژوهش حاضر، بررسی اثر عصاره هیدروالکلی پوست میوه هندوانه (*Citrullus vulgaris Schrad.*) بر جلوگیری از کریستالیزاسیون اگزالات کلسیم در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) می‌باشد. ابتدا عصاره هیدروالکلی پوست میوه هندوانه در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. نمونه‌های ادرار شبانه از ۶ مرد بالغ که سابقه بیماری سنگ کلیوی نداشتند، جمع‌آوری و سانتریفیوژ شدند. کریستالیزاسیون اگزالات کلسیم با اضافه کردن اگزالات سدیم به نمونه‌های ادرار القا شد. پس از اضافه کردن اگزالات سدیم، تعداد کریستال‌ها با استفاده از جذب نوری، توسط اسپکتروفوتومتر و اندازه کریستال‌ها، توسط کالیبره‌کردن عدسی چشمی میکروسکوپ نوری در نمونه‌های کنترل (بدون عصاره گیاهی) و نمونه‌های تجربی (در حضور غلظت‌های مختلف عصاره گیاه) اندازه‌گیری شد. غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی پوست میوه هندوانه موجب افزایش درصد کریستال‌های کوچک ۵-۲/۵ و ۹-۶ میکرومتری و کاهش

* مسئول مکاتبات: گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین، تهران، صندوق پستی: ۶۱۷-۱۶۵۳۵، پست الکترونیکی: eidi@iauvaramin.ac.ir

کریستال‌های بزرگ ۲۱-۱۷، ۳۰-۲۲ و ۴۰-۳۱ میکرومتری می‌شود. از طرف دیگر، عصاره هیدروالکلی پوست میوه هندوانه موجب افزایش کریستال‌های کوچک مونو هیدرات‌های اگزالات کلسیم و کاهش کریستال‌های بزرگ مونو هیدرات‌های اگزالات کلسیم شده است. همچنین، عصاره هیدروالکلی پوست هندوانه باعث افزایش جذب نوری و یا افزایش تعداد کریستال‌های اگزالات کلسیم شده است. تحقیق حاضر نشان داد عصاره هیدروالکلی پوست میوه هندوانه با کاهش اندازه کریستال‌های اگزالات کلسیم، موجب سهولت دفع آن‌ها توسط ادرار می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پوست میوه هندوانه، اگزالات کلسیم، کریستالیزاسیون، ادرار

مقدمه

بیماری سنگ کلیه مشکلی جهانی است که به نژاد، منطقه جغرافیایی و فرهنگ خاصی ارتباط ندارد (۲،۱). اگر این بیماری درمان نشود، سرعت وقوع مجدد آن، طی یک سال، تقریباً ۱۰ درصد و در مدت ۵ سال به ۳۳ درصد می‌رسد (۳). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد متوسط شیوع سنگ‌های کلیوی در افراد مذکر بین ۷ تا ۱۵ درصد و در افراد مؤنث تنها بین ۳ تا ۶ درصد است (۴،۵،۶). سنگ‌های اگزالات کلسیم خالص یا آن‌هایی که دارای فسفات کلسیم هستند، معمول‌ترین و علت تشکیل اکثریت آن‌ها ناشناخته است. تشکیل سنگ اگزالات کلسیم (urolithiasis) از نظر بیماری‌زایی، پدیده‌ای چندعاملی است و می‌توان آن را با عوامل محیطی، مثل آب و هوا، شغل، کشور یا محیط زیست، نژادهای مختلف و نیز عوامل فیزیوشیمیایی مهمی که بر تشکیل سنگ‌های کلیوی اثر دارند، مرتبط دانست. تشکیل سنگ اگزالات کلسیم شامل مراحل مختلفی مانند افزایش انباشته شدن اگزالات کلسیم و کلسیم فسفات و نوکلئاسیون، رشد کریستال و تجمع کریستال‌ها و ابقای کریستال است (۷).

مطالعات نشان می‌دهد استفاده از گیاهان دارویی برای درمان سنگ کلیه سابقه دیرینه دارد. در طب سنتی ایران نیز از گیاهان دارویی زیادی برای دفع یا حل کردن سنگ‌های کلیوی و یا جلوگیری از تشکیل آن‌ها استفاده شده است (۸)، هر چند مکانیسم عمل بسیاری از آن‌ها هنوز به درستی روشن نشده است.

