

Comparative Investigation of the Effect of α -pinene, Boron, and *Tribulus terrestris*, and Their Combination on Kidney Stones Induced by Ethylene Glycol in Rats

Alireza Keshavarz¹,
Maryam Ghorbani²,
Ebrahim Salimi-Sabour³,
Hadi Esmaili Gouvarchinghaleh⁴,
Javad Raouf Sarshoori⁵

¹ Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
² Assistant Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
³ Assistant Professor, Department of Pharmacognosy and Traditional Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
⁴ Assistant Professor, Applied Virology Research Center, Biomedicine Technologies Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
⁵ Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received October 31, 2024; Accepted March 8, 2025)

Abstract

Background and purpose: Kidney stones are a prevalent disease with a high recurrence rate. This study aimed to investigate the efficacy of *Tribulus terrestris*, α -pinene, and boron, both individually and in combination, in treatment and improvement of kidney stones in an animal model.

Materials and methods: In this experimental study, 1.0% (v/v) ethylene glycol was added to the drinking water of rats for 28 days to induce kidney stones. The animals were divided into six groups (n = 6): control group, ethylene glycol group, and four treatment groups that received ethylene glycol for 2 weeks, followed by ethylene glycol plus α -pinene (10 mg/kg), boron (15 mg/kg), *Tribulus terrestris* (60 mg/kg), or a combination of all three (same doses), administered daily by gavage from the second week until the end of the study. Biochemical parameters in plasma (creatinine, Ca, P, uric acid) and kidney tissue (Ca, phosphate, and oxalate) and histological evaluations were assessed. Data were analyzed with GraphPad Software. Comparisons were performed using one-way ANOVA and the Bonferroni test.

Results: The results indicated that in the ethylene glycol group, serum levels of creatinine, urea, uric acid, phosphorus, and calcium were elevated, and there was also an increase in calcium, phosphate, and oxalate levels in kidney homogenates, suggesting kidney damage. In the treatment groups, the aforementioned blood markers were reduced, indicating effective treatment. Histopathological analysis revealed kidney deposits in the ethylene glycol group, whereas the treatment groups showed a reduction in kidney deposits.

Conclusion: The results of this study indicate that *Tribulus terrestris*, α -pinene, and boron are effective in management of kidney stones. Moreover, the combination of these three compounds exhibited an improved effect. Results demonstrated that the group receiving all three treatments exhibited the greatest reduction in calcium oxalate crystals. Subsequently, the groups treated with α -pinene and boron, followed by those treated with *Tribulus terrestris*, showed progressively decreasing effects.

Keywords: ethylene glycol, boron, α -pinene, *Tribulus terrestris*, kidney stones

J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 35 (243): 14-26 (Persian).

Corresponding Author: Maryam Ghorbani - Faculty of Pharmacy, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. (E-mail: ghorbanimar422@gmail.com)

مقایسه اثر آلفاپینن، بورون و خارخاسک و ترکیب آن ها بر سنگ کلیه ناشی از اتیلن گلیکول در رت

علیرضا کشاورز^۱مریم قربانی^۲ابراهیم سلیمی صبور^۳هادی اسمعیلی گورچین قلعه^۴جواد رئوف سرشوری^۵

چکیده

سابقه و هدف: یکی از بیماری‌های شایع با میزان عود بالا، سنگ کلیه است. این مطالعه با هدف بررسی اثر و ایمنی خارخاسک، آلفاپینن و بورون و ترکیب این سه درمان بر روی سنگ کلیوی در مدل حیوانی، پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، برای القای سنگ کلیه در رت‌ها، ۲۸ روز اتیلن گلیکول ۱/۰ درصد حجمی/حجمی به آب آشامیدنی آن‌ها اضافه شد. حیوانات به شش گروه (n = ۶) گروه کنترل، گروه دریافت کننده اتیلن گلیکول و چهار گروه درمانی که به مدت ۲ هفته اتیلن گلیکول و از هفته دوم تا پایان مطالعه، علاوه بر اتیلن گلیکول، آلفاپینن (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، بورون (۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم)، خارخاسک (۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و ترکیب این سه دارو (با همان دوزها) را روزانه با روش گاواژ دریافت کردند، تقسیم شدند. پارامترهای بیوشیمیایی در سرم (کراتینین، اسید اوریک فسفر کلسیم) و در بافت کلیه (کلسیم فسفات و اگزالات) و همچنین مطالعه بافت کلیه از نظر تشکیل سنگ بررسی شد. نتایج با نرم افزار GraphPad آنالیز شد و تحلیل آماری با استفاده از one-way ANOVA و Bonferroni test صورت گرفت.

یافته‌ها: در گروه مسموم، سطح سرمی کراتینین، اوره، اسید اوریک، فسفر و کلسیم افزایش یافت و افزایش سطح کلسیم فسفات و اگزالات به صورت معنی دار در کلیه هموژنیزه مشاهده شد که نشان دهنده آسیب کلیوی بود. در گروه‌های درمانی، فاکتورهای سرمی و کلیه هموژنیزه به صورت معنی دار نسبت به گروه اتیلن گلیکول کاهش یافت، که نمایانگر موفق بودن درمان‌ها بود. هم چنین، شواهد هیستوپاتولوژی رسوبات کلیوی را در گروه اتیلن گلیکول نشان داد و در گروه‌های درمانی شواهد نشان دهنده کاهش رسوبات کلیوی بود.

استنتاج: ترکیبات طبیعی خارخاسک، آلفاپینن و بورون اثر درمانی در سنگ کلیه دارد. بیشترین کاهش در میزان کریستال‌های کلسیم اگزالات در گروهی بود که هر سه درمان را دریافت کردند. گروه‌های آلفاپینن و بورون و در نهایت گروه مصرف کننده خارخاسک به ترتیب اثرات کمتری را نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: اتیلن گلیکول، بورون، آلفاپینن، خارخاسک، سنگ کلیه

E-mail: ghorbanimar422@gmail.com

مؤلف مسئول: مریم قربانی - تهران، خیابان شیخ بهایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، دانشکده داروسازی

۱. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه فارماکولوژی و طب سنتی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

۴. استادیار، مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی، پژوهشکده فناوری های زیست پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

۵. استادیار، گروه تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۸/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۸/۱۲ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۱۲/۱۸

