

Protective Effects of Hydroalcoholic Extract of *Nasturtium Officinale* against Gentamicin Induced Mitochondrial Dysfunction in Rat Kidney

Somayeh Shahani¹,
Farzaneh Behzadfar²,
Daniel Jahani³,
Fatemeh Shaki⁴

¹ Assistant Professor, Department of Pharmacognosy and Biotechnology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Pharm.D. Student in Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ MSc Student in Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received September 10, 2016 ; Accepted January 28, 2017)

Abstract

Background and purpose: In this study, we evaluated the protective effects of hydroalcoholic extract of *Nasturtium officinale* (watercress) against GM-induced mitochondrial dysfunction on isolated rat kidney mitochondria.

Materials and methods: In this study, 36 Wistar rats were divided into six groups (n=6 per group): control, solvent, GM (80 mg/kg IP), and GM and three doses (50, 100, 200 mg/kg/day, IP) of hydroalcoholic extract of aerial parts of watercress. After 10 consecutive days of injection, the animals were killed and kidney tissues were separated. Then, the mitochondria were isolated using different centrifuge technique and the parameters of mitochondrial damage were evaluated.

Results: Administration of GM for 10 days resulted in decrease in mitochondrial function in MTT test and also the glutathione content in kidney isolated mitochondria. Compared with the control group, increase in lipid peroxidation and mitochondrial swelling was observed in GM group. The *Nasturtium officinale* extract could significantly reduce (dose dependent) the increase in glutathione oxidation, lipid peroxidation and mitochondrial swelling due to GM on kidney isolated mitochondria.

Conclusion: With the considering the protective effects of *Nasturtium officinale* in attenuating GM-induced mitochondrial damage, it can be suggested for prevention of pathological condition caused by mitochondrial damage.

Keywords: gentamicin, *Nasturtium*, mitochondria, nephrotoxicity

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 26 (145): 152-164 (Persian).

اثرات محافظتی عصاره گیاه علف چشمه در برابر اختلال عملکرد میتوکندریایی ناشی از داروی جنتامایسین در بافت کلیه رت

سمیه شاهانی^۱فرزانه بهزادفر^۲دانیال جهانی^۳فاطمه شکی^۴

چکیده

سابقه و هدف: ما در این مطالعه، اثرات محافظتی عصاره هیدروالکلی گیاه علف چشمه (*Nasturtium officinale*) را روی سمیت میتوکندریایی ناشی از جنتامایسین در میتوکندری‌های ایزوله از کلیه رت مورد بررسی قرار می‌دهیم.

مواد و روش‌ها: در این بررسی، تعداد ۳۶ رت نژاد ویستار در ۶ گروه شش تایی مورد بررسی قرار گرفتند. گروه‌ها شامل گروه کنترل، گروه دریافت کننده حلال، گروه دریافت کننده جنتامایسین خالی ۸۰ mg/kg، ۳ گروه دریافت کننده جنتامایسین به علاوه عصاره با دوزهای مختلف (۵۰-۱۰۰-۲۰۰ mg/kg) بوده که به مدت ده روز به صورت داخل صفاقی تجویز گردید و ۲۴ ساعت بعد از پایان تجویزها، کلیه حیوان جدا و میتوکندری آن‌ها با روش سانتریفیوژ متعدد جداسازی شد و پارامترهای آسیب میتوکندری بررسی شدند.

یافته‌ها: تجویز جنتامایسین به صورت معنی‌داری سبب کاهش فعالیت میتوکندری در تست MTT و گلوکوتایون احیا در میتوکندری‌های ایزوله از کلیه رت شد. هم‌چنین افزایش لیپید پراکسیداسیون و تورم میتوکندری در گروه دریافت کننده جنتامایسین نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. تجویز عصاره هیدروالکلی علف چشمه سبب افزایش میزان زنده ماندن میتوکندری‌ها نسبت به گروه جنتامایسین شد. کاهش معنی‌دار و وابسته به غلظت اکسیداسیون گلوکوتایون، لیپید پراکسیداسیون و تورم میتوکندری ناشی از جنتامایسین در میتوکندری‌های ایزوله از کلیه رت در گروه دریافت کننده عصاره علف چشمه مشاهده شد.

استنتاج: هم‌چنین با توجه به اثر محافظتی علف چشمه در کاهش آسیب میتوکندریایی ناشی از جنتامایسین در میتوکندری ایزوله کلیه، می‌توان از عصاره علف چشمه در شرایط پاتولوژیک ناشی از آسیب میتوکندری استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: جنتامایسین، علف چشمه، میتوکندری، سمیت کلیه

مقدمه

جنتامایسین یک آنتی‌بیوتیک از دسته آمینوگلیکوزیدها می‌باشد که به طور گسترده علیه عفونت‌های باکتری‌هایی گرم منفی هوازی و برخی باکتری‌های گرم مثبت مورد استفاده قرار می‌گیرد و با

E-mail: fshaki.tox@gmail.com

مؤلف مسئول: فاطمه شکی - ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده داروسازی

۱. استادیار، گروه فارماکوکینزی و بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. دانشجوی داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دانشجوی کارشناسی ارشد داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. استادیار، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۲۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۶/۲۳ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱۱/۹

