

Evaluating the Protective Effects of L-Arginine against Cisplatin-Induced Cytotoxicity, Genotoxicity, and Oxidative Stress in Normal Kidney Cells and Human Blood Lymphocytes

Mahboube Rahmati¹
Shiva Jourablou²
Elahe Gharekhani¹
Hourolein Arab³
Mohammad Shokrzadeh^{4,5}

¹ PhD in Toxicology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Pharmacy Student, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ PhD in Biochemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

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

⁵ Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received April 29, 2024; Accepted July 14, 2024)

Abstract

Background and purpose: L-arginine is an essential amino acid used for glutathione synthesis and as a precursor to nitric oxide, it can act as a free radical scavenger and inhibitor of lipid peroxidation. Therefore, this study aimed to investigate the protective effect of L-Arginine on cisplatin-induced cytotoxicity, genotoxicity, and oxidative stress in normal kidney cells and human blood lymphocytes.

Materials and methods: In this experimental study, normal kidney cells (Vero cell line) and human blood lymphocytes were used. Vero cells were pre-treated with various concentrations of L-Arginine (9.35, 18.75, 37.5, 75, 150, and 300 µg/mL) and a damaging dose of cisplatin (1.7 µg/mL). Cell viability and IC₅₀ (inhibitory concentration) were evaluated using the MTT assay. For genotoxicity assessment, 5 mL of venous blood sample was collected from a healthy, non-smoking, non-alcoholic volunteer using a heparin syringe and after isolating lymphocytes, different concentrations of L-Arginine were pre-treated with cisplatin at an optimal genotoxic dose. To evaluate micronucleus formation in cytokinesis-blocked binucleated lymphocytes, the slide was prepared and was evaluated by light microscopy. Oxidative stress tests, including ROS and MDA levels, were conducted. ROS levels were measured using a fluorimeter device and DA-DCFH reagent. To measure the amount of malondialdehyde (MDA) produced during the lipid peroxidation process Thiobarbituric acid (TBA) was used as a reagent. Data analysis was performed using one-way ANOVA with GraphPad Prism.8 software.

Results: Cisplatin exhibited dose-dependent cytotoxicity at concentrations (0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, and 50 µg/ml) after 48 hours incubation, with an IC₅₀ of 1.7 µg/mL. Based on the results of this study, Pre-treatment with L-arginine at concentrations of 18.75, 37.5, 75, 150, and 300 µg/ml with 1.7 µg/ml cisplatin significantly reduced cytotoxic effects, so that with the increase of L-arginine concentration, increasing the viability of normal lung cells compared to cisplatin alone as a positive control group. On the other hand, micronucleus test results showed that L-arginine significantly inhibited the genotoxicity of cisplatin in human blood lymphocytes. So in the concentration of 18.75 µg/mL, there was a significant difference with the positive control group (P<0.05), and in concentrations 37.5 to 300 µg/ml this significant difference was evident (P<0.001). Also, L-arginine in different concentrations, reduced oxidative stress caused by cisplatin by decreasing reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) production. Statistically, L-arginine had a significant difference with the positive control group in all concentrations (P<0.001).

Conclusion: The study demonstrated that L-Arginine, as an antioxidant compound, moderated cisplatin-induced cytotoxicity, genotoxicity, and oxidative stress in normal kidney (Vero) cells and human blood lymphocytes, showing significant protective effects. Therefore, it can be hoped for potential use as a preventive agent.

Keywords: L-arginine, cisplatin, micronucleus assay, cytotoxicity, oxidative stress

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 34 (236): 29-41 (Persian).

Corresponding Author: Mohammad Shokrzadeh - Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: Mslamuki@gmail.com)

بررسی اثرات محافظتی اسید آمینه ال-آرژنین بر سمیت سلولی، ژنتیکی و استرس اکسیداتیو ناشی از سیس پلاتین در سلول‌های نرمال کلیوی و لنفوسیت‌های خونی انسان

محبوبه رحمتی^۱
شیوا جورابلو^۲
الهه قره خانی^۱
حورالعین عرب^۳
محمد شکرزاده^۴

چکیده

سابقه و هدف: ال-آرژنین به‌عنوان یک اسید آمینه ضروری است و برای سنتز گلوکوتاتیون استفاده می‌شود و از آن‌جایی که پیش‌ساز نیتریک اکساید نیز می‌باشد می‌تواند به‌عنوان پاک‌کننده‌ی رادیکال‌های آزاد و مهارکننده‌ی پراکسیداسیون لیپیدی عمل کند. از این‌رو مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر حفاظتی ال-آرژنین بر سمیت سلولی، ژنتیکی و استرس اکسیداتیو ناشی از سیس پلاتین در سلول‌های نرمال کلیوی و لنفوسیت‌های خونی انسان انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، از سلول‌های نرمال کلیوی رده سلولی vero و لنفوسیت‌های خونی انسان استفاده شد. سلول‌های vero با غلظت‌های مختلف ال-آرژنین (۹/۳۵، ۱۸/۷۵، ۳۷/۵، ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با دوز آسیب‌زای سیس پلاتین (۱/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌صورت پیش‌تیمار بررسی شدند. ارزیابی بقا و زنده‌مانی سلولی و تعیین IC₅₀ (غلظت مهار) توسط تست MTT انجام شد. جهت بررسی سمیت ژنتیکی، با استفاده از سرنگ هپارینه ۵ میلی‌لیتر نمونه خون وریدی از یک داوطلب سالم غیر سیگاری و غیر الکل‌گرفته شد و بعد از جداسازی لنفوسیت‌ها، غلظت‌های مختلف ال-آرژنین با سیس پلاتین در دوز بهینه القاکنندگی سمیت پیش‌درمانی شدند. جهت ارزیابی تولید میکرونوکلئوس در لنفوسیت‌های دو هسته‌ای مهار شده در ستو کینز لام تهیه و توسط میکروسکوپ نوری بررسی شد. هم‌چنین تست‌های استرس اکسیداتیو (ارزیابی میزان ROS و MDA) مورد سنجش قرار گرفتند که اندازه‌گیری میزان ROS سلول با دستگاه فلوریمتری و با استفاده از معرف DA-DCFH انجام شد. برای سنجش میزان مالون دی‌آلدهید (MDA) تولید شده در فرآیند لیپید پراکسیداسیون از معرف تیوباربیتریک اسید (TBA) استفاده شد. بررسی داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه توسط نرم‌افزار GraphPad Prism 8 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: اثرات سمیت سلولی سیس پلاتین در انکوباسیون ۴۸ ساعته با غلظت‌های مختلف (۰/۳۹، ۰/۷۸، ۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌صورت وابسته به دوز مشخص شد و میزان IC₅₀ ۱/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. براساس نتایج این مطالعه، پیش‌درمانی با ال-آرژنین در غلظت‌های ۱۸/۷۵، ۳۷/۵، ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با سیس پلاتین ۱/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر، به‌طور قابل توجهی اثرات سیتوتوکسیک را کاهش داد به‌طوری‌که با افزایش غلظت ال-آرژنین، حیات سلول‌های نرمال ریوی در مقایسه با سیس پلاتین به‌تنهایی به‌عنوان گروه کنترل مثبت افزایش یافت. از سوی دیگر نتایج حاصل از تست میکرونوکلئوس نشان داد که ال-آرژنین به‌طور معناداری سبب مهار سمیت ژنتیکی سیس پلاتین در لنفوسیت‌های خونی انسان شد. به‌طوری‌که در غلظت ۱۸/۷۵ دارای اختلاف معنادار با گروه کنترل مثبت بود ($P < 0/05$) و در غلظت‌های ۳۷/۵ الی ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اختلاف معناداری مشهود بود ($P < 0/001$). هم‌چنین با تجویز ال-آرژنین در غلظت‌های مختلف، میزان استرس اکسیداتیو ناشی از سیس پلاتین از طریق کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و مالون دی‌آلدهید (MDA) مشاهده شد. از لحاظ آماری، ال-آرژنین در تمامی غلظت‌ها دارای اختلاف معنادار با گروه کنترل مثبت بود ($P < 0/001$).