مقدمه

سنگ کلیه تهدیدی جدی برای سلامتی انسان است و می‌تواند منجر به بیماری مزمن کلیوی (Chronic kidney disease) شود (۱). این سنگ‌ها ذخایر معدنی در کالیس‌های کلیوی هستند که عمدتاً از اگزالات کلسیم تشکیل شده‌اند. سنگ کلیه می‌تواند درد شدیدی در قسمت پایین کمر، خون در ادرار، تهوع، استفراغ، تب و لرز ایجاد کند. این اختلال با افزایش خطر بیماری‌های مزمن کلیوی، نارسایی کلیه در مرحله نهایی، بیماری‌های قلبی عروقی و سایر بیماری‌های همراه مرتبط است (۲). میزان عود سنگ کلیه، بالا است و تا ۳۳ درصد از افراد مبتلا به سنگ کلیه در عرض ۵ سال سنگ دیگری را تجربه می‌کنند. غربالگری و مدیریت سنگ کلیه برای جلوگیری از پیشرفت CKD مهم است. سنگ کلیه نتایجی چون عفونت و خونریزی را می‌تواند به دنبال داشته باشد. عوامل متعددی می‌تواند خطر ابتلا به سنگ کلیه را افزایش دهد. مصرف یک رژیم غذایی با سطح بالای پروتئین، سدیم (نمک) و شکر ممکن است خطر ابتلا به برخی از انواع سنگ کلیه را افزایش دهد. مصرف زیاد نمک در رژیم غذایی مقدار کلسیمی را که کلیه‌ها باید تصفیه کنند افزایش می‌دهد و خطر ابتلا به سنگ کلیه را به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهد. سایر ریسک فاکتورهای ابتلا به سنگ کلیه شامل سابقه خانوادگی یا شخصی، چاقی، اختلالات دستگاه گوارش، جراحی، اختلالات متابولیک و عفونت‌های دستگاه ادراری می‌شود (۳،۴). راهکار درمانی این بیماری جراحی می‌باشد؛ ولی این روش در سنگ‌های کوچک ناکارآمد است. درمان شامل مصرف داروهای NSAIDs و استامینوفن و تامسولوسین می‌باشد. از طرفی ترکیبات عصاره‌های گیاهی نیز جایگاه خاصی در مدیریت درد و دفع سنگ کلیه در بیماران مبتلا دارد. در واقع، تعدادی از مطالعات قویاً استفاده از گیاهان دارویی را به عنوان یکی از درمان‌های ضد سنگ کلیه پیشنهاد می‌کنند. عوامل فعال زیستی مختلف موجود در گیاهان، مانند پلی‌فنل‌ها،

فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، فورانو کرومون‌ها، آلکالوئیدها و ترپنوئیدها ممکن است در توقف تشکیل سنگ‌ها مفید باشند و خواص ضد نفرولیتیایک قوی دارند. با این حال، نتایج آزمایشاتی که با این مواد طبیعی انجام شده است، هنوز در مراحل پیش‌بالینی است. گروه‌های مختلف گیاهان دارویی با پایه سنتی به عنوان داروهای ضد سنگ‌های ادراری متعلق به خانواده‌های Satavari, Meliaceae, Malvaceae, Amaranthaceae, Oxalidaceae, Crassulaceae, Saxifragaceae و غیره استفاده می‌شوند. با توجه به وجود فعالیت‌های ضد التهابی مانند آنتی‌اکسیدان، ضد درد، ادرار آور یا فعالیت‌های سنگ شکنی، این گیاهان به صورت تک یا چند گیاهی در فرمولاسیون‌های ضد نفرولیتیایک استفاده شده‌اند (۵).

آلفاپینن (*α-pinene*) مونوترپنی است که متابولیت ثانویه اصلی در گیاهان مخروطی می‌باشد. سایر منابع گیاهی غنی از آلفا پینن شامل اسانس‌های مشتق شده از گونه‌های *Piper nigrum* یا *Juniperus* هستند (۶). آلفا و بتا پینن فعالیت‌های بیولوژیکی متعددی از خود نشان داده‌اند که منجر به کاربردهای متنوعی مانند ضد ویروس، ضد میکروب، ضد قارچ شده است (۷). افزون بر این به عنوان ترکیباتی در داروهای کبدی و کلیوی استفاده می‌شوند (۸). همچنین این ترکیبات اثرات ضد التهاب و آنتی‌اکسیدان از خود نشان داده‌اند (۹). آلفاپینن به دلیل پتانسیل آن برای حل کردن سنگ کلیه مورد مطالعه قرار گرفته است و یک مطالعه نشان می‌دهد که آلفاپینن به همراه بتاپینن توانایی حل کردن سنگ کلیه را دارد (۱۰). با این حال باید توجه داشت که سطوح بالای آلفاپینن موجب تحریک کلیه می‌شود. همچنین قرار گرفتن در معرض آلفاپینن در موش با افزایش بروز ضایعات کلیوی همراه بوده است، بنابراین مطالعات بیش‌تری برای تعیین ایمنی و اثر آلفاپینن برای درمان سنگ کلیه در انسان مورد نیاز است (۱۱). بور (Boron) یک عنصر است که در متابولیسم کلسیم، ویتامین D، هورمون‌های

استروئیدی و حفظ غشای سلولی نقش دارد. مطالعات حیوانی و انسانی نشان داده است که دوزهای پایین بورون (۳-۱۰ میلی گرم در روز) از تشکیل سنگ کلیه جلوگیری می‌کند. با این حال، دوزهای بالای بورون تاثیر محافظتی در برابر سنگ های کلیه و استرس اکسیداتیو در یک مدل آزمایشی روی موش نداشته است (۱۲). خارخسک (Tribulus Terrestris) یک گیاه است که برای پیشگیری و درمان سنگ کلیه مورد بررسی قرار گرفته است. ثابت شده است که عصاره آن با پایین آوردن سطوح فسفات خطر تشکیل سنگ کلیه را در موش کاهش می‌دهد (۱۳). عصاره آن باعث مهار رشد بلورهای کلسیم اگزالات می‌شود و نقش سایتوپروتکتیو دارد (۱۴). هدف از انجام این مطالعه تعیین اثر درمانی فراورده گیاهی آلفایین و خارخاسک و بورون در سنگ کلیه و مقایسه اثرات تجویز همزمان آن‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آماده سازی شرایط آزمایشگاهی

در این مطالعه تجربی، ۳۶ سررت نر (نژاد ویستار) با میانگین وزنی 10 ± 200 گرم تحت شرایط استاندارد با دمای 2 ± 25 درجه سانتی گراد و با چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. در طول مطالعه، حیوانات به آب آشامیدنی و غذا دسترسی آزاد داشتند. هم چنین این مطالعه تحت کمیته اخلاق حیوانات انجام گرفته است (کد اخلاق، IR.BMSU.AEC.1402.057).

عصاره گیری

نمونه میوه خارخسک از فروشگاه معتبر گیاهان دارویی در تهران خریداری شد و در آزمایشگاه گیاهان دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) توسط متخصص فارماکوگنوزی شناسایی گردید و پس از پاکسازی با آسیاب به قطعات ریز تبدیل شد. سپس به روش پرکولاسیون با تکرار ۴ مرتبه

عصاره گیری شد و حلال عصاره حاصل توسط دستگاه تقطیر مدور تحت خلا پرانده گردید و عصاره تغلیظ شده در یخچال جهت طی مراحل بعدی نگهداری شد. عصاره گیری میوه خارخاسک با افزودن ۳ برابر اتانول ۷۰ درصد به ماده اولیه با استفاده از دکانور انجام شد و سپس اتانول از طریق تقطیر در خلا جدا گردید. در این روش، از ۲۱۲ گرم پودر خارخاسک، ۳۴,۳ گرم عصاره آبی به رنگ قهوه‌ای تیره به دست آمد.

آماده سازی مدل حیوانی

برای القای سنگ کلیه در مدل حیوانی، اتیلین گلیکول با خلوص ۹۹/۵ درصد (شرکت مرک، آلمان) به نسبت ۱ درصد حجمی/حجمی به آب خوراکی رت‌ها اضافه شد.