توجه به طیف گسترده‌ی اثر علیه باکتری‌های گرم منفی مثل عفونت‌های ناشی از سودوموناس، پروتئوس و سراسیا از آن استفاده می‌شود (۱). اما متأسفانه اثر بخشی و کاربرد آن‌ها به دلیل این که در بیش‌تر از ۳۰ درصد بیماران تحت درمان باعث ایجاد اختلالات کلیوی می‌شود، محدود شده است. جنتامایسین هم چنین باعث مرگ سلولی از طریق تولید رادیکال‌های آزاد H_2O_2 و رادیکال هیدروکسیل OH و لیز فسفولیپیدها، تحریک رسپتورهای حساس به کلسیم خارج سلولی و فاجعه انرژی، کاهش جریان خون و التهاب نیز می‌شود (۲). مطالعات متعددی نقش استرس اکسیداتیو و آسیب به میتوکندری را در بروز عوارض جنتامایسین نشان داده است (۳-۸). طی یک بررسی، به این نتیجه رسیدند که اگر افراد برای بیش از ۷ روز از آمینوگلیکوزیدها استفاده کنند، در بیش از ۳۰ درصد افراد عوارض جانبی سمیت کلیوی را خواهیم داشت که حتی در بعضی از موارد به ناچار منجر به قطع مصرف دارو می‌شوند. القای سمیت کلیوی جنتامایسین از طریق عدم توانایی در دفع روزانه‌ی محصولات اضافی و دفعی بدن مثل اوریک اسید و کراتینین و... می‌باشد (۳). میتوکندری یکی از مهم‌ترین ارگانل‌های داخل سلولی است که نقش اصلی را در تولید گونه‌های فعال اکسیژن ایفا می‌کند. هم چنین میتوکندری به طور بالقوه بیش‌تر از دیگر ارگانل‌ها به استرس اکسیداتیو حساس است و آسیب اکسیداتیو به میتوکندری منجر به شروع مسیر مرگ سلولی می‌شود (۹). جنتامایسین موجب افزایش تولید ROS مانند آنیون‌های سوپراکسید رادیکال هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن در کلیه می‌شود. بنابراین، جاذب‌های (پاک‌کننده‌های) ROS و مولکول‌های آنتی‌اکسیدان برای کاهش نسبی یا از بین بردن اثرات زیان آور ناشی از جنتامایسین مناسب و جز گزینه‌های انتخابی‌اند (۵). بنابراین یکی از مهم‌ترین راه‌کارها برای بهبود سمیت کلیوی آمینوگلیکوزیدها، حفاظت از میتوکندری کلیه می‌باشد. در مطالعات گذشته هم از طریق محافظت میتوکندری، اثرات سمی

برخی از داروهای درمانی را کاهش دادند (۱۰، ۱۱). گیاهان جنس *Nasturtium* (خانواده: شب‌بو)، گیاهانی چندساله و علفی می‌باشند. گونه *N. officinale* W.T.Aiton با نام‌های فارسی آب‌تره، علف چشمه، بولاغ‌اوتی و تره تیزک آبی در اغلب نقاط ایران، آسیای معتدله و اروپا می‌روید (۱۲، ۱۳). یکی از کاربردهای گسترده این گیاه، استفاده از آن به عنوان سبزی سالاد می‌باشد (۱۴) که دارای ترکیبات غذایی مهمی هم چون آهن، ید، کلسیم و منگنز و نیز ویتامین‌های A، E و C می‌باشد. به دلیل وجود مقادیر بالای ویتامین C در این گیاه، از زمان‌های قدیم برای درمان آسکوربوت کاربرد داشته است. کاربرد این گیاه برای درمان زکام در Commission E مورد تایید است. در طب کودکان در آلمان، این گیاه به عنوان داروی ضد باکتری در درمان عفونت دستگاه ادراری تحتانی کاربرد دارد. برگ پودر شده این گیاه در هند به عنوان خلط آور استفاده می‌شود (۱۳). در طب مردمی ایران، از گیاه به عنوان عامل حفاظت قلب (۱۵) و در درمان بیماری‌هایی مثل دیابت و برونشیت استفاده می‌شود (۱۶). مطالعات مختلفی بر روی اثر آنتی اکسیدانی گیاه انجام شده است (۱۷-۱۹). گیاه علف چشمه هم چون سایر گیاهان خانواده شب‌بو (Cruciferae)، منبع غنی از ترکیبات گلوکوزینولات می‌باشد که دارای خصوصیات ضد سرطانی می‌باشند (۲۰). تاکنون هیچ مطالعه‌ای بر روی اثرات محافظت میتوکندریایی این خانواده انجام نشده است. لذا با توجه به ترکیبات موثره این گیاه و اثرات گزارش شده آن، در این مطالعه برای اولین بار به بررسی اثر عصاره گیاه علف چشمه در برابر آسیب میتوکندریایی ناشی از جنتامایسین می‌پردازیم.

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری

اندام هوایی گیاه علف چشمه از منطقه هزارجریب شهرستان نکاء استان مازندران در اردیبهشت ماه

جمع آوری شد و پس از آن در سایه و در دمای اتاق خشک گردید. نمونه هربایومی آن پس از تایید توسط متخصص سیستماتیک گیاهی با شماره ۱۰۰۶ در هرباریوم دانشکده داروسازی نگهداری می شود. به میزان ۱۷۰ گرم از اندام هوایی خشک شده گیاه علف چشمه پس از آسیاب کردن دستی، به روش ماسراسیون و با استفاده از حلال اتانولی ۸۰ درصد در دمای اتاق عصاره گیری شد. عمل عصاره گیری ۳ بار و به فاصله زمانی ۴۸ ساعت انجام گرفت. عصاره های به دست آمده توسط دستگاه روتاری تغلیظ شد و در نهایت به کمک دستگاه فریزدرایر، کاملاً خشک گردید. وزن عصاره اتانولی ۸۰ درصد به دست آمده از ۱۷۰ گرم گیاه حدود ۳۷/۳ گرم بوده است.

مطالعات حیوانی

در این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی، از رت نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم که در شرایط استاندارد از نظر دسترسی به آب و غذا و سیکل ۱۲ ساعته روشنایی و تاریکی نگهداری شدند، استفاده شد. ۳۶ رت نژاد ویستار در ۶ گروه شش تایی مورد بررسی قرار گرفته اند. گروه ها شامل گروه کنترل منفی (نرمال سالین)، گروه دریافت کننده حلال، گروه دریافت کننده جنتامایسین خالی ۸۰ (۲۱، ۲۲)، ۳ گروه دریافت کننده جنتامایسین به علاوه عصاره با دوزهای مختلف (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg) (۲۳، ۲۴) بود که به مدت ده روز تجویز گردید. تمامی تزریقات به صورت داخل صفاقی انجام شد. حیوانات ۲۵ ساعت قبل از انجام آزمایشات ناشتا نگه داشته می شدند و ۲۴ ساعت بعد از پایان تجویزها، رت ها را با اتر بیهوش کرده و بلافاصله با جراحی کلیه را خارج کرده و در بافر مانیتول سرد (مانیتول ۰/۲۵۵، ساکارز ۷۴ mM EDTA، ۰/۲) شست و شو داده شدند و سپس بافت هموژن تهیه شد. بافت هموژن شده، ابتدا با سرعت 2000 xg به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس محلول رویی با سرعت

10000 x g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و محلول رویی را دور ریخته و رسوب ته لوله را که حاوی میتوکنندری است، در بافر تریس (ساکارز ۰/۲۵ M، پتاسیم کلراید ۲۰ mM، منیزیم کلراید ۲ mM، دی سدیم هیدروژن فسفات ۱ mM، تریس ۰/۰۵ mM) سرد پراکنده شد (۱۶) و میتوکنندری آن ها با روش سانتریفیوژ متعدد جداسازی شد و پارامترهای بیوشیمیایی در میتوکنندری بررسی شدند. کلیه آزمایش های انجام شده، با توجه به دستورالعمل های ثبت شده در کمیته آزمایشات حیوانی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران صورت گرفت.