هندوانه (*Citrullus vulgaris* Schrad.) گیاهی

است از تیره کدویان (Cucurbitaceae) با بوته کوتاه که ساقه‌هایش روی زمین می‌خوابد. هندوانه، ساقه‌ای پیچک‌دار و برگ‌هایی با بریدگی‌های عمیق و منقسم به لوب‌های مدور دارد. گل‌های آن زردرنگ و میوه‌اش آبدار و خوراکی است. آب هندوانه دارای اسید آمینه‌ای به نام سیترولین (Citrulline) است. هندوانه اثر مدر و طعمی مطبوع دارد. در طب ایرانی، آب هندوانه را به‌عنوان خنکی به بیماران مبتلا به تب و بیماری‌های عفونی می‌دهند. تخم هندوانه دارای ماده روغنی و خوراکی است. روغن دانه که مقدار آن در مغز دانه، به ۶۵ درصد می‌رسد، حالت روان، رنگ زرد روشن و طعم و بوی ملایم دارد. وزن مخصوص آن در گرمای ۱۵ درجه بین ۰/۹۱۶ و ۰/۹۲۵ است. دارای اسیدهای چرب اشباع‌شده و اشباع‌نشده (اولئیک ۱۲ تا ۴۳ درصد و لینولئیک به مقدار ۲۵ تا ۶۶ درصد) است. هندوانه به مصارف تغذیه نیز می‌رسد. پوست میوه هندوانه و خربزه ممکن است صاف، به رنگ‌های مختلف، ساده و یا دارای تزئیناتی به اشکال مختلف باشد (۹).

خاستگاه هندوانه، جنوب آفریقا است. این گیاه گل‌دار، دارای میوه ثنوی است. هندوانه که به‌طور غلط، گونه‌ای از خربزه در نظر گرفته می‌شود (اگرچه در رده *Cucumis* نیست) دارای قشری بیرونی و نیز گوشت داخلی شیرین، آبدار و معمولاً قرمز رنگ است. در گذشته به این میوه تربوزه می‌گفته‌اند و هنوز هم در افغانستان و تاجیکستان

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی گیاه

پوست میوه هندوانه پس از شناسایی تاکسونومیک، از میوه، جدا و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در سایه، خشک شد و توسط آسیاب مکانیکی به پودر تبدیل گردید. پودر خشک گیاه در کیسه‌های نایلونی تا زمان آزمایش در فریزر نگهداری شد.

آماده‌سازی عصاره الکلی گیاه

۳۰ گرم از پودر پوست میوه هندوانه با اتانل ۸۰ درصد مخلوط شد. سپس، مخلوط حاصل در دستگاه سوکسله قرار گرفت. عصاره به‌دست آمده، ابتدا توسط فیلتر میکروپور، صاف و سپس توسط روتاری خشک گردید. در زمان آزمایش، عصاره گیاه با استفاده از آب مقطر در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آماده شد (۱۰).

نمونه‌های ادراری

نمونه‌های ادرار شبانه از ۶ مرد بالغ که سابقه بیماری سنگ کلیوی نداشتند، تهیه شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه و ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند تا نمونه‌های شفاف، فاقد سلول یا ذرات دیگر بدست آید که در مطالعه کریستال‌ها اختلال ایجاد ننماید. بخش رویی نمونه‌های ادراری، جدا شد و هر نمونه، به بخش‌های کنترل (بدون عصاره) و تجربی (اضافه کردن عصاره گیاه در غلظت‌های مختلف) تقسیم گردید (۱۰).

القای کریستالیزاسیون اگزالات کلسیم در نمونه‌های

ادراری

با استفاده از محلول ۰/۱ مولار اگزالات سدیم، تشکیل کریستال‌های اگزالات کلسیم در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد در نمونه‌های ادراری کنترل و تجربی، القا گردید (۱۰).

به آن تربوزه گفته می‌شود. ریشه کلمه هندوانه از کلمه "وانا" گرفته شده است که به معنی هندوانه در زبان هندی است و ایرانیان قدیم آن را "هندو وانا" می‌گفتند.