تعداد ۳۶ سررت به طور تصادفی به ۶ گروه ۶ تایی تقسیم شدند و تیمار رت‌های هر گروه در طول ۲۸ روز مطالعه به صورت زیر انجام شد.

گروه کنترل سالم (گروه A)، این گروه آب آشامیدنی خالص را در طول مدت مطالعه مصرف کردند. گروه کنترل منفی (گروه B)، به آب آشامیدنی این گروه ۱ درصد اتیلین گلیکول در طول مدت مطالعه اضافه می‌شود و در طول این دوره، اعضای این گروه هیچ درمان دیگری ندارند (۱۵). گروه C، در این گروه، از روز اول ۱ درصد اتیلین گلیکول در آب آشامیدنی دریافت کردند و از روز چهاردهم تا پایان مطالعه، به همراه اتیلین گلیکول، معادل آلفایین با مقدار ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت نمودند (۱۱).

گروه D، در این گروه، از روز اول ۱ درصد اتیلین گلیکول در آب آشامیدنی دریافت کردند و از روز چهاردهم تا پایان مطالعه، به همراه اتیلین گلیکول، معادل عصاره‌ی آبی خارخسک با مقدار ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت نمودند (۱۵).

گروه E، در این گروه، از روز اول ۱ درصد اتیلین

هموژنیزه کردن کلیه‌ها

هم‌چنین بافت کلیه راست نیز در ۱۵ میلی لیتر نیتریک اسید غلیظ قرار گرفت و بعد هموژنیزه شد و سپس در ساتریفیوژ با دور 3000×g به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت و سوپرناتانت محلول جدا گردید و برای ارزیابی میزان کلسیم و فسفر و اگزالات از دستگاه BT 3000 استفاده و اندازه‌گیری شد (۱۷).

آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه تحلیل شدند و اختلاف بین گروه‌ها با استفاده از آزمون تعقیبی (تست توکی) و با استفاده از نرم افزار SPSS 16 مورد ارزیابی قرار گرفت و $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

آنالیز سرم

در این مطالعه با تجویز اتیلن گلیکول ۱ درصد حجمی/حجمی به رت‌های نر سنگ‌هایی در مجاری ادراری و کلیه ایجاد شد. سطح خونی اوریک اسید، اوره و کراتینین در گروه اتیلن گلیکول نسبت به آب مقطر بالا رفت ($P < 0/001$). همچنین سطح سرمی کلسیم و فسفر در مقابل آب مقطر افزایش یافته بود. با این وجود به ترتیب گروه‌های هر سه درمان، بورون، آلفاپینن و خارخاسک بهترین اثر را داشتند و توانستند که سطح اوره، اوریک اسید، کلسیم، فسفر، کراتینین کاهش دهند. گروه اتیلن گلیکول نسبت به گروه کنترل سالم مقایسه شد و گروه‌های درمانی با گروه اتیلن گلیکول مقایسه شده‌اند. در مقایسه گروه‌های درمانی مختلف با گروه اتیلن گلیکول، تفاوت معنی‌دار در سطوح $P < 0/05$ و $P < 0/001$ می‌باشد.

با توجه به نمودار شماره ۱، گروه‌های درمانی "هر ۳ گروه درمانی (درمان سه تایی)" و "بورون" و "آلفاپینن" به ترتیب دارای بیش‌ترین تفاوت معنی‌دار با

گلیکول در آب آشامیدنی دریافت کردند و از روز چهاردهم تا پایان مطالعه، به همراه اتیلن گلیکول، معادل بورون با مقدار ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت نمودند (۱۳).

گروه F، در این گروه، از روز اول ۱ درصد اتیلن گلیکول در آب آشامیدنی دریافت کردند و از روز چهاردهم تا پایان مطالعه، به همراه اتیلن گلیکول، هر سه مورد را با هم دریافت نمودند (با همان دوزها در یک مجموعه، آلفاپینن با مقدار ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم + عصاره‌ی آبی خارخاسک با مقدار ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم + بورون با مقدار ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم). میزان تجویز درمان‌ها برای هر سررت محاسبه شد و به طور روزانه به آن‌ها گواژ شد.

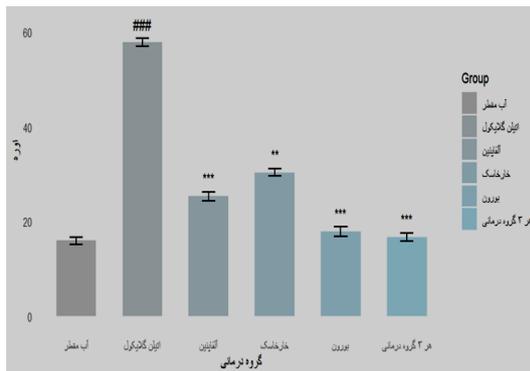
آنالیز سرم

بعد از اتمام دوره، رت‌ها حیوانات با کتامین (100 mg/kg) و زایلارین (10 mg/kg) بیهوش شدند و نمونه‌ی خون به طور مستقیم از قلب آن‌ها جمع آوری شد و به وسیله‌ی ساتریفیوژ با دور 10000×g به مدت ۱۰ دقیقه سرم خون جدا گردید و در آزمایشگاه سرولوژی مقدار اوره، اوریک اسید، کلسیم، فسفر و کراتینین سنجش شد (۱۶).

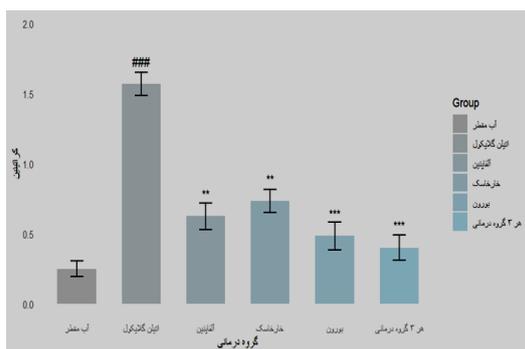
هیستوپاتولوژی کلیه

بعد از جمع آوری خون، جهت انجام بررسی بافتی سپس با برش جراحی کلیه‌ها برداشته و جهت تثبیت به مدت یک هفته داخل محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. پس از تثبیت از نمونه‌ها طی فرایند بافتی به صورت سریال مقاطع ۵ میکرون تهیه شد. لام‌ها با هماتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شدند. از مقاطع بافتی توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی 40x به صورت تصادفی ۱۰ تصویر گرفته شد. تصاویر پس از کالیبره شدن توسط نرم‌افزار پردازش تصویر Motic 1.2 میزان درصد وجود کریستال‌ها در نمونه‌های بافت مورد بررسی قرار گرفت (۱۷).

دارای بیشترین تفاوت معنی‌دار با گروه اتیلن گلیکول بوده‌اند که نشان‌دهنده بهتر بودن روند درمان در هر یک از این گروه‌ها می‌باشد. هم‌چنین پایین‌ترین سطح کراتینین ثبت شده به ترتیب مربوط به گروه‌های آب مقطر، هر ۳ گروه درمانی (درمان سه تایی)، بورون، آلفاپینین، خارخاسک و گروه اتیلن گلیکول می‌باشد. واحد بر حسب میلی گرم ماده بر حسب دسی لیتر خون است.