استنتاج: نتایج مطالعه حاضر نشان داد، ال-آرژنین به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان، سمیت سلولی و ژنتیکی و استرس اکسیداتیو ناشی از سیس پلاتین را در سلول‌های نرمال ریوی کلیوی (vero) و لنفوسیت‌های خونی انسان تعدیل کرد و اثرات محافظتی قابل ملاحظه‌ای را از خود نشان داد. از این‌رو می‌توان این امید را داشت که به‌عنوان یک ماده پیشگیری‌کننده مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: ال آرژنین، سیس پلاتین، سنجش میکرونوکلئوس، سمیت سلولی، استرس اکسیداتیو

E-mail: Mslamuki@gmail.com

مؤلف مسئول: محمد شکرزاده - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی

۱. دکتری تخصصی سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

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

۳. دکتری تخصصی بیوشیمی بالینی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴. استاد، گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۵. مرکز تحقیقات علوم دارویی، موسسه هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۲/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۳/۵ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۴/۲۴

مقدمه

سرطان یکی از اصلی‌ترین مسائل بهداشتی تقریباً در همه کشورهای جهان است. به‌عنوان مثال، در ایالات متحده از هر چهار مرگ، یک مورد به‌دلیل سرطان رخ می‌دهد. سه راهبرد اصلی در درمان سرطان، جراحی، رادیوتراپی و شیمی‌درمانی است. شیمی‌درمانی مشتق از پلاتین، که توسط سیس پلاتین هدایت می‌شود، یکی از پرکاربردترین درمان‌ها برای انواع مختلف سرطان می‌باشد (۲۰۱). سیس پلاتین، سیس پلاتینوم، یا سیس-دی آمین دی کلروپلاتینوم [II]، برای اولین بار در سال ۱۹۷۸ به‌عنوان یک داروی آنتی‌نئوپلاستیک شناخته شد که به خانواده آلکلیله‌کننده DNA تعلق دارد و امروزه به‌عنوان درمان مهم و موثر برای طیف وسیعی از سرطان‌ها از جمله مثانه، سینه، دهانه رحم، مری، سر و گردن، تخمدان، پروستات، ریه، معده کاربرد دارد (۳-۵). عامل اصلی محدودکننده استفاده از سیس پلاتین در درمان سرطان، ایجاد عوارض جانبی شدید مانند سمیت کلیوی، سمیت گوش، سمیت کبدی، سمیت عصبی، سمیت گوارشی، سمیت خونی، سمیت قلبی، استفراغ، میلوپاتی و ریتینوپاتی می‌باشد (۶-۹). با این حال، سمیت کلیوی مهم‌ترین عارضه جانبی تجویز سیس پلاتین است و از نظر بالینی، خطر سمیت کلیوی در بیمارانی که سیس پلاتین مصرف می‌کنند بین ۲۰ تا ۳۵ درصد است و در بیماران با آسیب حاد کلیوی (AKI) می‌تواند منجر به مرگ شود (۱۰). این دارو از طریق مکانیسم‌های مختلف سلولی و مولکولی فعالیت ضدسرطانی خود را اعمال می‌کند. سیس پلاتین به‌عنوان یک عامل هسته دوست قوی عمل می‌کند، که به اهداف DNA حمله می‌کند و منجر به تشکیل پیوندهای عرضی، ترکیبات افزایشی پروتئینی و شکستن رشته‌ها می‌شود و در نهایت سبب مهار تکثیر، رونویسی و مرگ سلولی می‌شود (۱۱، ۱۲). علاوه بر این، درمان سیس پلاتین هم‌چنین باعث ایجاد سمیت ژنتیکی، از جمله انحرافات کروموزومی و تشکیل ریزهسته‌ها می‌شود (۱۳). سمیت

ژنتیکی به توانایی یک ماده خاص برای آسیب رساندن به DNA و اجزای سلولی که عملکرد صحیح ژنوم را تنظیم می‌کنند، اشاره دارد و به دلیل ارتباط زیاد آن با سرطان‌ها، توجه عمومی را به خود جلب کرده است و اغلب با استفاده از روش میکرونوکلئوس ارزیابی می‌شود (۱۴). میکرونوکلئوس ریزهسته‌های کوچک و مستقلی هستند که در سیتوپلاسم قرار دارند و از دست دادن یک یا چند کروموزوم به دلیل خطاهای میتوزی یا شکست کروموزومی به‌دلیل ترمیم نادرست آسیب DNA به‌وجود می‌آیند (۱۵). ریزهسته‌ای که توسط سیس پلاتین ایجاد می‌شود در نهایت منجر به مرگ سلولی، بی‌ثباتی ژنومی یا توسعه سرطان می‌شود (۱۶). از سوی دیگر سیس پلاتین قادر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند رادیکال‌های سوپراکسید و هیدروکسیل می‌باشد، هم‌چنین با تحریک پراکسیداسیون لیپیدی و سرکوب سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی شامل آنزیم‌ها، مولکول‌های غیر آنزیمی و گلوتاتیون قابلیت جهش‌زایی سیس پلاتین و خطر بیش‌تر برای ایجاد بدخیمی‌های ثانویه را سبب می‌شود (۱۱، ۱۲، ۱۷، ۱۸). بنابراین، یافتن درمانی که چنین سمیتی را محدود یا بهبود بخشد، برای افزایش عملکرد درمانی سیس پلاتین مهم است.

ال-آرژنین به‌عنوان یک اسیدآمین ضروری شناخته شده است که نقش اساسی در حفظ هموستاز بدن دارد (۱۹). این ترکیب در چندین مسیر متابولیک از جمله سنتز NO، پروتئین، کراتین و اوره نقش دارد (۲۰). از آنجایی که ال-آرژنین به‌عنوان سوبسترای آنزیم آرژیناز و نیتریک اکساید سنتاز عمل می‌کند می‌تواند با اختلال در تکثیر نئوپلاستیک و فرآیند متاستاز سبب تعدیل در رشد سلول‌های نئوپلاستیک شود (۲۱). ال-آرژنین به‌طور طبیعی در منابع پروتئینی غذایی مانند گوشت، غذاهای دریایی، آجیل، دانه‌ها، هندوانه و سویا یافت می‌شود و می‌تواند به‌صورت درون‌زا، عمدتاً در کلیه، جایی که ال-آرژنین از ال سیترولین تشکیل می‌شود، سنتز شود (۲۰، ۲۲، ۲۳). علاوه بر این، ال-آرژنین

زنده ماننی سلول‌های موجود در سوسپانسیون سلولی با مخلوط شدن نسبت مساوی از تریپان بلو با استفاده از لام هموسایتومتر و بررسی با میکروسکوپ نوری تعیین گردید (۲۹). کلیه آزمایش‌های انجام شده، با توجه به دستورالعمل‌های ثبت شده در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ایران با (کد اخلاق: IR.MAZUMS.3.REC.1401.17448) انجام گرفت.