هندوانه، میوه‌ای است شیرین و آبدار که نه تنها باعث رفع تشنگی در هوای گرم تابستان می‌شود، بلکه اثرات بسیار مفید دیگری نیز دارد که برای ما ناشناخته است. هندوانه منبع غنی ویتامین A (به شکل بتاکاروتن) و ویتامین C است. این میوه پرفایده، التهاباتی را که در بیماری‌هایی مثل آسم، تصلب شرائین، سرطان روده و التهاب مفاصل وجود دارد، از بین می‌برد و درعین حال، منبع خوبی از آنتی‌اکسیدان کاروتنوئیدی بنام لیکوپن است. لیکوپن، رنگدانه‌ای شیمیایی است که باعث ایجاد رنگ قرمز در هندوانه می‌شود و اثرات ضداکسیدانی قوی دارد. این آنتی‌اکسیدان به تمامی نقاط بدن وارد می‌شود و رادیکال‌های آزاد را خنثی می‌کند. یک لیوان هندوانه، ۲۰ درصد نیاز روزانه به ویتامین C و ۱۴ درصد نیاز روزانه به ویتامین A را تامین می‌کند.

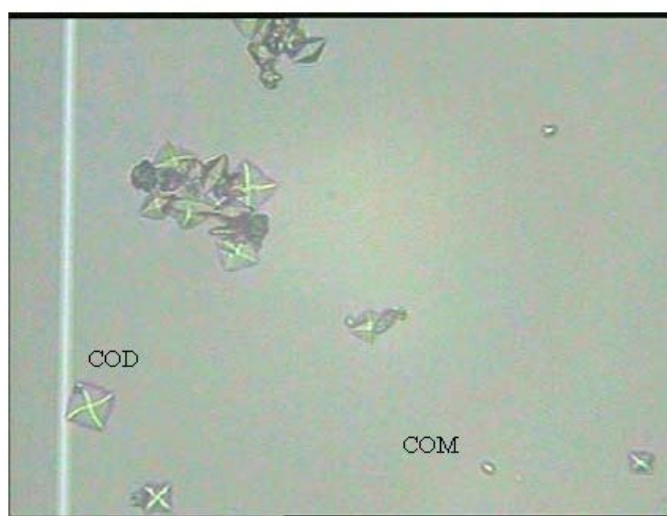
هندوانه از لحاظ ویتامین‌های گروه B نیز که برای تولید انرژی لازم هستند، غنی است و منبع خوبی از ویتامین‌های B₁، B₆، B₅ (اسید پانتوتنیک)، بیوتین (نوعی ویتامین B) و نیز منیزیم، پتاسیم و فیبر غذایی است. پس می‌توان گفت که این میوه، ارزش غذایی بالایی دارد. هندوانه دارای آب فراوان و انرژی اندک است. در نتیجه، نسبت به سایر میوه‌ها، مواد مغذی بیشتری در هر کالری دارد که نشان‌دهنده اثرات مفید آن در بهبود سلامتی بدن است (۹).

تاکنون گزارش دقیقی در مورد اثر این گیاه بر تشکیل کریستال‌های اگزالات کلسیم ارائه نشده است. لذا، پژوهش حاضر بر آن است تا اثر پوست میوه هندوانه را که در طب سنتی ایران برای درمان سنگ‌های کلیوی پیشنهاد شده بر فرایند کریستالیزاسیون اگزالات کلسیم در *in vitro* در ادرار مورد بررسی قرار دهد.

مطالعه کریستالیزاسیون اگزالات کلسیم

یک ساعت پس از اضافه کردن اگزالات سدیم، تعداد کریستال‌ها با استفاده از جذب نوری، توسط اسپکتروفوتومتر و اندازه کریستال‌ها، توسط کالیبره کردن عدسی چشمی میکروسکوپ نوری در نمونه‌های کنترل (بدون عصاره گیاهی) و نمونه‌های تجربی (در حضور غلظت‌های مختلف عصاره گیاه) اندازه‌گیری شد. کریستال‌های مورد مطالعه، بر دو نوع کریستال‌های بیضوی شکل مونو هیدرات اگزالات کلسیم

(Calcium oxalate monohydrate, COM) و مربعی شکل دی هیدرات اگزالات کلسیم (Calcium oxalate dihydrate, COD) بودند. کریستال‌های COM بر دو نوع کوچک (۱ میکرومتر) و بزرگ (۳-۵ میکرومتر) بودند (۹) (تصویر ۱). کریستال‌های COD بر اساس قطر کریستال‌ها بر حسب میکرومتر در گروه‌های ۲/۵-۵، ۶-۹، ۱۰-۱۶، ۱۷-۲۱، ۲۲-۳۰ و ۳۱-۴۰ طبقه‌بندی شدند (۱۰).