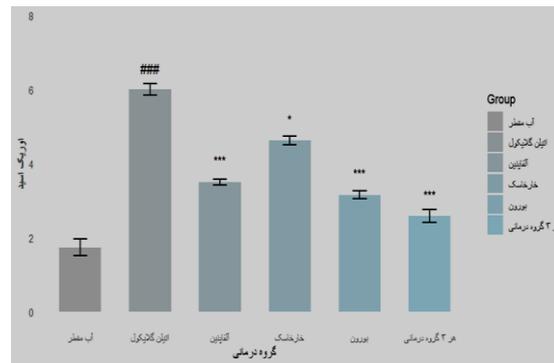


نمودار شماره ۲: مقایسه گروه‌های درمانی مختلف بر اساس سطح اوره سرمی، در مقایسه گروه اتیلن گلیکول با آب مقطر، ### نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.001$ می‌باشد. در مقایسه گروه‌های درمانی مختلف با گروه اتیلن گلیکول، * و ** به ترتیب نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطوح $P < 0.01$ و $P < 0.001$ می‌باشد.



نمودار شماره ۳: مقایسه گروه‌های درمانی مختلف بر اساس سطح کراتینین سرمی، در مقایسه گروه اتیلن گلیکول با آب مقطر، ### نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.001$ می‌باشد. در مقایسه گروه‌های درمانی مختلف با گروه اتیلن گلیکول، * و ** به ترتیب نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطوح $P < 0.01$ و $P < 0.001$ می‌باشد.

گروه اتیلن گلیکول بوده‌اند که نشان‌دهنده بهتر بودن روند درمان در هر یک از این گروه‌ها می‌باشد. هم‌چنین پایین‌ترین سطح اوریک اسید ثبت شده به ترتیب مربوط به گروه‌های آب مقطر، هر ۳ گروه درمانی (درمان سه تایی)، بورون، آلفاپینین، خارخاسک و گروه اتیلن گلیکول می‌باشد. واحد بر حسب میلی گرم ماده بر حسب دسی لیتر خون است.



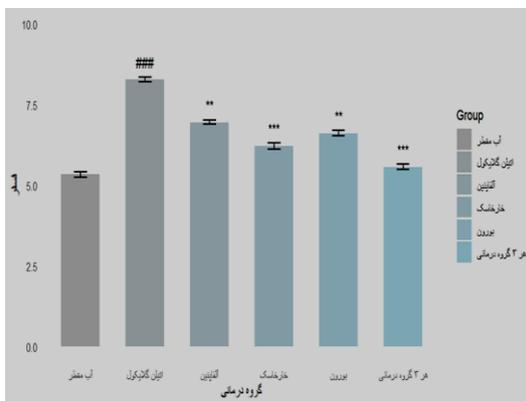
نمودار شماره ۱: مقایسه گروه‌های درمانی مختلف بر اساس سطح اوریک اسید سرمی، در مقایسه گروه اتیلن گلیکول با آب مقطر، ### نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.001$ می‌باشد. در مقایسه گروه‌های درمانی مختلف با گروه اتیلن گلیکول، * و ** به ترتیب نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطوح $P < 0.05$ و $P < 0.001$ می‌باشد.

بر اساس نمودار شماره ۲، گروه‌های درمانی "هر ۳ گروه درمانی (درمان سه تایی)" و "بورون" و "آلفاپینین" به ترتیب دارای بیشترین تفاوت معنی‌دار با گروه اتیلن گلیکول بوده‌اند که نشان‌دهنده بهتر بودن روند درمان در هر یک از این گروه‌ها می‌باشد. هم‌چنین پایین‌ترین سطح اوره ثبت شده به ترتیب مربوط به گروه‌های آب مقطر، هر ۳ گروه درمانی (درمان سه تایی)، بورون، آلفاپینین، خارخاسک و گروه اتیلن گلیکول می‌باشد. واحد بر حسب میلی گرم ماده بر حسب دسی لیتر خون است.

با توجه به نمودار شماره ۳، گروه‌های درمانی "هر ۳ گروه درمانی (درمان سه تایی)" و "بورون" به ترتیب

آنالیز کلیه‌های هموژنیزه شده

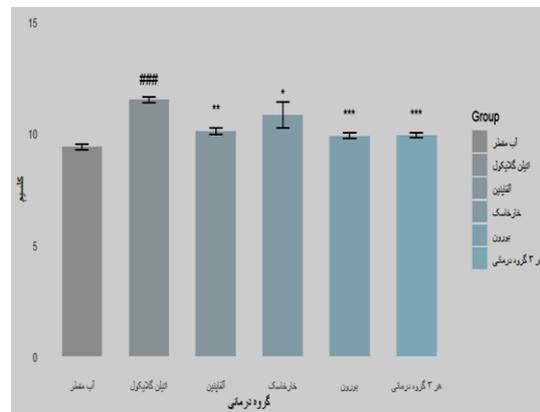
میزان سطح کلسیم و اگزالات و فسفات کلیه‌ی هموژنیزه شده در گروه اتیلن گلیکول به صورت قابل توجهی افزایش را نسبت به گروه کنترل سالم نشان داد ($P < 0/001$) محاسبه شد. اما نتایج گروه‌های درمانی در کاهش سطح این سه مورد به ترتیب هر سه درمان، بورون، آلفاپینن و خارخاسک بود که به معنی کاهش میزان حضور کریستال‌ها و رسوبات اگزالاتی و فسفات‌ی در بافت می‌باشد.



نمودار شماره ۵: مقایسه گروه‌های درمانی مختلف بر اساس سطح فسفر سرمی، در مقایسه گروه اتیلن گلیکول با آب مقطر، #### نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0/001$ می‌باشد. در مقایسه گروه‌های درمانی مختلف با گروه اتیلن گلیکول، * و ** و *** به ترتیب نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطوح $P < 0/01$ و $P < 0/001$ می‌باشد.

در نمودار شماره ۶، گروه‌های درمانی "هر ۳ گروه درمانی (درمان سه تایی)" و "بورون" به ترتیب دارای بیش‌ترین تفاوت معنی‌دار با گروه اتیلن گلیکول بوده‌اند که نشان دهنده بهتر بودن روند درمان در هر یک از این گروه‌ها می‌باشد. هم‌چنین پایین‌ترین سطح کلسیم ثبت شده به ترتیب مربوط به گروه‌های آب مقطر، هر ۳ گروه درمانی (درمان سه تایی)، بورون، آلفاپینن، خارخاسک و گروه اتیلن گلیکول می‌باشد. واحد بر حسب میلی‌گرم ماده در یک گرم کلیه‌ی هموژن شده می‌باشد.