ارزیابی سمیت سلولی به روش MTT

روش MTT یک روش کمی اسپکتروفتومتری است که طی آن نمک ترازولیوم که در محیط کشت فاقد فنول رد یا بافر PBS آماده سازی می‌شود، محلول زرد رنگی ایجاد می‌کند که توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری سلول‌های فعال احیا شده و به کریستال‌های نامحلول و ارغوانی رنگ فورمازان تبدیل می‌شود. سلول‌های Vero در پلیت‌های ۹۶ خانه با تعداد 1×10^4 سلول در هر چاهک کاشته شدند و به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون صورت گرفت. سپس در شرایط پیش‌درمانی، سلول‌ها با غلظت‌های ۹/۳۷، ۱۸/۷۵، ۳۷/۵، ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آل آرژنین تریت و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون مجدد با داروی سیس پلاتین در غلظت IC_{50} معادل ۱/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر مواجه شدند (۳۱،۳۰). در ادامه، سلول‌ها با محلول MTT (با غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در هر چاهک) در PBS مواجه شدند و به مدت ۴ ساعت انکوباسیون صورت گرفت. پس از خارج نمودن محتویات هر چاهک، بلورهای فورمازان با افزودن ۱۵۰ میکرولیتر دی متیل سولفو کساید (DMSO) پراکنده شدند. در نهایت میزان جذب نوری کریستال‌ها توسط دستگاه ایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید (۳۲).

ارزیابی سمیت ژنتیکی به روش میکرونوکلئوس

با استفاده از سرنگ هپارینه و تحت شرایط کاملاً استریل، ۵ میلی‌لیتر نمونه خون وریدی از یک فرد سالم،

به‌عنوان تنظیم‌کننده کلیدی عملکرد سیستم ایمنی، تنفسی و اندوتلیال شناخته شده است که با اصلاح تون عروق، جریان خون را تنظیم می‌کند و از آسیب‌های بافت ایسکمیک کلیه جلوگیری می‌کند و در ترشح هورمون رشد از غده هیپوفیز، تکثیر و ذخیره سلول‌های T، تحریک تولید لنفوسیت‌های B و پاسخ‌های ایمنی میزبان نیز نقش دارد. هم‌چنین نشان داده شده است که مصرف ال-آرژنین باعث بهبود متابولیسم اکسیداتیو، از طریق افزایش عملکرد میتوکندری، و در نهایت بهبود عملکرد فیزیکی می‌شود (۲۱، ۲۶-۲۴). ال-آرژنین به عنوان یک ترکیب ضد استرس و ضد التهاب نیز مطرح است و از آن‌جایی که برای سنتز گلوکوتایون ضروری است و چون پیش‌ساز نیتریک اکساید نیز می‌باشد می‌تواند به عنوان یک پاک‌کننده رادیکال‌های آزاد و مهارکننده پراکسیداسیون لیپیدی عمل کند (۲۷، ۲۸). بنابراین، با توجه به شواهد فراوان از خواص آنتی‌اکسیدانتی ال-آرژنین، در این مطالعه اثرات ال-آرژنین بر زنده ماننی سلولی، سمیت ژنتیکی و استرس اکسیداتیو ناشی از سیس پلاتین بر رده‌های سلولی نرمال کلیوی (vero) و لنفوسیت‌های خونی انسان پرداخته است.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی

در این مطالعه تجربی، پس از خریداری سلول‌های اپیتلیال جدا شده از کلیه میمون سبز آفریقایی (vero) از بانک سلولی انیستیتو پاستور تهران، سلول‌ها در محیط کشت (Biosera) RPMI-1640 با افزودن ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Biosera) FBS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین (Biosera) در انکوباتور ۳۷ درجه و ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند. پس از آن که به حداقل ۷۰ درصد رشد سلولی رسیدند توسط تریپسین-EDTA از ته فلاسک جدا شده و در دور rpm ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی در یک میلی‌لیتر محیط کشت به حالت سوسپانسیون تهیه شد و

مانده لوله سانتریفیوژ فقط ۰/۵ میلی لیتر باشد و یک محلول سوسپانسیون یکنواخت به دست آید. جهت بهتر فیکس شدن سلول‌ها، تمامی نمونه‌ها ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شدند. در نهایت ۳ قطره از سوسپانسیون سلولی را بر روی هر لام ریخته و بعد آن‌ها را در دمای اتاق قرار داده تا کاملاً خشک شوند. ۲-۳ روز پس از تهیه لام‌ها رنگ آمیزی صورت گرفت. از روش رنگ آمیزی با گیمسا استفاده شد. لام‌ها به صورت منظم با بزرگنمایی $\times 40$ میکروسکوپ مورد جستجو قرار گرفت و به ازای هر نمونه حداقل ۱۰۰۰ سلول دو هسته‌ای و تعداد ریزهسته‌های موجود در آن شمارش گردید. درصد بروز ریزهسته نشان‌دهنده میزان آسیب ژنتیکی و میزان کاهش آن معیار کاهش آسیب ژنتیکی گروه مربوطه می‌باشد (۳۴).

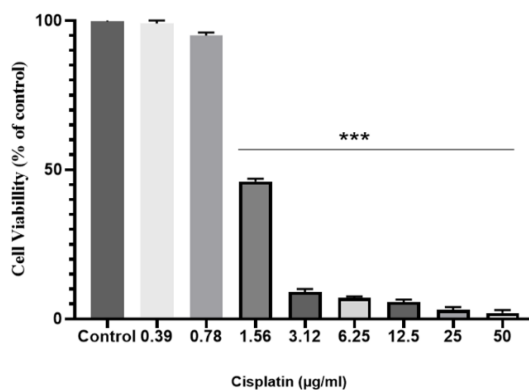
اندازه‌گیری میزان ROS

اندازه‌گیری میزان ROS سلول با دستگاه فلوریمتری و با استفاده از معرف DA-DCFH انجام شد. ابتدا ۲۰ میکرولیتر از معرف DA-DCFH به ۲۰۰۰ میکرولیتر از نمونه سلولی اضافه شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در نهایت جذب در طول موج تحریکی ۳۱۲ نانومتر و نشری ۴۲۰ نانومتر توسط دستگاه فلوریمتری اندازه‌گیری شد (۲۹).