تعیین غلظت پروتئین

نرمالیز کردن داده ها

تعیین غلظت پروتئین با روش برادفورد انجام می شود. برای هر کدام از شاخص های مورد نظر می توان میزان فعالیت را برحسب پروتئین بافتی نرمالایز کرد. غلظت پروتئین با معرف کوماسی بلو با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد اندازه گیری شد در تمامی آزمایشات از سوسپانسیون میتوکنندری با غلظت پروتئینی یک میلی گرم در میلی لیتر استفاده شد (۲۵). برای هر آزمایش، میتوکنندری ها به صورت تازه تهیه شد و حداکثر چهار ساعت بعد از جداسازی مورد استفاده قرار گرفت. تمامی فرآیندهای گفته شده روی یخ انجام شد تا جداسازی میتوکنندری با کیفیت بالا انجام گیرد. تمامی آزمایشات سه بار تکرار شد.

ارزیابی عملکرد میتوکنندی

ارزیابی سمیت میتوکندریایی براساس اندازه گیری میزان احیای MTT توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز انجام شد. آنزیم سوکسینات دهیدروژناز، یک آنزیم میتوکندریایی است که در هنگام اختلال در عملکرد میتوکنندری از کار افتاده و تبدیل MTT به ترکیب بنفش رنگ MTT- فورمازون صورت

نمی گیرد. میتو کندری های ایزوله از کلیه رت با غلظت های مختلف جنتامایسین به علاوه عصاره و جنتامایسین به تنهایی تماس داده شده و سپس $100 \mu\text{L}$ از سوسپانسیون میتو کندری در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای ریخته و محلول MTT (۴ درصد) به همراه سوکسینات (10 mM) را به هر چاهک اضافه کرده و به دور از نور، در دمای 37°C درجه سانتی گراد به مدت نیم ساعت انکوبه شد. کریستال های فورمازون تشکیل شده را با اضافه کردن $100 \mu\text{L}$ میکرولیتر از DMSO حل کرده و سپس جذب نمونه ها در 570 nm نانومتر با استفاده از الایزا ریدر خوانده شد. درصد تغییر در فعالیت آنزیم با سنجیدن جذب گروه ها در برابر جذب گروه کنترل محاسبه شد (۲۶).

اندازه گیری پراکسید/سیون لیپیدی

بر اساس روش تیوباربتوریک اسید اندازه گیری می شود. بدین ترتیب که به 0.2 ml از سوسپانسیون میتو کندری، 0.1 ml از معرف TBA شامل 0.5 M HCl ، نرمال، TCA ۱۵ درصد و TBA ۰/۳ درصد اضافه شد و به خوبی مخلوط و در حمام آب گرم به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه می گردد. بعد از سرد شدن به آن 0.2 ml -n بوتانل اضافه کرده و خوب تکان داده و سپس در rpm ۳۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کرده، لایه -n بوتانول برای سنجش در طول موج 532 nm جدا شده و مقدار TBARS از روی منحنی استاندارد محاسبه می گردد (۲۷).

اندازه گیری گلو تاتیون

یک میلی لیتر از هموژن بافتی برداشته و به آن 0.25 ml میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد اضافه کرده و بعد از ورتکس کردن به مدت ۲۰ دقیقه در $1000 \times \text{g}$ سانتریفوژ گردید. یک میلی لیتر از محلول شفاف رویی را برداشته و به آن ۲ میلی لیتر دی سدیم هیدروژن فسفات ۰/۳ مولار و ۰/۵ میلی لیتر DTNB 0.4 درصد اضافه کرده و ورتکس می شود و ۱۵ دقیقه انکوبه می شود

تا واکنش کامل شود. سپس میزان جذب در طول موج 412 nm نانومتر خوانده می شود. غلظت گلو تاتیون از روی منحنی استاندارد گلو تاتیون بر حسب nmol/ml به دست آورده می شود (۲۸).

اندازه گیری تورم میتو کندری

میتو کندری های به دست آمده در بافر تورم که حاوی ساکارز (70 mM)، مانیتول (230 mM)، HEPES (3 mM)، تریس (2 mM)، سوکسینات (5 mM) و روتنون ($1 \mu\text{M}$) می باشد، به حالت سوسپانسیون در آورده شد. در لوله ی آزمایش $1/8$ سی سی میتو کندری همراه هر کدام از مقادیر تعیین شده از گروه های مختلف اضافه شد. بعد از ورتکس کردن، $200 \mu\text{L}$ از سوسپانسیون به هر چاهک اضافه شده و در طول موج 540 nm نانومتر، هر ۱۵ دقیقه جذب اندازه گیری شد (۲۶).

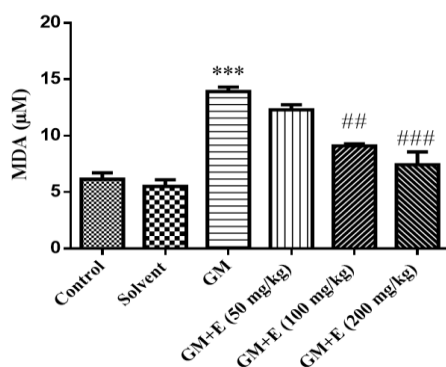
آنالیز آماری

نتایج بر حسب میانگین $\pm$ انحراف معیار حاصل از سه بار تکرار آزمایش گزارش شده و همه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۷ انجام شد. تست های آماری مورد استفاده شامل one-way ANOVA test با پست تست Tukey استفاده شد. حد معنی داری $p < 0.05$ تعریف شد.