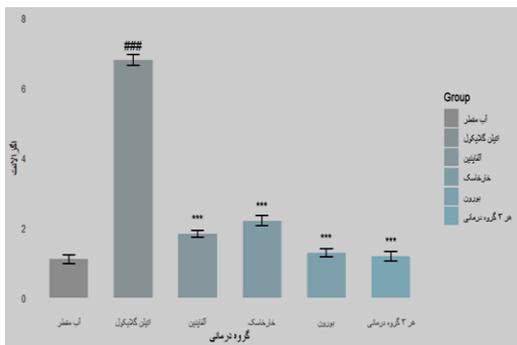
با توجه به نمودار شماره ۴، گروه‌های درمانی "بورون" و "هر ۳ گروه درمانی (درمان سه تایی)" به ترتیب دارای بیش‌ترین تفاوت معنی‌دار با گروه اتیلن گلیکول بوده‌اند که نشان‌دهنده‌ی بهتر بودن روند درمان در هر یک از این گروه‌ها می‌باشد. هم‌چنین پایین‌ترین سطح کلسیم ثبت شده به ترتیب مربوط به گروه‌های آب مقطر، بورون، هر ۳ گروه درمانی (درمان سه تایی)، آلفاپینن، خارخاسک و گروه اتیلن گلیکول می‌باشد. واحد بر حسب میلی‌گرم ماده بر حسب دسی‌لیتر خون است.



نمودار شماره ۴: مقایسه گروه‌های درمانی مختلف بر اساس سطح کلسیم سرمی، در مقایسه گروه اتیلن گلیکول با آب مقطر، #### نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0/001$ می‌باشد. در مقایسه گروه‌های درمانی مختلف با گروه اتیلن گلیکول، * و ** و *** به ترتیب نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطوح $P < 0/05$ و $P < 0/01$ و $P < 0/001$ می‌باشد.

در نمودار شماره ۵، گروه‌های درمانی "هر ۳ گروه درمانی (درمان سه تایی)" و "خارخاسک" به ترتیب دارای بیش‌ترین تفاوت معنی‌دار با گروه اتیلن گلیکول بوده‌اند. هم‌چنین پایین‌ترین سطح فسفر ثبت شده به ترتیب مربوط به گروه‌های آب مقطر، هر ۳ گروه درمانی (درمان سه تایی)، خارخاسک، بورون، آلفاپینن و گروه اتیلن گلیکول می‌باشد. واحد بر حسب میلی‌گرم ماده بر حسب دسی‌لیتر خون است.

با توجه به نمودار شماره ۸، همهی گروه‌های درمانی به ترتیب دارای تفاوت معنی‌دار با گروه اتیلن گلیکول بوده‌اند که نشان‌دهنده روند درمان خوب در هر یک از این گروه‌ها می‌باشد. هم‌چنین پایین‌ترین سطح انحرافات ثبت شده به ترتیب مربوط به گروه‌های آب مقطر، هر ۳ گروه درمانی (درمان سه تایی)، بورون، آلفاپینین، خارخاسک و گروه اتیلن گلیکول می‌باشد. واحد بر حسب میلی گرم ماده در یک گرم کلیه‌ی هموژن شده می‌باشد.



نمودار شماره ۸: مقایسه گروه‌های درمانی مختلف بر اساس سطح انحرافات بافتی بر حسب میلی گرم ماده بر گرم کلیه، در مقایسه گروه اتیلن گلیکول با آب مقطر، ### نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0/001$ می‌باشد. در مقایسه گروه‌های درمانی مختلف با گروه اتیلن گلیکول، *** نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0/001$ می‌باشد.

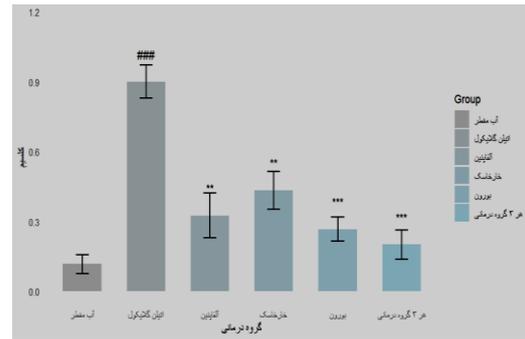
هیستوپاتولوژی

گروه کنترل سالم (A)

همان‌طور که تصویر شماره ۱، نشان می‌دهد، برش‌های بافتی کلیه در این گروه با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $\times 40$ مورد بررسی قرار گرفت و در هیچ یک از لوله‌های ادراری بافت کلیه رت‌های این گروه آسیبی به کلیه مشاهده نشد. تعداد تجمع بلوری انحرافات کلسیم در ۱۰ میدان میکروسکوپی در گروه کنترل سالم نسبت به گروه کنترل منفی تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P < 0/001$).

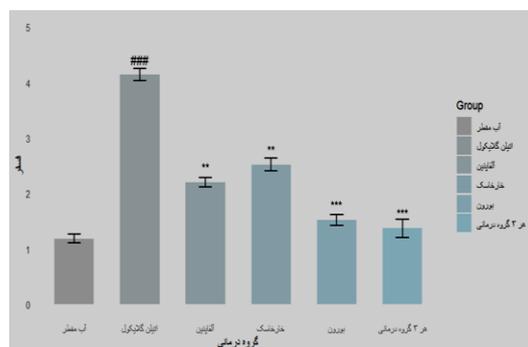
گروه کنترل منفی (B)

در این گروه که در طی ۲۸ روز مطالعه، اتیلن گلیکول دریافت می‌کردند، انحرافات کلسیم به وفور در بافت کلیه



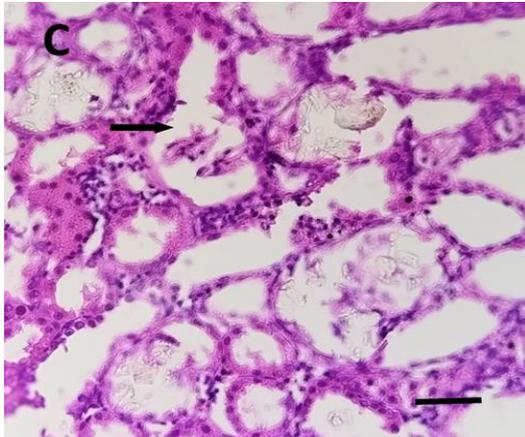
نمودار شماره ۶: مقایسه گروه‌های درمانی مختلف بر اساس سطح کلسیم بافتی بر حسب میلی گرم ماده بر گرم کلیه، در مقایسه گروه اتیلن گلیکول با آب مقطر، ### نشانگر وجود تفاوت معنادار در سطح $P < 0/001$ می‌باشد. در مقایسه گروه‌های درمانی مختلف با گروه اتیلن گلیکول، * و ** به ترتیب نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطوح $P < 0/01$ و $P < 0/001$ می‌باشد.

بر اساس نمودار شماره ۷، گروه‌های درمانی "هر ۳" دارای بیش‌ترین تفاوت معنی‌دار با گروه اتیلن گلیکول بوده‌اند که نشان‌دهنده بهتر بودن روند درمان در هر یک از این گروه‌ها می‌باشد. هم‌چنین پایین‌ترین سطح فسفر ثبت شده به ترتیب مربوط به گروه‌های آب مقطر، هر ۳ گروه درمانی (درمان سه تایی)، بورون، آلفاپینین، خارخاسک و گروه اتیلن گلیکول می‌باشد. واحد بر حسب میلی گرم ماده در یک گرم کلیه‌ی هموژن شده می‌باشد.