تصویر ۱ - کریستال‌های بیضوی شکل مونو هیدرات اگزالات کلسیم (COM) و مربعی شکل دی هیدرات اگزالات کلسیم (COD).

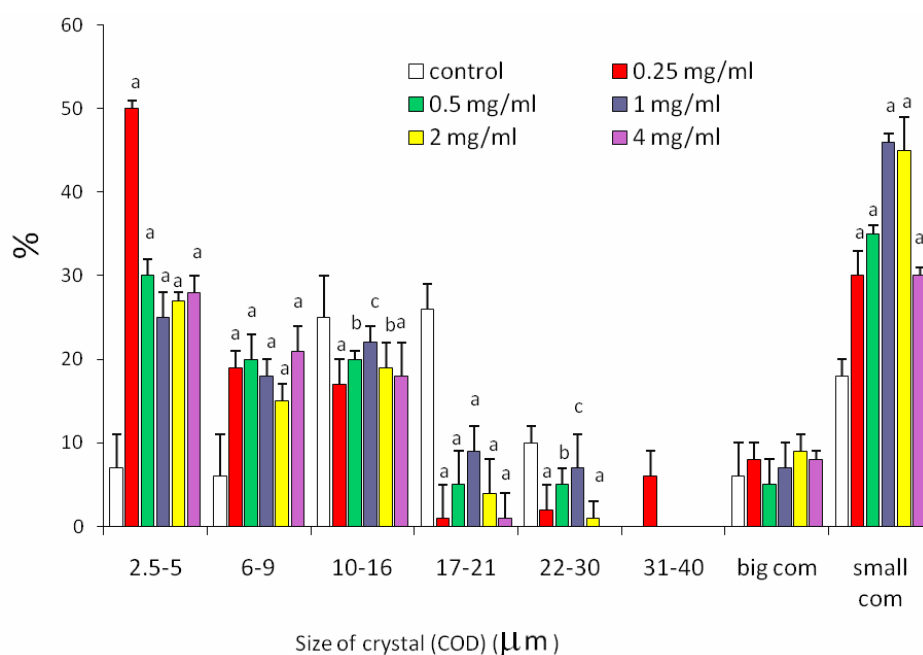
مقایسه قرار گرفتند. عصاره هیدروالکلی پوست هندوانه موجب افزایش درصد کریستال‌های کوچک ۲/۵-۵ و ۶-۹ میکرونی و کاهش کریستال‌های بزرگ ۱۰-۱۶، ۱۷-۲۱ و ۲۲-۳۰ میکرومتری می‌گردد. از طرف دیگر، عصاره هیدروالکلی پوست هندوانه موجب افزایش کریستال‌های کوچک مونو هیدرات اگزالات کلسیم می‌شود (نمودار ۱). عصاره هیدروالکلی پوست هندوانه موجب افزایش جذب و یا افزایش تعداد کریستال‌های اگزالات کلسیم می‌گردد (نمودار ۲).

آنالیز آماری

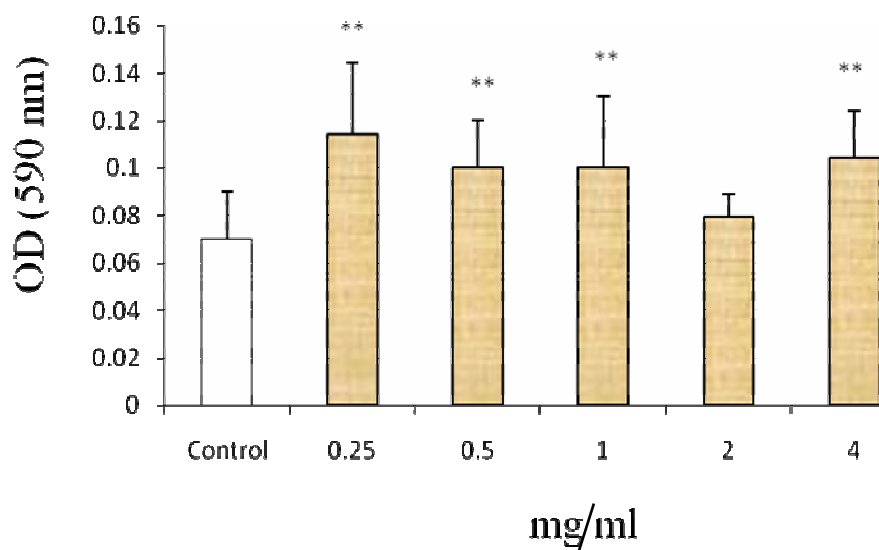
داده‌های به‌دست آمده با استفاده از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه بررسی شدند. مرز استنتاج آماری $p < 0.05$ بود.