یافته ها

در نمودار شماره ۱، میزان میتو کندری های فعال بر حسب میانگین و انحراف معیار نشان داده شده است. با توجه به این نمودار مشاهده می شود که تجویز جنتامایسین به تنهایی با دوز 80 mg/kg سبب کاهش معنی دار میتو کندری های فعال شد ($p < 0.001$). وقتی که از دوزهای مختلف عصاره علف پشمه برای محافظت استفاده شد، درصد میتو کندری های فعال در گروه های جنتامایسین به همراه عصاره با غلظت های 200 mg/kg ، 100 mg/kg ، 50 mg/kg به ترتیب از غلظت کم به زیاد

شده با غلظت‌های مختلف ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ mg/kg از عصاره و ۸۰ mg/kg از جنتامایسین با استفاده از معرف TBA سنجیده شد. سطح مالون دی آلدئید (MDA) در گروه‌هایی که غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ mg/kg عصاره به همراه جنتامایسین دریافت کرده‌اند (به ترتیب از غلظت کم به زیاد در میتوکنندری $12/29 \pm 0/78$ ، $9/09 \pm 0/31$ و $7/43 \pm 1/94$ میکرومولار) در مقایسه با گروه دریافت کننده جنتامایسین به تنهایی (در میتوکنندری $13/91 \pm 0/67$ میکرومولار) کاهش نشان داده است که در میتوکنندری در غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰ mg/kg از عصاره از نظر آماری معنی‌دار بود به ترتیب ($p < 0/01$) و ($p < 0/01$).



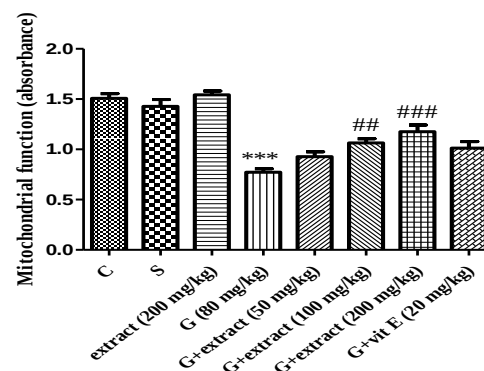
نمودار شماره ۲: مقایسه میانگین غلظت مالون دی آلدئید (MDA) در میتوکنندری کلیه در تماس با جنتامایسین (GM) و عصاره علف چشمه غلظت MDA بر حسب میکرومولار مالون دی آلدئید حاصل از شش بار تکرار آزمایش به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شده است.

***: نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل است ($p < 0/001$).
 ##: نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه جنتامایسین است ($p < 0/01$).
 ###: نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه جنتامایسین است ($p < 0/001$).

اندازه‌گیری میزان گلوتاتیون احیا

گلوتاتیون یکی از مهم‌ترین سیستم‌های دفاعی غیر آنزیمی در میتوکنندری است که نقش مهمی را در خنثی کردن گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در میتوکنندری به عهده دارد. ما غلظت گلوتاتیون را در میتوکنندری‌های ایزوله کلیه رت، بعد از تماس با غلظت ۸۰ mg/kg

77/33±4/50 و 70/66±4/50، 58/66±5/50 بیش‌ترین درصد میتوکنندری‌های فعال در گروه جنتامایسین به همراه عصاره با غلظت ۲۰۰ mg/kg و کم‌ترین مقدار در گروه دریافت کننده جنتامایسین به تنهایی (55/66±6/11) مشاهده شده است. نتایج نشان می‌دهد درصد میتوکنندری‌های فعال در گروه دریافت کننده جنتامایسین به همراه عصاره با غلظت ۲۰۰ mg/kg نسبت به گروه دریافت کننده جنتامایسین به تنهایی، افزایش معنی‌داری داشته است ($p < 0/001$). هم‌چنین از ویتامین E که یک آنتی‌اکسیدان شناخته شده است، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. نتایج نشان داد اثرات محافظتی عصاره با غلظت ۲۰۰ mg/kg نسبت به ویتامین E (65/33±5/05) بهتر بود.



نمودار شماره ۱: اثر عصاره گیاه علف چشمه در فعالیت میتوکنندری بعد از تماس با جنتامایسین

فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز، در میتوکنندری‌های ایزوله شده از کلیه رت در گروه کنترل (C)، حلال (S) و بعد از تماس با جنتامایسین (G) و غلظت‌های مختلف عصاره با استفاده از تست MTT سنجیده شد.

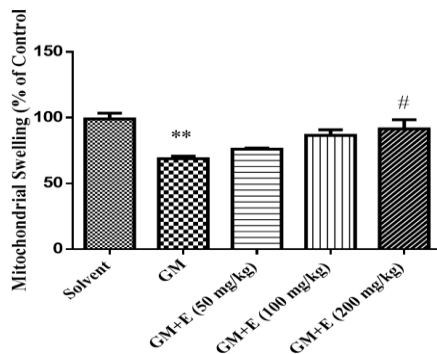
نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ حاصل از شش بار تکرار آزمایش گزارش شده است.

***: نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل است ($p < 0/001$).
 # نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه جنتامایسین است ($p < 0/05$).
 ##: نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه جنتامایسین است ($p < 0/01$).

اندازه‌گیری لیپید پراکسید/اسیون

همان‌طور که در نمودار شماره ۲ مشاهده می‌شود، میزان لیپید پراکسید/اسیون، در میتوکنندری‌های ایزوله

به دست آمده نشان می‌دهد که میزان تورم میتوکندریایی بعد از تماس با جنتامایسین در میتوکندری‌های ایزوله شده از کلیه شده که افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل پیدا کرده است ($p < 0.01$). هم‌چنین میزان تغییرات جذب سوسپانسیون میتوکندریایی بعد از تماس با غلظت‌های مختلف عصاره گیاه ارزیابی شد که مشاهده می‌شود در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ mg/kg، تورم میتوکندریایی تغییر معنی‌داری نسبت به گروه جنتامایسین به تنهایی داشت ($p < 0.05$).



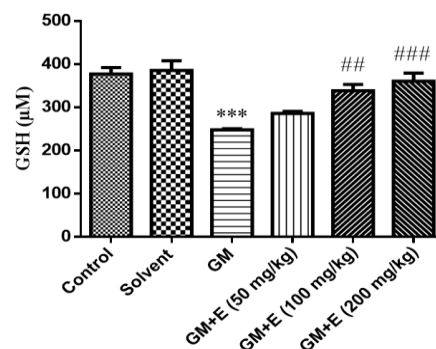
نمودار شماره ۴: مقایسه تورم میتوکندری در میتوکندری‌های در تماس با جنتامایسین (GM) و عصاره علف چشمه. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ حاصل از شش بار تکرار آزمایش گزارش شده است.

** نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل است ($p < 0.01$).
نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه جنتامایسین است ($p < 0.05$).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که جنتامایسین باعث اختلال در عملکرد میتوکندری‌های ایزوله از کلیه رت می‌شود. در این مطالعه نشان داده شد که جنتامایسین با ورود به کلیه، افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و آسیب به میتوکندری شده که به دنبال آن، افزایش میزان لیپید پراکسیداسیون و کاهش گلوکوتاتیون احیا مشاهده می‌شود که سبب سمیت کلیوی می‌شوند و مرگ سلولی را به دنبال خواهند داشت. در ادامه با تجویز عصاره گیاه علف چشمه، خصوصاً دوز ۲۰۰ mg/kg

جنتامایسین اندازه‌گیری کردیم. در نمودار شماره ۳ مشاهده می‌شود که جنتامایسین باعث کاهش در میزان گلوکوتاتیون احیا در میتوکندری‌های ایزوله کلیه (در میتوکندری $248/05 \pm 5/52$) نسبت به گروه کنترل (در میتوکندری $377/19 \pm 29/80$) شد که این میزان از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0.01$). هم‌چنین با توجه به نتایج، استفاده از غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ mg/kg سبب افزایش در میزان گلوکوتاتیون احیا در میتوکندری‌های ایزوله شد (به ترتیب از غلظت کم به زیاد عصاره در میتوکندری: $286/16 \pm 9/02$ و $338/37 \pm 29/83$ و $360/67 \pm 37/68$ و ۲۰۰ mg/kg و ۱۰۰ mg/kg که این میزان در غلظت ۲۰۰ mg/kg و ۱۰۰ mg/kg در میتوکندری از نظر آماری معنی‌دار بود، به ترتیب از غلظت کم به زیاد ($p < 0.01$) و ($p < 0.01$)).



نمودار شماره ۳: مقایسه میزان گلوکوتاتیون احیا در میتوکندری‌های در تماس با جنتامایسین (GM) و عصاره علف چشمه. میزان گلوکوتاتیون احیا بعد از تماس میتوکندری‌های ایزوله شده با استفاده از معرف DTNB سنجیده شد.

نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ حاصل از شش بار تکرار آزمایش گزارش شده است.

*** نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل است ($p < 0.01$).
نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه جنتامایسین است ($p < 0.01$).
نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه جنتامایسین است ($p < 0.01$).

تست تورم میتوکندری

در این روش تغییرات جذب سوسپانسیون میتوکندری در ۵۴۰ nm به منظور بررسی تورم میتوکندریایی ارزیابی شد که در نمودار شماره ۴ نشان داده شده است. نتایج

۲۰۰، کاهش فاکتورهای لیپید پراکسیداسیون و افزایش گلوکاتیون احیا ایجاد شد. هم‌چنین درصد میتو‌کندری‌های فعال افزایش یافت و درصد تورم نیز بهبود یافت که می‌تواند سبب مهار فرآیند مرگ سلولی و نیز مهار سمیت کلیوی ناشی از جنتامایسین شود. نتایج مطالعه بیانگر آن است که عصاره علف چشمه از اثرات سمیت جنتامایسین بر میتو‌کندری‌های ایزوله از کلیه رت جلوگیری می‌کند. مطالعات مختلف نشان داده است که جنتامایسین در طولانی مدت (برای بیش از ۷ روز) در بیش از ۳۰ درصد افراد عوارض جانبی سمیت کلیوی را ایجاد خواهد کرد که حتی در بعضی از موارد به ناچار منجر به قطع مصرف دارو می‌شوند (۳). هم‌چنین پیشنهاد شده است که استرس اکسیداتیو نقش محوری را در سمیت کلیوی ناشی از بسیاری از داروها، از جمله جنتامایسین بر عهده دارد. گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) میتو‌کندری، قادر به آسیب بسیاری از ماکرومولکول‌های سلولی‌اند (به عنوان مثال، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک) که می‌تواند به مرگ سلولی منجر شود (۲۹). اثرات سیتوتوکسیک برخی از داروهای درمانی، شامل استفاده از آن‌ها برای درمان ضد باکتریایی، می‌تواند با تغییر نفوذپذیری در غشای میتو‌کندری، به دنبال آن مرگ سلولی و نقص عضو همراه باشد (۳۰). استرس اکسیداتیو حالتی است که در اثر عدم توازن بین تولید رادیکال‌های آزاد و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی پیش می‌آید. اصولاً استرس اکسیداتیو در انسان به علت کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌های بدن یا افزایش گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد که یکی از مخرب‌ترین پیامدهای آن، پراکسیداسیون لیپیدی است (۳۱). میتو‌کندری یکی از مهم‌ترین اندامک‌های داخل سلولی است که نقش مهمی را در تولید گونه‌های فعال اکسیژن و تولید ATP و فراهم آوردن انرژی مورد نیاز سلول دارد (۳۲). علاوه بر این، آسیب به میتو‌کندری سبب خروج فاکتورهای پروآپتوتیک از میتو‌کندری می‌شود که آغاز کننده مرگ سلولی است (۳۳). از طرفی میتو‌کندری نه تنها

اصلی‌ترین منبع تولید ROS است، بلکه خود به عنوان هدف اصلی بسیاری از سموم اکسیدان هم می‌باشد (۲۶). یکی از اثرات تولید رادیکال‌های آزاد در یک محیط بیولوژیک مثل سلول، حمله به اسیدهای چرب غیراشباع موجود در ساختمان غشا سلولی است که به عنوان پراکسیداسیون لیپیدی شناخته شده که به صورت زنجیروار، باعث افزایش میزان رادیکال‌های آزاد شده و می‌تواند باعث پارگی غشای سلول، بروز نکروز و در نهایت فیروز بافتی شود (۳۴، ۳۵).