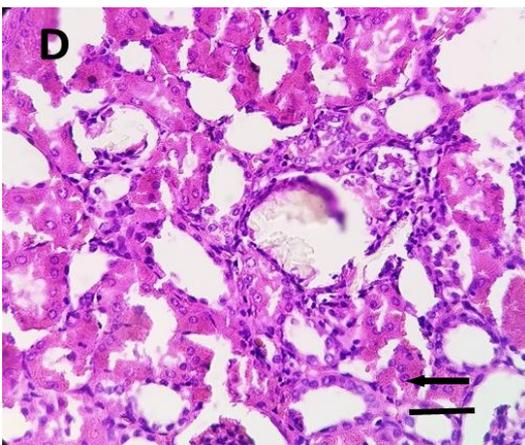


نمودار شماره ۷: مقایسه گروه‌های درمانی مختلف بر اساس سطح فسفات بافتی بر حسب میلی گرم ماده بر گرم کلیه، در مقایسه گروه اتیلن گلیکول با آب مقطر، ### نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0/001$ می‌باشد. در مقایسه گروه‌های درمانی مختلف با گروه اتیلن گلیکول، * و ** به ترتیب نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطوح $P < 0/01$ و $P < 0/001$ می‌باشد.

خارخاسک، بورون و هر سه درمان به طور همزمان در آب آشامیدنی دریافت کردند. در بررسی میکروسکوپی نمونه‌های بافتی، بلورهای اگزالات کلسیم با اندازه‌های متفاوت از بزرگ تا کوچک در لوله‌های ادراری به وضوح مشاهده شدند که قسمت‌های بیش تری از بافت کلیه را درگیر کرده بودند (تصویر شماره ۳). ده میدان میکروسکوپی به طور تصادفی مورد بررسی قرار گرفت که در آن هر واحد بلور شمارش شد و در مقایسه گروه‌ها با تست ANOVA و سپس Tukey، این گروه تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل منفی نشان داد ($P < 0/001$).

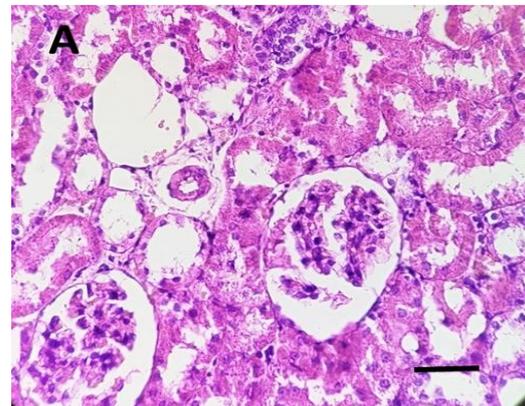


تصویر شماره ۳: تصویر میکروسکوپی 40x از بافت بعد از رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و اتوزین، تصویر (C) تحت درمان آلفاپینن می‌باشد.

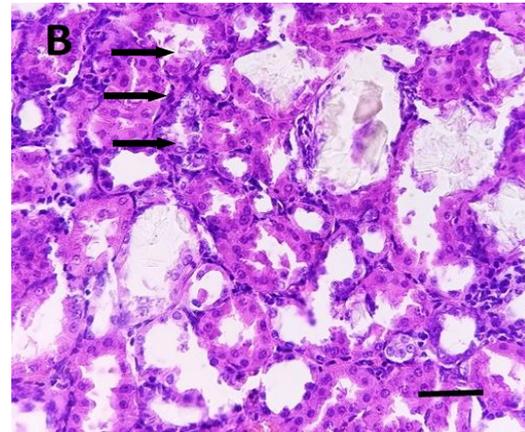


تصویر شماره ۴: تصویر میکروسکوپی 40x از بافت بعد از رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و اتوزین، تصویر (D) تحت درمان با خارخاسک می‌باشد.

رسوب کرده بود به گونه‌ای که در بررسی میکروسکوپی بافت کلیه تجمعات گسترده‌ای از بلورهای اگزالات کلسیم در تعداد زیادی از لوله‌های ادراری و در قسمت‌های مختلف لوله نظیر لوله پروگزیمال، لوله هنله، لوله دیستال و مجاری جمع‌کننده دیده شد (تصویر شماره ۲). در این میدان به طور تصادفی شمارش شد. روند تشکیل بلور به نحوی بوده که در مقایسه با گروه کنترل سالم افزایش معنی‌داری را نشان می‌داد ($P < 0/001$).



تصویر شماره ۱: تصویر میکروسکوپی 40x از بافت بعد از رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و اتوزین، تصویر (A) کنترل سالم می‌باشد.

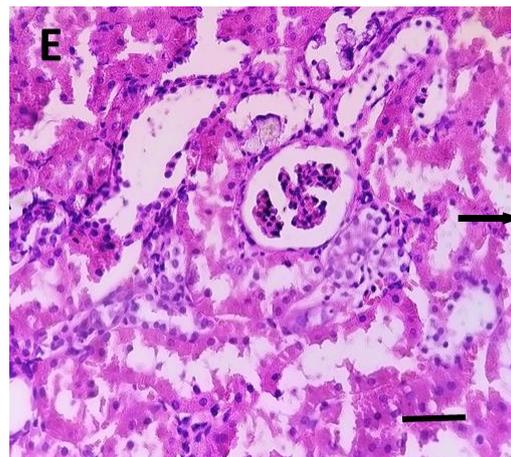


تصویر شماره ۲: تصویر میکروسکوپی 40x از بافت بعد از رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و اتوزین، تصویر (B) دریافت کننده ی اتیلن گلیکول می‌باشد.

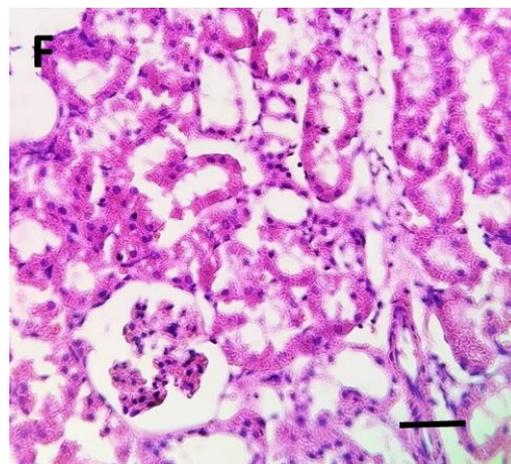
گروه‌های درمانی (C, D, E, F)

این گروه‌ها از روز اول تنها اتیلن گلیکول و از روز چهاردهم به همراه آن، به ترتیب آلفاپینن، عصاره