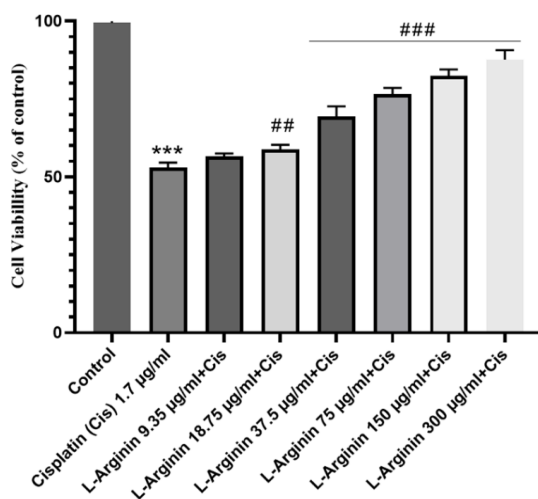
اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی (LPO)

برای بررسی میزان لیپید پراکسیداسیون جهت ارزیابی استرس اکسیداتیو، از سنجش میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) تولید شده در فرآیند لیپید پراکسیداسیون استفاده گردید. در این روش از معرف تیوباریتوریک اسید (TBA) استفاده شد. به این منظور، ۲۰۰ میکرولیتر از هر یک از گروه‌های سوسپانسیون سلولی برداشته و جداگانه در یک میکروتیوب قرار گرفتند. سپس ۲۵ میکرولیتر از معرف TBA به میکروتیوب اضافه گردید و در انتها به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. بعد از آن میکروتیوب‌ها در ظرف

غیرسیگاری و غیرالکلی که در طی یک ماه گذشته تحت رادیوگرافی و درمان با آنتی‌بیوتیک قرار نگرفته است تهیه گردید. نمونه خونی گرفته شده از داوطلب به گروه‌های مجزای یک میلی‌لیتری در پلیت‌های شش خانه تقسیم شد و با محیط کشت RPMI-1640 (حاوی ۰/۷ میلی‌لیتر سرم FCS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک) به حجم نهایی ۵ میلی‌لیتر رسید. پس از ۲۴ ساعت نگهداری در انکوباتور ۳۷ درجه به آن به میزان تقریباً ۰/۱ میلی‌لیتر ماده میتوزن فیتوماگلوئینین (PHA) جهت تحریک رشد لنفوسیت‌ها افزوده شد (۳۳). سپس نمونه‌های خونی با آل آرژنین در غلظت‌های ۹/۳۵، ۱۸/۷۵، ۳۷/۵، ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۲۴ ساعت و سپس پلاتین در غلظت ۱/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر مواجه شدند به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و بعد از ۴۴ ساعت، ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیتوکلایزین B جهت تحریک هسته لنفوسیت‌ها به تقسیم شدن بدون تقسیم سلول اضافه گردید. ۷۲ ساعت پس از کشت لنفوسیت‌ها محصول برداری صورت گرفت. محتویات ظروف کشت به لوله سانتریفیوژ منتقل و به مدت ۸ دقیقه با دور ۸۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. پس از خارج کردن مایع فوقانی به محتویات ته لوله ۶ میلی‌لیتر محلول هیپوتونیک پتاسیم کلراید افزوده شد و ۲-۳ بار پیپتاژ صورت گرفت. بلافاصله نمونه‌ها با دور ۱۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در ادامه به آرامی مایع فوقانی برداشته شد، به طوری که در حدود ۱ میلی‌لیتر ته لوله دست نخورده باقی ماند. جهت تثبیت سلول‌ها، ۲ میلی‌لیتر از محلول ثابت‌کننده سرد را قطره قطره به نمونه افزوده و سپس حجم نهایی نمونه با استفاده از این محلول به ۹ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس نمونه‌ها با دور ۸۰۰ rpm به مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول بالایی آن خارج گردید. این عمل به صورت پیپایی (حداقل ۳ بار) و تا زمانی که محلول رویی سلول‌ها شفاف و بی‌رنگ نماید ادامه پیدا کرد و در آخرین مرحله پس از سانتریفیوژ محلول بالایی به میزانی که ته



نمودار شماره ۱: حیات سلول‌های vero پس از ۴۸ ساعت قرار گرفتن در معرض سیس پلاتین در طیف وسیع غلظتی. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است. سیس پلاتین در غلظت ۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ایجاد سمیت سلولی نسبت به گروه کنترل منفی معنادار می‌باشد ($P < 0.001$:***).



نمودار شماره ۲: اثرات ال-آرژنین در غلظت‌های ۹/۳۵، ۱۸/۷۵، ۳۷/۵، ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ال-آرژنین در پیش درمانی با داروی سیس پلاتین در غلظت IC_{50} معادل ۱/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر رشد سلول‌های vero، داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است ($P < 0.001$:***، $P < 0.01$:###، $P < 0.001$:###).

اثرات ال-آرژنین در پیش درمانی با سیس پلاتین بر سلول‌های لنفوسیت خون در تست میکرونوکلتوس براساس نتایج نمودار شماره ۳، ال-آرژنین اثرات ژنوپروتکتیو قوی از خود نشان داده است به طوری که

حاوی یخ قرار داده شدند تا سرد شوند. سپس ۰/۵ میکرولیتر از n - بوتانل اضافه گردید. در مرحله پایانی بعد از اتمام سانتریفیوژ، ۱۵۰ میکرولیتر از محلول رویی در پلیت ریخته شد و جذب در طول موج ۵۳۵ nm خوانش شد (۳۵).

یافته‌ها

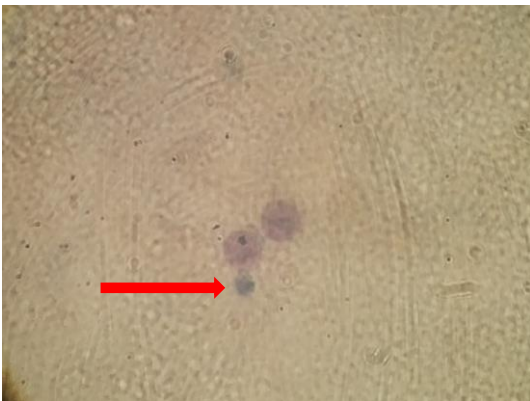
اثرات سیس پلاتین بر رشد سلول‌های نرمال کلیوی (vero) براساس آنچه که در نمودار شماره ۱ نمایش داده شده است، سمیت سلولی وابسته به دوز با سیس پلاتین مشاهده شد. زنده مانی سلول‌های نرمال کلیوی پس از ۴۸ ساعت به صورت وابسته به غلظت کاهش یافت که این اثر در غلظت‌های ۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.001$). براساس آنالیزهای صورت گرفته جهت تعیین میزان IC_{50} با استفاده از نرم‌افزار آماری prism ver.8 میزان IC_{50} برابر ۱/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمده است. این غلظت به عنوان غلظت بهینه سیس پلاتین در تست‌های بعدی انتخاب گردید.

اثرات ال-آرژنین در پیش درمانی با سیس پلاتین بر رشد سلول‌های نرمال کلیوی (vero)

همان‌طور که در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است، با افزایش غلظت ال-آرژنین حیات و درصد زنده مانی سلول‌های نرمال کلیوی افزایش پیدا کرده است. از لحاظ مقایسه آماری در غلظت‌های ۱۸/۷۵، ۳۷/۵، ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ال-آرژنین به همراه سیس پلاتین نسبت به گروه سیس پلاتین به تنهایی در مهار سمیت سلولی ناشی از سیس پلاتین با معناداری همراه بوده است ($P < 0.001$)، ($P < 0.01$)، اما در غلظت ۹/۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ال-آرژنین تفاوت معناداری با سیس پلاتین به عنوان گروه کنترل مثبت نداشته است. در مقایسه با گروه کنترل منفی گروه تریت با سیس پلاتین اختلاف معناداری را در القا سایتوتوکسیسیته در سلول‌های نرمال نشان داده است ($P < 0.001$).