نتایج نشان داد که جنتامایسین، میزان از کار افتادگی را در میتو‌کندری‌ها در آزمون MTT موجب شده است و به عبارت دیگر، Viability در میتو‌کندری‌ها نسبت به گروه کنترل کاهش چشمگیری داشته است. هم‌چنین داده‌های حاصل از مطالعه ما بروز استرس اکسیداتیو ناشی از جنتامایسین در میتو‌کندری‌های ایزوله از رت را تایید کرد. جاروبگرهای (پاک‌کننده‌های) ROS و مولکول‌های آنتی‌اکسیدان برای کاهش نسبی یا از بین بردن اثرات زیان‌آور ناشی از جنتامایسین مناسب و جز گزینه‌های انتخابی‌اند (۱). آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند بدن انسان را در مقابل اثرات رادیکال‌های آزاد حفاظت کنند و پیشرفت بسیاری از بیماری‌های مزمن و پراکسیداسیون لیپیدها را به تأخیر بیندازند (۳۶). آنتی‌اکسیدان‌های متعددی با منشأ داخلی و خارجی وجود دارند که اجزای سلول را در برابر رادیکال‌های آزاد محافظت می‌نمایند (۳۶).

در مطالعات گذشته هم استفاده از ترکیباتی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی مانند لیکوپن، کورکومین، ملاتونین و Schisandrin B سمیت کلیوی ناشی از جنتامایسین را مهار نمودند که نشان‌دهنده اهمیت بروز آسیب اکسیداتیو در بروز سمیت کلیوی ناشی از جنتامایسین و موثر بودن ترکیباتی با خواص آنتی‌اکسیدانی در کاهش این عوارض است (۴۰-۳۷).

گیاهان جنس *Nasturtium* (خانواده شب‌بو)، گیاهانی چندساله و علفی می‌باشند. در ایران، گونه

N. officinale با نام‌های فارسی آب تره، علف چشمه، بولاغ اوتی و تره تیزک آبی در اغلب نقاط ایران، آسیای معتدله و اروپا می‌روید (۱۳، ۱۲). مطالعات مختلفی بر روی اثر آنتی‌اکسیدانی گیاه انجام شده است (۱۷-۱۹). از جمله در مطالعه‌ای نشان داده شد که مصرف گیاه همراه با استامینوفن سبب کاهش متابولیت‌های اکسیداتیو این دارو می‌گردد (۴۱). عصاره هیدروالکلی گیاه باعث کاهش تری‌گلیسیرید و LDL در موش با رژیم پرچرب گردید (۱۷). اثر حفاظتی این گیاه در برابر کارسینوژن‌های موجود در تنباکو در افراد سیگاری گزارش شده است (۴۲). همان‌طور که در نتایج نشان داده شد، تجویز گیاه علف چشمه به خصوص در دوز ۲۰۰ mg/kg به صورت قابل توجهی از افزایش مارکرهای استرس اکسیداتیو (لیپید پراکسیداسیون و اکسیداسیون گلوکوتاتیون) ناشی از جنتامایسین در میتوکندری‌های ایزوله از کلیه رت جلوگیری کرد. این اثرات گیاه علف چشمه احتمالاً به خاطر وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجود در عصاره گیاه است. مطالعات قبلی هم فعالیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه را در آزمایش‌های برون‌تنی نشان داد (۴۳، ۱۷).

ترکیبات موثر دیگر در گیاه علف چشمه همچون سایر گیاهان خانواده شب بو (Cruciferae)، ترکیبات گلوکوزینولات می‌باشد که دارای خصوصیات ضد سرطانی می‌باشند (۲۰). Plumb و همکارانش طی مطالعه‌ای گزارش کردند ایزوتیوسیانات‌ها که حاصل شکسته شدن گلوکوزینولات هستند، باعث القای دفاع آنتی‌اکسیدانی داخلی بدن مانند القای گلوکوتاتیون-S ترانسفراز و کینون ردوکتاز می‌شوند (۴۴). هم‌چنین ایزوتیوسیانات‌ها با تنظیم وقایع اکسیداتیو و التهابی، قادرند اختلالات نورودژنراتیو را مدیریت کنند (۴۵).

فنتیل ایزوتیوسیانات (PEITC) یک ترکیب حاصل از هیدرولیز گلوکوناستورین است که فراوان‌ترین گلوکوزینولات موجود در گیاه علف چشمه می‌باشد (۴۶). این ترکیب سبب بروز اثرات ضد التهابی و ضد سرطانی می‌شود (۴۸، ۴۷).

سولفورافان (SFN)، یک ایزوتیوسیانات است که به‌طور طبیعی در خانواده شب بو وجود دارد. در یک مطالعه، اثر محافظتی این ترکیب در برابر آسیب کلیوی ناشی از جنتامایسین گزارش گردید که بروز این اثر را با محافظت از عملکرد میتوکندری مرتبط دانستند (۴۹). این ترکیب در مدل‌های آزمایشگاهی مختلف توانسته است آسیب بافتی ناشی از استرس اکسیداتیو را کاهش دهد. هم‌چنین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان غیر مستقیم می‌تواند بسیاری از پروتئین‌های محافظ سلولی مانند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را از طریق مسیر Nrf2 القاء کند (۵۰). هم‌چنین Guerrero-Beltran و همکاران طی مطالعه‌ای، اثرات محافظتی سولفورافان را در مقابل سمیت کلیوی داروی سیس پلاتین گزارش کردند (۵۱). با توجه به یافته‌های ما، گلوکوزینولات‌ها ممکن است مسئول بخشی از اثرات محافظتی مشاهده شده‌ی عصاره در برابر سمیت کلیوی جنتامایسین باشند. جنتامایسین باعث آسیب به غشا میتوکندری و باز شدن منافذ MPT و تورم میتوکندری در میتوکندری‌های ایزوله از کلیه رت شد. تجویز عصاره علف چشمه به‌طور معنی‌داری تورم میتوکندری ناشی از جنتامایسین را مهار کرد. در واقع یکی از مکانیسم‌های مهم در باز شدن منافذ MPT، که می‌تواند در نهایت شروع فرآیند مرگ سلولی و در نتیجه سمیت بافتی شود، اکسیداسیون گروه‌های سولفیدریل پروتئین‌هایی است که در غشای داخلی میتوکندری قرار دارند. پس از اکسیداسیون، این گروه‌ها به صورت گروه‌های S-S در می‌آیند که این اتصال متقاطع گروه‌های سولفیدریل منجر به تغییرات فضایی در ساختار میتوکندری و باز شدن منافذ PT و بروز پدیده‌ی MPT و در نهایت خروج سیتوکروم C از میتوکندری می‌شود (۵۲). بنابراین احتمالاً عصاره علف چشمه به واسطه ترکیبات گلوکوزینولاتی موجود در عصاره گیاه، از اکسیداسیون GSH ناشی از جنتامایسین در میتوکندری‌های ایزوله از کلیه رت جلوگیری کرده که در نهایت پدیده نفوذپذیری موقت میتوکندری را

میتوکندریایی ناشی از جنتامایسین باشد.