نتایج

در پژوهش حاضر، کریستالیزاسیون اگزالات کلسیم در شرایط عدم حضور عصاره گیاهی (کنترل) و در حضور غلظت‌های مختلف ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی پوست میوه هندوانه مورد



نمودار ۱ - تاثیر عصاره هیدروالکلی پوست میوه هندوانه بر قطر کریستال‌های اگزالات کلسیم. $p < 0.05$ c, $p < 0.01$ b, $p < 0.001$ a. اختلاف از گروه کنترل را نشان می‌دهند. COM = مونوهیدرات اگزالات کلسیم؛ COD = دی‌هیدرات اگزالات کلسیم



نمودار ۲ - اثر عصاره هیدروالکلی پوست هندوانه بر جذب نوری (OD_{590}) نمونه‌های ادرار. $p < 0.01$ ** اختلاف از گروه را نشان می‌دهد.

بحث

حل کردن سنگ‌های کلیوی از زمان قدیم متداول بوده و استفاده از آن‌ها به دلیل سهل الوصول و ارزان بودن، رو به افزایش است. تحقیق حاضر، به منظور بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی پوست میوه هندوانه بر جلوگیری از

گیاهان دارویی، با عوارض جانبی کمتر و به دلیل طبیعی بودن، جایگزین‌های مناسبی برای داروهای شیمیایی بوده و در نواحی مختلف جهان کاربرد گسترده‌ای دارند. استفاده از گیاهان دارویی برای دفع یا

می‌شود (۱۰). Micali و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند گیاه *Phyllanthus niruri* کارایی دستگاه سنگ‌شکن را برای درمان سنگ‌های کلیوی افزایش می‌دهد (۱۱). حضور موادی مانند منیزیم، سیترات یا ماکرومولکول‌هایی مانند گلیکوزآمینوگلیکان‌ها، استئوپونتین، نفروکالسن در ادرار، مانع رشد سنگ‌های ادراری می‌گردد (۱۵-۱۲). گیاه *Phyllanthus niruri* در دفع ادراری منیزیم، سیترات یا گلیکوزآمینوگلیکان‌ها دخالت ندارد، بلکه جذب موادی را به داخل سنگ ادراری موجب می‌شود که آن‌ها را کوچک‌تر و نرم‌تر می‌کند (۱۶). بنابراین، پژوهش حاضر تایید کننده کاربرد سنتی پوست میوه هندوانه بر جلوگیری از تشکیل یا دفع سنگ‌های کلیوی اگزالات کلسیمی است و بایستی در پژوهش‌های آینده برای مطالعه عوامل موثر بر درمان بیماری سنگ کلیه، مورد بررسی دقیق‌تری قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از معاونت پژوهشی واحد ورامین - پیشوا به واسطه تامین بودجه لازم برای انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین، از سرکار خانم نرگس میرالهی و جناب آقای غلام فاتح، کارشناسان محترم شرکت بهارافشان که در انجام پژوهش حاضر همکاری صمیمانه‌ای داشتند، سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. Bichler, K. H., Strohmaier, W. L., Korn, S. 1985. Urolithiasis in childhood. *Monatsschr Kinderheild.* 133:256-66.
2. Favazza, T., Midha, M., Martin, J., Grob, B.M. 2004. Factors influencing bladder stone formation in patients with spinal cord injury. *J. Spinal Cord Med.* 27:252-4.