تصویر شماره ۱: یک سلول دو هسته‌ای سالم (فاقد ریز هسته یا میکرونوکلئوس)

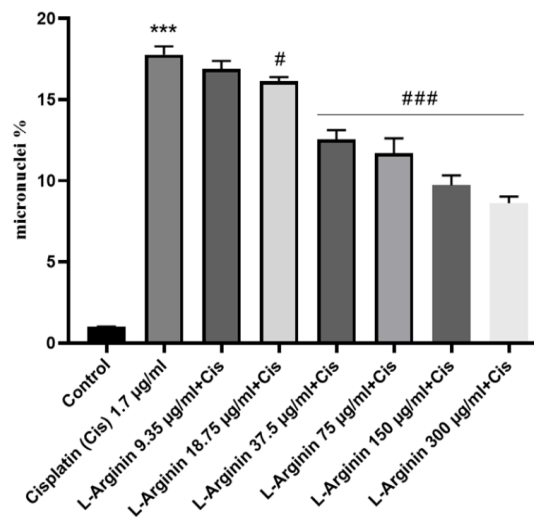


تصویر شماره ۲: سلول دو هسته‌ای آسیب دیده (واجد ریز هسته یا میکرونوکلئوس)

اثرات ال-آرژنین در پیش‌درمانی با سیس پلاتین بر میزان ROS و MDA

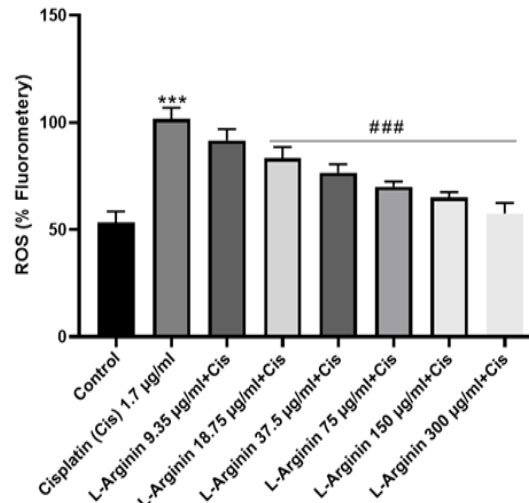
طبق نمودارهای شماره ۴ و ۵، میزان ROS و MDA در غلظت‌های ۱۸/۷۵، ۳۷/۵، ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ال-آرژنین به همراه سیس پلاتین با سطح معناداری ($P < 0/001$) در سلول‌های نرمال کلیوی (vero) کاهش یافته‌اند. در این بین غلظت ۹/۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر ال-آرژنین به همراه سیس پلاتین توانسته سطح ROS و MDA را کاهش دهد اما این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار نبودند. هم‌چنین بین گروه سیس پلاتین تنها به‌عنوان گروه کنترل مثبت اختلاف معناداری با گروه کنترل منفی در میزان گونه‌های فعال اکسیژن و مالون دی‌آلدهید نشان داده است ($P < 0/001$).

در غلظت‌های ۹/۳۵، ۱۸/۷۵، ۳۷/۵، ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به همراه سیس پلاتین توانسته میانگین تولید میکرونوکلئوس‌های هسته را در سلول‌های لنفوسیت خونی به‌طور معناداری کاهش دهد. با توجه به مقایسه آماری، در غلظت‌های ۱۸/۷۵، ۳۷/۵، ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تفاوت معناداری در کاهش تعداد ریز هسته‌ها مشاهده شده است ($P < 0/05$), ($P < 0/001$). در غلظت ۹/۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ال-آرژنین به همراه سیس پلاتین تفاوت معناداری با سیس پلاتین به تنهایی در کاهش سمیت ژنی وجود ندارد. گروه سیس پلاتین در غلظت ۱/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر تفاوت معناداری در القا آسیب به محتوای ژنتیکی در سلول‌های لنفوسیت خونی در مقایسه با گروه‌های کنترل منفی نشان داده است ($P < 0/001$). هم‌چنین در تصویر شماره ۱ یک سلول دو هسته‌ای فاقد ریز هسته یا میکرونوکلئوس و در تصویر شماره ۲ یک سلول دو هسته‌ای آسیب دیده و واجد ریز هسته مشاهده می‌شود.

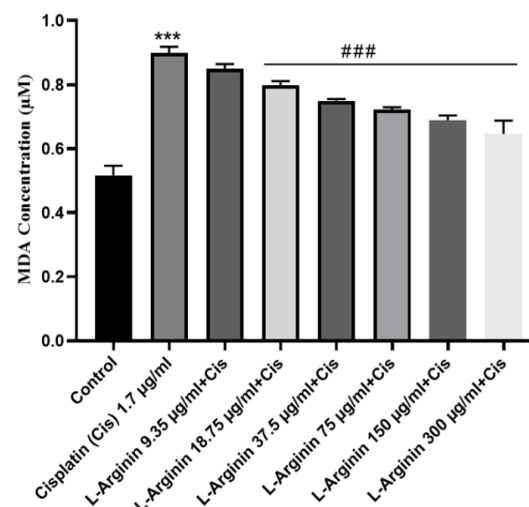


نمودار شماره ۳: اثرات ال-آرژنین در غلظت‌های ۹/۳۵، ۱۸/۷۵، ۳۷/۵، ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ال-آرژنین در پیش‌درمانی با داروی سیس پلاتین در غلظت IC_{50} ، معادل ۱/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر سلول‌های لنفوسیت خون در تست میکرونوکلئوس. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است ($P < 0/001$:***, $P < 0/001$:###, $P < 0/05$:#).

سرکوب استرس اکسیداتیو، سمیت سلولی و ژنتیکی ناشی از سیس پلاتین در رده سلولی نرمال کلیوی (vero) در تست های ROS, MDA, MTT و بر سلول های لنفوسیت خونی انسان در تست میکرونوکلئوس مورد بررسی قرار گرفت. داده های مطالعه حاضر نشان داد که ال-آرژنین با تعدیل استرس اکسیداتیو، سمیت سلولی و ژنتیکی ناشی از سیس پلاتین در رده سلولی نرمال کلیوی (vero) و سلول های لنفوسیت خون انسانی اثرات حفاظتی قابل ملاحظه ای را از خود نشان داده است. سیس پلاتین یک ترکیب سیتوتوکسیک و آلکیله کننده مبتنی بر پلاتین و یک داروی شیمی درمانی قوی است که برای درمان انواع سرطان های انسانی کاربرد دارد. نحوه عملکرد آن شامل اتصال کووالانسی به DNA، تشکیل ترکیبات افزایشی و در نتیجه آغاز آپوپتوز و/یا نکروز از طریق یک سری مکانیسم های بیوشیمیایی شامل استرس اکسیداتیو، آسیب DNA، و تداخل در مسیرهای مختلف انتقال سیگنال می باشد (۳۶، ۳۷). در مطالعه کشت سلولی حاضر درصد حیات سلول های نرمال کلیوی پس از ۴۸ ساعت مواجهه با غلظت های متفاوت سیس پلاتین، کاهش معنی داری پیدا کرده است که این بیانگر سمیت سلولی سیس پلاتین می باشد. براساس آنالیزهای صورت گرفته مهار ۵۰ درصد رشد در سلول های کلیوی مدل درسیس پلاتین برابر غلظت ۱/۷ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شده است. از طرفی سیس پلاتین با ایجاد اثرات ژنوتوکسیک قوی در تست میکرونوکلئوس اختلاف معناداری از خود نشان داده است. Dang و همکاران در سال ۲۰۱۷، اثرات هم افزایی ناشی از سیس پلاتین و متفورمین بر زنده مانگی سلول های سرطانی تخمدان را مورد مطالعه قرار دادند. براساس یافته ها متفورمین به همراه سیس پلاتین حیات سلولی را مهار و آپوپتوز را القا کردند (۳۸). در مطالعه Azab و همکاران در سال ۲۰۱۹ که به بررسی پتانسیل ژنوتوکسیک سیس پلاتین و کربوپلاتین به عنوان بخش جدایی ناپذیر بسیاری از رژیم های درمان ضد نوپلاستیک پرداختند. در این مطالعه که با استفاده از سنجش