ملاحظه‌ای باعث کاهش آسیب پاتولوژیک و میزان کریستال و کاهش فاکتورهای سرمی و بافتی شدند. تشکیل سنگ می‌تواند با آسیب‌هایی که به مجاری ادراری وارد می‌کند باعث کاهش جریان ادراری شود که منجر به تجمع موادی مانند اوره و اوریک اسید و کراتینین می‌شود. همچنین مطالعات نشان می‌دهد که اتیلن گلیکول باعث ایجاد رسوب و التهاب در کلیه می‌شود (۲۳-۱۸). در پژوهش Mohamed و همکاران (۲۰۲۳) اثر عصاره آبی میوه‌های خارخاسک و برگ گزنه بر جرم کلیوی ناشی از اگزالات سدیم در موش‌های صحرایی نر آلینو بررسی شده است. تزریق اگزالات سدیم به مدت ده روز منجر به افزایش کراتینین سرم و سایر پارامترهای بیوشیمیایی و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت کلیه شد. اگزالات با القای تولید رادیکال‌های آزاد در بافت کلیه، استرس اکسیداتیو را تقویت می‌کند (۲۴). اما گروه‌های درمانی با عصاره‌های خارخاسک و گزنه بهبودهای قابل توجهی در وزن بدن، مصرف خوراک، عملکرد کلیه و سایر فاکتورها نشان دادند. نتایج هیستوپاتولوژیک نیز تأیید کننده این یافته‌ها بود و نشان داد که این عصاره‌ها با داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی می‌توانند بر کاهش دژنراسیون بافتی و تعداد سنگ‌ها تأثیر مثبت بگذارند (۲۴). در مطالعه‌ای توسط Kaushik و همکاران (۲۰۱۹) نشان داده شد که مداخلات درمانی مدرن برای سنگ کلیه ممکن است عوارض جانبی داشته باشند و به همین دلیل نیاز به درمان‌های جایگزین مانند داروهای گیاهی احساس می‌شود. تحقیقات نشان داده که عصاره آبی خارخاسک دارای پتانسیل ضد تشکیل سنگ و آنتی‌اکسیدانی است و به‌عنوان یک درمان امیدوارکننده برای سنگ کلیه مطرح می‌شود. در مطالعات روی موش‌های صحرایی، این عصاره بهبود عملکرد کلیوی، بازسازی ساختار طبیعی کلیه و کاهش اندازه کریستال‌های ادراری را نشان داده است. همچنین، مطالعه سمیت حاد نشان داده که این عصاره در دوزهای معین ایمن است و هیچ عارضه جانبی قابل توجهی



تصویر شماره ۵: تصویر میکروسکوپی با بزرگنمایی 40x از بافت که پس از رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و اتوزین تهیه شده است، تصویر (E) که تحت درمان با بورون قرار دارد.



تصویر شماره ۶: تصویر میکروسکوپی با بزرگنمایی 40x از بافت که پس از رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و اتوزین تهیه شده است، تصویر (F) که تحت هر سه درمان با هم قرار دارد.

بحث

در این مطالعه برای ایجاد مدل آزمایشگاهی سنگ کلیه از محلول ۱ درصد اتیلن گلیکول در رت استفاده گردید. پس از ۱۴ روز تشکیل سنگ اتفاق افتاد و تجویز تا ۲۸ روز ادامه پیدا کرد. این مدل با افزایش فاکتورهای سرمی اوره، اسید اوریک، کراتینین، کلسیم و اگزالات در سرم همراه بود. همچنین در بافت کلیه نیز افزایش اگزالات، کلسیم و فسفر ملاحظه شد. گروه‌های درمانی به خصوص درمان ترکیبی و بورون به طور قابل

مشاهده نشده است، که این شواهد علمی به پتانسیل درمانی و پیشگیرانه آن اشاره دارد (۲۵). در مطالعه حاضر، خارخاسک به خوبی قادر به کاهش میزان رسوبات و التهابات بوده و به عنوان یک داروی مؤثر در درمان سنگ کلیه عمل کرده است. هم‌چنین، با توجه به مکانیسم خود، توانسته سطح فسفر را بیش تر از دو درمان دیگر کاهش دهد و از تشکیل هسته‌های کلسیم اگزالاتی جلوگیری کند. به طور کلی، با توجه به تمامی تحلیل‌ها، این گیاه نسبت به دو درمان دیگر تأثیر کم تری داشته و می‌توان جایگزین‌های بهتری برای آن در محصولات در نظر گرفت.

در یک مطالعه بر روی موش‌ها، ۱۵ موش به مدت ۲۸ روز مکمل بورون (۳ میلی‌گرم) و ویتامین E (۲۰۰ واحد) به صورت روزانه دریافت کردند، در حالی که ۱۵ موش در گروه دارونما تنها غذا و آب استاندارد مصرف می‌کردند. پس از ۲۸ روز، نتایج آزمایش‌های میکروسکوپی کاهش معنی‌داری در رسوب کریستال‌های کلسیم در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل را نشان داد (۲۶). مطالعه حاضر از دوز بهینه بورون (۳ تا ۱۰ میلی‌گرم در روز) بهره برد و نشان داد که این درمان با تأثیرات خود بر متابولیسم کلسیم، ویتامین D و اثرات آنتی‌اکسیدانی به خوبی توانست سنگ کلیه ایجاد شده توسط ایتیلن‌گلیکول را درمان کند و به عنوان یکی از گزینه‌های درمانی مناسب انتخاب گردد.

آلفاپینن یک مونوترپن است که در گونه‌های مختلف گیاهی از جمله مخروطیان یافت می‌شود و به دلیل خواص ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی آن شناخته شده است. این ترکیب به خصوص در گیاه کاج وجود دارد و مطالعات اخیر نشان داده است که آلفاپینن ممکن است در جلوگیری از تشکیل سنگ کلیه نقش داشته باشد (۲۷، ۲۸). احتمالاً اثرات آنتی‌اکسیدانی این عامل بتواند اثر درمانی آن را توجیه کند در مطالعه انجام شده توسط Bouzenna مشخص شد آلفا پینن، سمیت آسپرین روی سلول‌ها به طور قابل توجهی بهبود و سطح

GSH را افزایش داد و سطوح MDA و کل SOD و فعالیت Mn-SOD را کاهش داد. علاوه بر این، فعال شدن p38 و JNK توسط آلفا پینن مسدود شد (۹). در بررسی دیگری پیش درمانی با آلفاپینن سبب کاهش آسیب اکسیداتیو ناشی از سیس پلاتین کاهش MDA، افزایش SOD، کاتالاز و گلوکوتایون شد و خواص کاهنده رادیکال‌های آزاد برای آلفاپینن مطرح شد. هم‌چنین فاکتورهای آپتوتیک و التهابی شامل TNF- α ، IL-6، NF- κ B و COX-2 ناشی از سیس پلاتین بواسطه مصرف آلفاپینن بهبود پیدا کرد در تحقیق حاضر در گروه آلفاپینن مشخص شد که این گیاه نیز به خوبی توانسته است میزان سنگ را کاهش دهد و در دوز مورد استفاده، بدون هیچ عارضه قابل مشاهده‌ای، سنگ را درمان کند. بنابراین، آلفاپینن نیز می‌تواند به عنوان یک گزینه درمانی مناسب در نظر گرفته شود.