کریستالیزاسیون اگزالات کلسیم در نمونه‌های ادراری در شرایط *in vitro* انجام گرفت. در پژوهش حاضر، سعی بر آن بوده است که آزمایش در شرایطی مشابه با محیط بدن، مانند دما و بافر (سالین) انجام گیرد (۱۰).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که پوست میوه هندوانه موجب تشکیل کریستال‌های کوچک‌تر اگزالات کلسیم می‌گردد که دفع این دسته از کریستال‌ها توسط جریان ادرار آسان‌تر است. از طرف دیگر، این گیاه مانع به هم چسبیدن کریستال‌های اگزالات کلسیم و تشکیل هسته مرکزی سنگ‌های کلیوی می‌شود. همچنین، فراوانی کریستال‌های مونوهیدرات اگزالات کلسیم را در مقایسه با کنترل افزایش می‌دهد، در حالی که در نمونه‌های کنترل، فراوانی کریستال‌های دی‌هیدرات اگزالات کلسیم، بیشتر است. هرچند مکانیسم اثر پوست میوه هندوانه در جلوگیری از تشکیل کریستال‌های بزرگ هنوز مشخص نشده است، ولی این گیاه در طب سنتی ایران برای درمان سنگ کلیه توصیه می‌شود (۸).

مطالعات مشابهی در شرایط *in vitro* در مورد تشکیل سنگ‌های اگزالات کلسیمی انجام گرفته است. Barros و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند گیاه *Phyllanthus niruri* که در طب سنتی برزیل برای درمان سنگ کلیه استفاده می‌شود، موجب کاهش کریستالیزاسیون اگزالات کلسیم در شرایط *in vitro*

3. Uribarri, J., Oh, M. S., Carroll, H. J. 1989. The first kidney stone. *Ann. Intern. Med.* 111:1006-9.
4. Ljunghall, S., 1977. Renal stone disease. *Studies of epidemiology and calcium metabolism.* *Scand. J. Urol. Nephrol.* 41:1- 96.
5. Robertson, W. G., Peacock, M., Baker, M. 1983. Studies on the prevalence and epidemiology of

- urinary stone disease in men in Leeds. Br. J. Urol. 55:595-8.
6. Parks, J. H., Coe, F. L. 1986. A urinary calcium–citrate index for the evaluation of nephrolithiasis. *Kidney Int.* 30:85-90.
7. Basavaraj, D. R., Biyani, C .S., Browning, A. J., Cartledge, J. J. 2007. The role of urinary kidney stone inhibitors and promoters in the pathogenesis of calcium containing renal stones. *eau-ebu update series* 5:126-36.
8. Safaei, M. 2004. Summary of Iranian Medical Plants books. Chaharbagh Press, Iran. 104-17.
9. Zargari, A. 1997. Medicinal Plant, Tehran University Press, Iran 2:385-7.
10. Barros, M. E., Schor, N., Boim, M. A. 2003. Effects of an aqueous extract from *Phyllanthus niruri* on calcium oxalate crystallization in vitro. *Urol. Res.* 30:374-9.
11. Micali, S., Sighinolfi, M. C., Celia, A., De Stefani, S., Grande, M., Cicero, A. F., Bianchi, G., 2006. Can *Phyllanthus niruri* affect the efficacy of extracorporeal shock wave lithotripsy for renal stones? A Randomized, Prospective, Long-Term Study. *J. Urol.* 176:1020-2.
12. Coe, F. L., Parks, J. H., Nakagauwa, Y. 1992. Inhibitors and promoters of calcium oxalate crystallization: their relationship to the pathogenesis and treatment of nephrolithiasis. In: Coe FL, Parks JH, Nakagauwa Y (eds.) Disorders of bone and mineral metabolism. Raven Press, New York 757.
13. Dussol, B., Berland, Y. 1998. Urinary kidney stone inhibitors. What is new? *Urol. Int.* 60: 69-73.
14. Ryall. R. L., Harnett, R. M., Marshall, V.R. 1981. The effect of urine, pyrophosphate, citrate, magnesium of calcium crystals in vitro. *Clin. Chim. Acta.* 112:349-56.
15. Worcester, E. M. 1996. Inhibitors of stone formation. *Semin. Nephrol.* 5:474-86.
16. Fretas, A. M., Carvente, C. T., Schor, N., Boim, M. A. 2000. The effect of *Phyllanthus niruri* on urinary excretion of endogenous inhibitors of lithogenesis. In Rodgers AL, Hibbert BE, Hess B, Khan SR, Preminger GM (eds.). Proceedings of Ninth International Symposium on Urolithiasis vol 1. Cape Town. 183.