نمودار شماره ۴: اثرات ال-آرژنین در غلظت های ۹/۳۵، ۱۸/۷۵، ۳۷/۵، ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ال آرژنین در پیش درمانی با داروی سیس پلاتین در غلظت IC_{50} ، معادل ۱/۷ میکروگرم بر میلی لیتر بر استرس اکسیداتیو (فاکتور ROS)، داده ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است ($P < 0.001$:***). ($P < 0.001$:###)



نمودار شماره ۵: اثرات ال-آرژنین در غلظت های ۹/۳۵، ۱۸/۷۵، ۳۷/۵، ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ال آرژنین در پیش درمانی با داروی سیس پلاتین در غلظت IC_{50} ، معادل ۱/۷ میکروگرم بر میلی لیتر بر میزان مالون دی آلدید (MDA). داده ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است ($P < 0.001$:***). ($P < 0.001$:###)

بحث

در این مطالعه، اثرات محافظتی ال-آرژنین در

ناهنجاری‌های کروموزومی (CAs) و تبادل کروماتیدهای خواهری (SCE) در لنفوسیت‌های انسانی مشخص شد که سیس پلاتین و کربوپلاتین افزایش معنی داری در CA و SCE در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند. با توجه به شاخص‌های میتوزی و پرولیفراتیو، هر دو داروی سیس پلاتین و کربوپلاتین به‌طور معنی داری شاخص میتوزی را کاهش دادند بدون این که بر شاخص پرولیفراتیو تأثیر بگذارند (۳۹). در پژوهش Shruthi و همکاران در سال ۲۰۱۸، اثرات ژنوتوکسیک سیس پلاتین به همراه گالیک اسید در موش‌های آلبینو سوئسی مورد مطالعه قرار گرفت. میزان سمیت ژنتیکی در حالت ترکیبی سیس پلاتین با گالیک اسید به‌طور قابل توجهی نسبت به تک درمانی‌ها افزایش یافت. یافته‌های حاضر نشان داد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسید گالیک ممکن است نقشی محوری در جلوگیری از فرکانس شکست رشته‌های کروموزومی و DNA ناشی از سیس پلاتین داشته باشد. حفاظت اعمال شده توسط اسید گالیک در برابر آسیب DNA ناشی از استرس اکسیداتیو را می‌توان به فعالیت مهار رادیکال آزاد آن نسبت داد (۴۰). براساس گزارش Cheki و همکاران در سال ۲۰۱۹، مشخص شد که سیس پلاتین سبب سمیت ژنتیکی و سمیت سلولی سلول‌های مغز استخوان موش شد. یافته‌های این پژوهش نشان داد که سیس پلاتین درصد قابل توجهی از ریزهسته‌ها در گلبول‌های قرمز پلی کروماتیک (MPEs) و ناهنجاری‌های کروموزومی را در مغز استخوان موش افزایش داد (۴۱). مطالعه حاضر با نتایج مطالعات ذکر شده جهت توکسیک بودن داروی سیس پلاتین در رده سلولی مدل همخوانی دارد.

هم‌چنین سیس پلاتین می‌تواند با ایجاد توالی پیچیده‌ای از تغییرات مولکولی از جمله القای استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی سبب افزایش التهاب، سیگنال‌دهی p53 و در نهایت فعال شدن مسیر آپوپتوز شود (۴۲، ۴۳). طبق تحقیقات صورت گرفته توسط Zhang و همکاران

در سال ۲۰۲۲، پیش تیمار با ملاتونین به‌طور قابل توجهی استرس اکسیداتیو ناشی از سیس پلاتین را به‌دلیل ویژگی‌های آنتی‌اکسیداتیو قوی کاهش داد. در این مطالعه مشخص شد سیس پلاتین با آزاد کردن ROS باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و در نهایت مرگ سلولی و نکروز می‌شود (۴۴). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۳ که بررسی سمیت کلیوی ناشی از سیس پلاتین پرداخته شد مشخص شد که درمان با سیس پلاتین باعث کاهش فعالیت کاتالاز (CAT)، گلوکاتیون پراکسیداز (GPx)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکاتیون دی سولفید ردوکتاز (GSR)، گلوکاتیون S-ترانسفراز (GST) و هم‌چنین گلوکاتیون (GSH) شد. در حالی که سطوح ROS و MDA را افزایش داد. نتایج این مطالعه نشان داد که تاماریکستین (TM) یک ترکیب پلی‌فنلی طبیعی توانست با مهار مسیر استرس اکسیداتیو مسمومیت کلیوی ناشی از سیس پلاتین را کاهش دهد (۴۵).

ال-آرژنین سوسترای NO سنتاز به‌عنوان یک ترکیب حذف‌کننده رادیکال‌های آزاد، توانسته در مطالعه کشت سلولی، در پیش‌تربت با سیس پلاتین در غلظت IC50، میانگین حیات سلول‌های نرمال کلیوی را افزایش و میزان MDA و ROS را کاهش دهد. در پژوهش Bozdereli Berikol در سال ۲۰۲۲ اثرات آنتی‌اکسیدانی و محافظت عصبی ال-آرژنین در موش صحرایی بررسی شد. در این مطالعه، کاهش مالون‌دی‌آلدهید و افزایش سطح TAC (Total antioxidant capacity) با تجویز L-arginine مشاهده شد (۴۶). در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۲۲، هیدروژل هیبرید پلی‌استر آمید/اسید هیالورونیک مبتنی بر ال-آرژنین با عملکرد دوگانه ضد التهاب و آنتی‌اکسیداتیو در تسریع بهبود زخم مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها حاکی از اثر هیدروژل هیبرید پلی‌استر آمید/اسید هیالورونیک مبتنی بر ال-آرژنین بر رادیکال‌های آزاد موجود در محیط و بهبود استرس اکسیداتیو بود. این ترکیب میزان ROS موجود در محیط را کاهش و میزان سنتز GSH افزایش داد (۴۷). براساس مطالعه

DNA یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های سمیت کلیوی سیس پلاتین است. نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نقش اساسی سیس پلاتین را در ایجاد استرس اکسیداتیو و آسیب به سلول را تایید می‌کند. ال-آرژنین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت توانست به‌طور معناداری میزان فاکتورهای استرس اکسیداتیو، سمیت سلولی و ژنتیکی را به ترتیب با کاهش میزان ROS و MDA، افزایش رشد سلول‌های نرمال کلیوی و کاهش تعداد ریز هسته‌ها (میکرونوکلئوس) در لئوسیت‌های خونی نشان دهد. بنابراین پیشنهاد می‌شود از ال-آرژنین به‌عنوان درمان مکمل در برابر آسیب‌های سلولی و ژنتیکی مشابه که ناشی از مواجهه با استرس اکسیداتیو است، استفاده نمود. هم‌چنین می‌توان در آینده اثرات سایتوپروتکتیو و ژنوپروتکتیو ال-آرژنین از دیدگاه ملکولی و مکانیسم‌های دقیق سیگنالینگ را بررسی کرد.