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل بخشی از پایان نامه دکترای داروسازی خانم فرزانه بهزادفر، مصوب دانشکده داروسازی ساری است. هم چنین نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران به دلیل حمایت و تأمین هزینه این طرح کمال تشکر را دارند.

مهار کرده و مانع شروع سیگنالینگ مرگ سلولی می شود. در مطالعات گذشته هم ترکیبات حاوی گروه های تیول مانند دی آلیل سولفید و آلیل سیستئین اثربخشی مناسبی را در جلوگیری از سمیت جنتامایسین نشان دادند که تایید کننده مطالعات ما می باشد (۵۴،۵۳). بنابراین، گیاه علف چشمه با ویژگی آنتی اکسیدانی و خاصیت جاروب کنندگی رادیکال های آزاد، دارای اثرات محافظتی میتوکندریایی است. به نظر می رسد که می تواند انتخاب خوبی در محافظت آسیب اکسیداتیو و اختلال

References

1. Mahmoud AM, Ahmed OM, Galaly SR. Thymoquinone and curcumin attenuate gentamicin-induced renal oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats. EXCLI J 2014; 13: 98-110.
2. Ali BH, Al Za'abi M, Blunden G, Nemmar A. Experimental gentamicin nephrotoxicity and agents that modify it: a mini-review of recent research. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2011; 109(4): 225-232.
3. Muthuraman A, Singla SK, Rana A, Singh A, Sood S. Reno-protective role of flunarizine (mitochondrial permeability transition pore inactivator) against gentamicin induced nephrotoxicity in rats. Yakugaku Zasshi 2011; 131(3): 437-443.
4. Plotnikov EY, Chupyrkina AA, Jankauskas SS, Pevzner IB, Silachev DN, Skulachev VP, et al. Mechanisms of nephroprotective effect of mitochondria-targeted antioxidants under rhabdomyolysis and ischemia/reperfusion. Biochim Biophys Acta (BBA) 2011; 1812(1): 77-86.
5. Mahmoud AM, Ahmed OM, Galaly SR. Thymoquinone and curcumin attenuate gentamicin-induced renal oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats. EXCLI J 2014; 13: 98-110.
6. Qian Y, Guan M-X. Interaction of aminoglycosides with human mitochondrial 12S rRNA carrying the deafness-associated mutation. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(11): 4612-4618.
7. Dehne N, Rauen U, De Groot H, Lautermann J. Involvement of the mitochondrial permeability transition in gentamicin ototoxicity. Hear Res 2002; 169(1-2): 47-55.
8. Félix L, Oliveira MM, Videira R, Maciel E, Alves ND, Nunes FM, et al. Carvedilol exacerbate gentamicin-induced kidney mitochondrial alterations in adult rat. Exp Toxicol Pathol 2016; 69(2): 83-92.
9. Plotnikov EY, Chupyrkina AA, Jankauskas SS, Pevzner IB, Silachev DN, Skulachev VP, et al. Mechanisms of nephroprotective effect of mitochondria-targeted antioxidants under rhabdomyolysis and ischemia/reperfusion. Biochim Biophys Acta. 2011; 1812(1): 77-86.
10. Szewczyk A, Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target. Pharmacol Rev 2002; 54(1): 101-127.
11. Pereira GC, Silva AM, Diogo CV, Carvalho FV, Monteiro PJ, Oliveira P. Drug-induced cardiac mitochondrial toxicity and protection:

- from doxorubicin to carvedilol. *Curr Pharm Des* 2011; 17(20): 2113-2129.
12. Mozaffarian V. A Dictionary of Iranian Plant Names. Tehran: Farhang Moaser; 2007.
 13. Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J. Herbal Medicine. Expanded Commission E monographs. Newton, MA: Integrative Medicine Communications; 2000.
 14. Martínez-Sánchez A, Gil-Izquierdo A, Gil MI, Ferreres F. A comparative study of flavonoid compounds, vitamin C, and antioxidant properties of baby leaf Brassicaceae species. *J Agric Food Chem* 2008; 56(7): 2330-2340.
 15. Bahramikia S, Yazdanparast R. Effect of hydroalcoholic extracts of *Nasturtium officinale* leaves on lipid profile in high-fat diet rats. *J Ethnopharmacol* 2008; 115(1): 116-121.
 16. Bahramikia S, Ardestani A, Yazdanparast R. Protective effects of four Iranian medicinal plants against free radical-mediated protein oxidation. *Food Chem* 2009; 115(1): 37-42.
 17. Bahramikia S, Yazdanparast R. Antioxidant efficacy of *Nasturtium officinale* extracts using various in vitro assay systems. *J Acupunct Meridian Stud* 2010; 3(4): 283-290.
 18. Ozen T. Investigation of antioxidant properties of *Nasturtium officinale* (watercress) leaf extracts. *Acta Pol Pharm* 2008; 66(2): 187-193.
 19. Amiri H. Volatile constituents and antioxidant activity of flowers, stems and leaves of *Nasturtium officinale* R. *Br. Nat Prod Res* 2012; 26(2): 109-115.
 20. Park NI, Kim JK, Park WT, Cho JW, Lim YP, Park SU. An efficient protocol for genetic transformation of watercress (*Nasturtium officinale*) using *Agrobacterium rhizogenes*. *Mol Biol Rep* 2011; 38(8): 4947-4953.
 21. Derakhshanfar A, Roshanzamir M, Bidadkosh A. Dose-related protecting effects of vitamin C in gentamicin-induced rat nephrotoxicity: a histopathologic and biochemical study. *Comparat Clin Pathol* 2013; 22(3): 441-447.
 22. Poormoosavi S, Behmanesh M, Najafzadeh H. Effect of cimetidine on gentamicin-losartan induced-nephrotoxicity in rats. *Afr J Pharm Pharm* 2010; 4(6): 341-345.
 23. Shahani S, Karami M, Nosrati A, Asghari H. Protective effects of *Nasturtium officinale* extracts against genetic damage induced by cyclophosphamide in mice bone marrow cells. *Planta Med* 2015; 81(16): PM_198.
 24. Karami M, Nosrati A, Naderi M, Makhloogh M, Shahani S. Protective effects of *Nasturtium officinale* against gamma-irradiation-induced hepatotoxicity in C57 mice. *Research Journal of Pharmacognosy (RJP)* 2015; 2(2): 19-25.
 25. 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; 72(1-2): 248-254.
 26. Shaki F, Hosseini M-J, Ghazi-Khansari M, Pourahmad J. Toxicity of depleted uranium on isolated rat kidney mitochondria. *Biochim Biophys Acta (BBA)* 2012; 1820(12): 1940-1950.
 27. Zhang F, Xu Z, Gao J, Xu B, Deng Y. In vitro effect of manganese chloride exposure on energy metabolism and oxidative damage of mitochondria isolated from rat brain. *Environ Toxicol Pharmacol* 2008; 26(2): 232-236.
 28. Jafarian I, Eskandari MR, Mashayekhi V, Ahadpour M, Hosseini M-J. Toxicity of valproic acid in isolated rat liver mitochondria. *Toxicol Mech Methods* 2013; 23(8): 617-623.
 29. Yousef JM, Chen G, Hill PA, Nation RL, Li J. Melatonin attenuates colistin-induced nephrotoxicity in rats. *Antimicrob Agents*