Sayed در سال ۲۰۲۳، ال-آرژنین سبب افزایش میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، سوپراکسید دسموتاز و گلوکوتایون پراکسیداز و کاهش سطوح فاکتور رشد تبدیل‌کننده بتا یک (TGF- β 1)، نیتریک اکساید (NO)، بیان نیتریک اکساید سنتاز (iNOS) و کاسپاز-۳ در عملکرد بیضه در موش‌های صحرایی دیابتی شد و یکپارچگی سلول سرتولی را حفظ کرد (۴۸). در پژوهشی دیگر در سال ۲۰۱۹ مشخص شد که ال-آرژنین با ویژگی آنتی‌اکسیدانی خود میزان ROS و MDA را کاهش داد و در نهایت رونویسی IL-6 و TNF- α را مهار کرد (۴۹). در مطالعه حیوانی نشان داده شد که ال-آرژنین به محافظت از سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو کمک می‌کند. ال-آرژنین می‌تواند فعالیت‌ها و بیان GSH-Px، SOD و CAT را در سلول‌ها تنظیم کند (۵۰). تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد و اختلال در

References

- Sadeghi F, Etebari M, Roudkenar MH, Jahanian-Najafabadi A. Lipocalin2 protects human embryonic kidney cells against cisplatin-induced genotoxicity. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR* 2018; 17(1): 147.
- Yang Y, Liu L, Tian Y, Gu M, Wang Y, Ashrafizadeh M, et al. Autophagy-driven regulation of cisplatin response in human cancers: Exploring molecular and cell death dynamics. *Cancer Letters* 2024: 216659.
- Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry* 2019; 88: 102925.
- Zhang J, Ye Z-w, Tew KD, Townsend DM. Cisplatin chemotherapy and renal function. *Advances in Cancer Research* 2021; 152: 305-327.
- Wang X, Zhou Y, Wang D, Wang Y, Zhou Z, Ma X, et al. Cisplatin-induced ototoxicity: From signaling network to therapeutic targets. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023; 157: 114045.
- Perše M. Cisplatin mouse models: Treatment, toxicity and translatability. *Biomedicines* 2021; 9(10): 1406.
- Volarevic V, Djokovic B, Jankovic MG, Harrell CR, Fellabaum C, Djonov V, et al. Molecular mechanisms of cisplatin-induced nephrotoxicity: a balance on the knife edge between renoprotection and tumor toxicity. *Journal of Biomedical Science* 2019; 26(1): 1-14.
- Qi L, Luo Q, Zhang Y, Jia F, Zhao Y, Wang F. Advances in toxicological research of the anticancer drug cisplatin. *Chemical Research in Toxicology* 2019; 32(8): 1469-1486.
- Mohammadi MM, Rismanchi H, Farahani A, Hedayati N, Alimohammadi M, Mafi A, et al. The emerging role of circular RNAs in

- cisplatin resistance in ovarian cancer: From Molecular mechanism to future potential. *Non-coding RNA Research*. 2024.
10. Fang C-y, Lou D-y, Zhou L-q, Wang J-c, Yang B, He Q-j, et al. Natural products: potential treatments for cisplatin-induced nephrotoxicity. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2021; 42(12): 1951-1969.
 11. Nazari A, Mirian M, Aghaei M, Aliomrani M. 4-Hydroxyhalcone effects on cisplatin-induced genotoxicity model. *Toxicology Research* 2021;10(1):11-7.
 12. Cisplatin Ghosh S. The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem* 2019; 88: 102925.
 13. Zhang K, Weng H, Yang J, Wu C. Protective effect of Liuwei Dihuang Pill on cisplatin-induced reproductive toxicity and genotoxicity in male mice. *Journal of Ethnopharmacology* 2020; 247: 112269.
 14. Han M, Zhang Z, Liu S, Sheng Y, Waigi MG, Hu X, et al. Genotoxicity of organic contaminants in the soil: A review based on bibliometric analysis and methodological progress. *Chemosphere* 2023; 313: 137318.
 15. Dong J, Wang J-q, Qian Q, Li G-c, Yang D-Q, Jiang C. Micronucleus assay for monitoring the genotoxic effects of arsenic in human populations: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 2019; 780: 1-10.
 16. Luzhna L, Kathiria P, Kovalchuk O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Frontiers in Genetics* 2013; 4: 131.
 17. Curry JN, McCormick JA. Cisplatin-induced kidney injury: delivering the goods. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 2022; 33(2): 255.
 18. Al-Eitan LN, Alzoubi KH, Al-Smadi LI, Khabour OF. Vitamin E protects against cisplatin-induced genotoxicity in human lymphocytes. *Toxicology In Vitro* 2020; 62: 104672.
 19. Uchida Y, Torisu K, Aihara S, Imazu N, Ooboshi H, Kitazono T, et al. Arginase 2 promotes cisplatin-induced acute kidney injury by the inflammatory response of macrophages. *Laboratory Investigation* 2023; 103(10): 100227.
 20. Gonzalez AM, Townsend JR, Pinzone AG, Hoffman JR. Supplementation with nitric oxide precursors for strength performance: A review of the current literature. *Nutrients* 2023; 15(3): 660.
 21. Fagiani MdAB, Fluminhan A, de Azevedo Mello F, Yabuki D, Gonçalves GV, Tsujigushi LK, et al. L-arginine minimizes immunosuppression and prothrombin time and enhances the genotoxicity of 5-fluorouracil in rats. *Nutrition* 2019; 66: 94-100.
 22. Gonzalez AM, Trexler ET. Effects of citrulline supplementation on exercise performance in humans: A review of the current literature. *The Journal of Strength & Conditioning Research* 2020; 34(5): 1480-1495.
 23. Izzo R, Trimarco V, Mone P, Aloè T, Marzani MC, Diana A, et al. Combining L-Arginine with vitamin C improves long-COVID symptoms: The LINCOLN Survey. *Pharmacological Research* 2022; 183: 106360.
 24. Tosato M, Calvani R, Picca A, Ciciarello F, Galluzzo V, Coelho-Júnior HJ, et al. Effects of l-arginine plus vitamin c supplementation on physical performance, endothelial function, and persistent fatigue in adults with long COVID: A single-blind randomized controlled trial. *Nutrients* 2022; 14(23): 4984.

25. Forzano I, Avvisato R, Varzideh F, Jankauskas SS, Cioppa A, Mone P, et al. L-Arginine in diabetes: clinical and preclinical evidence. *Cardiovascular Diabetology* 2023; 22(1): 1-7.
26. Meghji KA, Memon TF, Ahmed I, Memon SG, Noor N, Abbas A. Nephroprotective effects of L-Arginine against chemotherapy induced acute kidney injury in wistar rats. *Journal of Islamabad Medical & Dental College* 2020; 9(4): 249-255.
27. El-Sayed RM, Ahmed HI, Abd El-Lateef AES, Ali AA. Apoptosis perturbations and expression of regulatory inflammatory factors in cisplatin-depleted rat livers under l-arginine protection. *Can J Physiol Pharmacol* 2019; 97(5): 359-369.
28. Ozcan Yildirim S, Colakoglu N, Ozer Kaya S. Protective effects of L-arginine against aluminium chloride-induced testicular damage in rats. *Andrologia* 2022; 54(11): e14569.
29. Kuhestani S, Shokrzadeh M, Aghajanshakeri S, Shokrzadeh S. Protective Effects of Simvastatin on Cytotoxicity and Oxidative Stress in Human Gingival Fibroblasts Cells Exposed to Venlafaxine. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2022; 31(205): 81-88 (Persian).
30. Zhao Y, Jiang Q, Zhang X, Zhu X, Dong X, Shen L, et al. l-Arginine alleviates LPS-induced oxidative stress and apoptosis via activating SIRT1-AKT-nrf2 and SIRT1-FOXO3a signaling pathways in C2C12 myotube cells. *Antioxidants* 2021; 10(12): 1957.
31. Artanti AN, Prihapsara F, Susanto RK. Cytotoxic effects of parijoto (*Medinilla speciosa* Reinw. Ex. Bl.) methanol extract combined with cisplatin on WiDr colon cancer cells through apoptosis induction. *Indonesian Journal of Biotechnology* 2022; 27(2): 99-110.
32. Shokrzadeh M, Rahmati M, Gharekhani E, Zare R, Pourmohammadi P, Aghajanshakeri S. Pretreatment with Cilostazol Attenuates Carboplatin Induced Cytotoxicity and Genotoxicity in Bronchial Epithelial Cells (Beas-2B) and Human Blood Lymphocytes. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2023; 33(227): 24-36 (Persian).
33. Shokrzadeh M, Dashti A, Aghajanshakeri S, Pourabbas B, Ghassemi Barghi N, Ogunkunle A. Prevention effects of *Foeniculum vulgare* (Fennel) hydroalcoholic extract for threatened abortion by misoprostol induction in experimental mice. *Int J Trad Nat Med* 2019; 9(1): 1-16.
34. Shokrzadeh M, Habibi E, Shadboorestan A, Chabra A, Ahmadi A. The protective effects of *Origanum vulgare* L. extract on genetic damage of cyclophosphamide in mice blood lymphocytes using micronucleus test. *Pharmaceutical and Biomedical Research*. 2020.
35. Shokrzadeh M, Tasdighi A, Modanlo M, Shaki F. Evaluating and comparing genotoxicity mechanism of copper nanoparticles and copper sulfate. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2018; 28(163): 1-9 (Persian).
36. Dasari S, Njiki S, Mbemi A, Yedjou CG, Tchounwou PB. Pharmacological effects of cisplatin combination with natural products in cancer chemotherapy. *Int J Mol Sci* 2022; 23(3): 1532.
37. Crona DJ, Faso A, Nishijima TF, McGraw KA, Galsky MD, Milowsky MI. A systematic review of strategies to prevent cisplatin-induced nephrotoxicity. *The Oncologist* 2017; 22(5): 609-619.
38. Dang JH, Jin ZJ, Liu XJ, Hu D, Wang J, Luo Y, et al. Metformin in combination with

- cisplatin inhibits cell viability and induces apoptosis of human ovarian cancer cells by inactivating ERK 1/2. *Oncology Letters* 2017; 14(6): 7557-7564.
39. Azab B, Alassaf A, Abu-Humdan A, Dardas Z, Almousa H, Alsalem M, et al. Genotoxicity of cisplatin and carboplatin in cultured human lymphocytes: a comparative study. *Interdisciplinary Toxicology* 2019; 12(2): 93-97.
40. Shruthi S, Bhasker Shenoy K. Genoprotective effects of gallic acid against cisplatin induced genotoxicity in bone marrow cells of mice. *Toxicology Research* 2018; 7(5): 951-958.
41. Cheki M, Jafari S, Najafi M, Mahmoudzadeh A. Glucosamine protects rat bone marrow cells against cisplatin-induced genotoxicity and cytotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. 2019; 19(14): 1695-1702.
42. Fetoni AR, Paciello F, Troiani D. Cisplatin chemotherapy and cochlear damage: otoprotective and chemosensitization properties of polyphenols. *Antioxidants & Redox Signaling* 2022; 36(16-18): 1229-1245.
43. Abdel-Latif R, Fathy M, Anwar HA, Naseem M, Dandekar T, Othman EM. Cisplatin-induced reproductive toxicity and oxidative stress: ameliorative effect of kinetin. *Antioxidants* 2022; 11(5): 863.
44. Zhang J, Fang Y, Tang D, Xu X, Zhu X, Wu S, et al. Activation of MT1/MT2 to protect testes and leydig cells against cisplatin-induced oxidative stress through the SIRT1/Nrf2 signaling pathway. *Cells* 2022; 11(10): 1690.
45. Ijaz MU, Hayat MF, Almutairi BO, Almutairi MH, Riaz MN, Anwar H. Evaluation of possible palliative role of tamarixetin against cisplatin-induced renal toxicity by modulation of oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats. *Journal of King Saud University-Science* 2023; 35(6): 102787.
46. Bozdereli Berikol G, Berikol G, Ayrik C, Kose A, Bozkurt Babus S, Tamer Gumus L, et al. Antioxidant and Neuroprotective Effects of L-arginine Administration After Traumatic Brain Injury and Hemorrhagic Shock in Rats. *Turk Neurosurg* 2022; 33(3): 379-385.
47. Liu T, Liu G, Zhang J, Ding Z, Li Y, Sigdel K, et al. L-Arginine based polyester amide/hyaluronic acid hybrid hydrogel with dual anti-inflammation and antioxidant functions for accelerated wound healing. *Chinese Chemical Letters* 2022; 33(4): 1880-1884.
48. Sayed MM, Abd El-Rady NM, Gomaa WMS, Hosny A, Gomaa AMS. Antioxidant, antiapoptotic, and antifibrotic abilities of L-Arginine ameliorate the testicular dysfunction in diabetic rats. *Tissue Cell* 2023; 82: 102036.
49. Qiu Y, Yang X, Wang L, Gao K, Jiang Z. L-Arginine Inhibited Inflammatory Response and Oxidative Stress Induced by Lipopolysaccharide via Arginase-1 Signaling in IPEC-J2 Cells. *Int J Mol Sci* 2019; 20(7): 1800.
50. Yang JY, Zhang YF, Li YX, Meng XP, Bao JF. l-arginine protects against oxidative damage induced by T-2 toxin in mouse Leydig cells. *J Biochem Mol Toxicol* 2018; 32(10): e22209.