- Chemother 2011; 55(9): 4044-4049.
30. Zorov DB. Amelioration of aminoglycoside nephrotoxicity requires protection of renal mitochondria. *Kidney Int* 2010; 77(10): 841-843.
 31. Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OI. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 1987; 165(1): 215-219.
 32. Hosseini M-J, Shaki FS, Ghazi-Khansari M, Pourahmad J. Toxicity of arsenic (III) on isolated liver mitochondria: a new mechanistic approach. *Iran J Pharm Res* 2013; 12(Suppl): 121-138.
 33. Hosseini M-J, Shaki F, Ghazi-Khansari M, Pourahmad J. Toxicity of vanadium on isolated rat liver mitochondria: a new mechanistic approach. *Metallomics* 2013; 5(2): 152-166.
 34. Levine RL, Stadtman ER. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol* 2001; 36(9): 1495-1502.
 35. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress. *Sports Med* 2006; 36(4): 327-358.
 36. Fiala M, Liu Q, Sayre J, Pop V, Brahmandam V, Graves M, et al. Cyclooxygenase-2-positive macrophages infiltrate the Alzheimer's disease brain and damage the blood-brain barrier. *Eur J Clin Invest* 2002; 32(5): 360-371.
 37. Karahan I, Ateşşahin A, Yılmaz S, Çeribaşı A, Sakin F. Protective effect of lycopene on gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats. *Toxicol* 2005; 215(3): 198-204.
 38. Farombi E, Ekor M. Curcumin attenuates gentamicin-induced renal oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol* 2006; 44(9): 1443-1448.
 39. Chiu PY, Leung HY, Ko KM. Schisandrin B enhances renal mitochondrial antioxidant status, functional and structural integrity, and protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Biol Pharm Bull* 2008; 31(4): 602-605.
 40. Sener G, Sehirli AÖ, Altunbas HZ, Ersoy Y, Paskaloglu K, Arbak S, et al. Melatonin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *J Pineal Res* 2002; 32(4): 231-236.
 41. Chen L, Mohr SN, Yang CS. Decrease of plasma and urinary oxidative metabolites of acetaminophen after consumption of watercress by human volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 1996; 60(6): 651-660.
 42. Hecht SS, Chung FL, Richie JP, Akerkar SA, Borukhova A, Skowronski L, et al. Effects of watercress consumption on metabolism of a tobacco-specific lung carcinogen in smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4(8): 877-884.
 43. Yazdanparast R, Bahramikia S, Ardestani A. *Nasturtium officinale* reduces oxidative stress and enhances antioxidant capacity in hypercholesterolaemic rats. *Chem Biol Interact* 2008; 172(3): 176-184.
 44. Plumb GW, Lambert N, Chambers SJ, Wanigatunga S, Heaney RK, Plumb JA, et al. Are whole extracts and purified glucosinolates from cruciferous vegetables antioxidants? *Free Radic Res* 1996; 25(1): 75-86.
 45. Giacompo S, Galuppo M, Montaut S, Iori R, Rollin P, Bramanti P, et al. An overview on neuroprotective effects of isothiocyanates for the treatment of neurodegenerative diseases. *Fitoterapia* 2015; 106: 12-21.
 46. Palaniswamy UR, McAvoy RJ, Bible BB, Stuart JD. Ontogenic variations of ascorbic acid and phenethyl isothiocyanate concentrations in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) leaves. *J Agric Food Chem* 2003; 51(18): 5183-5188.

- 5504-5509.
47. Cavell BE, Syed Alwi SS, Donlevy AM, Proud CG, Packham G. Natural product-derived antitumor compound phenethyl isothiocyanate inhibits mTORC1 activity via TSC2. *J Nat Prod* 2012; 75(6): 1051-1057.
 48. Park H-J, Kim S-J, Park S-J, Eom S-H, Gu G-J, Kim SH, et al. Phenethyl isothiocyanate regulates inflammation through suppression of the TRIF-dependent signaling pathway of Toll-like receptors. *Life Sci* 2013; 92(13): 793-798.
 49. Negrette-Guzmán M, Huerta-Yepez S, Medina-Campos ON, Zatarain-Barrón ZL, Hernández-Pando R, Torres I, et al. Sulforaphane attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity: role of mitochondrial protection. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 135314.
 50. Guerrero-Beltrán CE, Calderón-Oliver M, Pedraza-Chaverri J, Chirino YI. Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: recent advances. *Exp Toxicol Pathol* 2012; 64(5): 503-508.
 51. Guerrero-Beltrán CE, Calderón-Oliver M, Tapia E, Medina-Campos ON, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, et al. Sulforaphane protects against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicol Lett* 2010; 192(3): 278-285.
 52. Kowaltowski AJ, Netto LE, Vercesi AE. The Thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism. *J Biol Chem* 1998; 273(21): 12766-12769.
 53. Maldonado PD, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, et al. Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free Radic Biol Med* 2003; 35(3): 317-324.
 54. Pedraza-Chaverri J, González-Orozco AE, Maldonado PD, Barrera D, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R. Diallyl disulfide ameliorates gentamicin-induced oxidative stress and nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 2003; 473(1): 71-78.