به‌طور کلی، درمان با آلفاپینن، بورون و خارخاسک به کاهش رسوب و التهاب کمک می‌کند. نتایج سرمی نشان داد که در گروه آسیب‌دیده با ایتیلن‌گلیکول، سطح اوره، اوریک اسید و کراتینین افزایش یافته است، اما در گروه‌های درمانی این مقادیر کاهش یافته و به حالت طبیعی نزدیک شده‌اند. در تحلیل نتایج کلیه‌های حل شده در نیتریک اسید غلیظ، سطح کلسیم، اگزالات و فسفات کلیه هموژنیزه شده در گروه ایتیلن‌گلیکول به طور قابل توجهی بیش تر از گروه کنترل سالم بود. بیش‌ترین کاهش در این مقادیر در گروهی مشاهده شد که هر سه درمان را دریافت کردند. پس از آن، گروه‌های دریافت‌کننده ترکیبات بورون و آلفاپینن و در نهایت گروه مصرف‌کننده خارخاسک به ترتیب اثرات کم تری داشتند. نتایج به طور کلی نشان دهنده کاهش حضور کریستال‌ها و رسوبات اگزالاتی و فسفات‌های در بافت بودند. در نهایت، داده‌های هیستوپاتولوژی نشان داد که در گروه دریافت‌کننده ایتیلن‌گلیکول نسبت به گروه کنترل سالم، میزان التهاب و تعداد کریستال‌های کلسیم اگزالات افزایش یافته است،

دوزهای مختلف از عوامل درمانی وجود داشت و هم چنین بررسی های مکانیسمی نتایج جامع تری قابل ارائه بود.

سپاسگزاری

نویسندگان کمال تشکر را از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله ع ج به دلیل حمایت های مالی و سایر موارد مرتبط را دارند. لازم به ذکر است مقاله ای حاصل از پایان نامه مقطع دکتری حرفه ای دانشجوی داروسازی می باشد.

در حالی که در گروه های درمانی کاهش در تعداد کریستال ها مشاهده شد. هر سه نوع داده به دست آمده شامل نتایج سرمی، کلیه هموژنیزه شده و هیستوپاتولوژی یکدیگر را تأیید کردند و مؤثر بودن اثرات درمانی آلفاپینن، بورون و خارخاسک در سنگ کلیه با ترتیب اثر هر سه درمان با هم، بورون، آلفاپینن و در نهایت خارخاسک نشان دادند. این داروها به صورت هم افزا عمل کرده و بیش ترین تأثیر را زمانی نشان دادند که ترکیب این سه درمان استفاده شد. محدودیت در هزینه ها و حجم کار وجود داشت ولی چنانچه امکان بررسی

References

- Kampfrath T. Kidney Stones: Our Human Rocks. *Clin Chem* 2022; 68(8): 1113.
- Rule AD, Bergstralh EJ, Melton LJ, Li X, Weaver AL, Lieske JC. Kidney Stones and the Risk for Chronic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4(4): 804-811.
- Dawson CH, Tomson CR. Kidney stone disease: pathophysiology, investigation and medical treatment. *Clin Med (Lond)* 2012; 12(5): 467-471.
- Khalili P, Jamali Z, Sadeghi T, Esmaeili-Nadimi A, Mohamadi M, Moghadam-Ahmadi A, et al. Risk factors of kidney stone disease: a cross-sectional study in the southeast of Iran. *BMC Urol* 2021; 21(1): 141.
- Atmani F, Slimani Y, Mimouni M, Hacht B. Prophylaxis of calcium oxalate stones by *Herniaria hirsuta* on experimentally induced nephrolithiasis in rats. *BJU Int* 2003; 92(1): 137-140.
- Allenspach M, Valder C, Flamm D, Grisoni F, Steuer C. Verification of chromatographic profile of primary essential oil of *Pinus sylvestris* L. combined with chemometric analysis. *Molecules* 2020; 25(13): 2973.
- Rivas AC, Lopes PM, de Azevedo Barros MM, Costa Machado DC, Alviano CS, Alviano DS. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules* 2012; 17(6): 6305-6316.
- Sybilka D, Kowalczyk J, Asztemborska M, Ochocka RJ, Lamparczyk H. Chromatographic studies of the enantiomeric composition of some therapeutic compositions applied in the treatment of liver and kidney diseases. *J Chromatogr A* 1994; 665(1): 67-73.
- Bouzenna H, Hfaiedh N, Giroux-Metges MA, Elfeki A, Talarmin H. Potential protective effects of alpha-pinene against cytotoxicity caused by aspirin in the IEC-6 cells. *Biomed Pharmacother* 2017; 93: 961-968.
- Başar A. The dissolving effect of α -and β -pinenes in pine resin to kidney stone. *Acad J Med Pl* 2014; 2(6): 85-87.
- Tan J. Preventive Effect of Alpha-pinene on Cisplatin-induced Kidney Injury by Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis via NF- κ B Signaling Pathway. *Lett Drug Des Discov* 2023; 21(12):2416-2422.

12. Ergul AB, Kara M, Karakukcu C, Tasdemir A, Aslaner H, Ergul MA, et al. High doses of boron have no protective effect against nephrolithiasis or oxidative stress in a rat model. *Biol Trace Elem Res* 2018; 186(1): 218-225.
13. Naghii MR. Boron and antioxidants complex: a new concept for the treatment of kidney stones without rigorous pain. *Endocr Regul* 2014; 48(3):120-125.
14. Kamboj P, Aggarwal M, Puri S, Singla SK. Effect of aqueous extract of *Tribulus terrestris* on oxalate-induced oxidative stress in rats. *Indian J Nephrol* 2011; 21(3): 154-159.
15. Aggarwal A, Tandon S, Singla S, Tandon C. Diminution of oxalate-induced renal tubular epithelial cell injury and inhibition of calcium oxalate crystallization in vitro by aqueous extract of *Tribulus terrestris*. *Int Braz J Urol* 2010; 36:480-489.
16. Aslam M, Ahmad ST, Dayal R, Javid K, Umar S, Asiaf A, et al. Nephroprotective action of *Peucedanum grande* against cadmium chloride-induced renal toxicity in Wistar rats. *EXCLI J* 2012; 11(9): 444-452.
17. Kumar BN, Wadud A, Jahan N, Sofi G, Bano H, Makbul SA, et al. Antilithiatic effect of *Peucedanum grande* CB Clarke in chemically induced urolithiasis in rats. *J Ethnopharmacol* 2016; 194: 1122-1129.
18. Gupta M, Bhayana S, Sikka S. Role of urinary inhibitors and promoters in calcium oxalate crystallisation. *IJRPC* 2011; 1(4): 793-798.
19. Jameson JL, Loscalzo J. Harrison's nephrology and acid-base disorders, 3e (Harrison's Specialty). 3rd ed. New York: McGraw-Hill Education/Medical; 2016.
20. Fan J, Glass MA, Chandhoke PS. Impact of ammonium chloride administration on a rat ethylene glycol urolithiasis model. *Scanning Microsc* 1999; 13(2-3): 299-306.
21. Bobbitt WH, Williams RM, Freed CR. Severe ethylene glycol intoxication with multisystem failure. *West J Med* 1986; 144(2):225-228.
22. Thangarathinam N, Jayshree N, Metha AV, Ramanathan L. Effect of polyherbal formulation on ethylene glycol-induced urolithiasis. *Int J Pharm Pharm Sci* 2013; 5(3): 994-997.
23. Saadat M, Saadat I. Effect of two herbal products, *Prostatan* and *Sankol*, on human chromosomes. *J Adv Med Med Res* 2002; 10(40): 9-15.
24. Mohamed S, Zeima N, El-Melmoslemany A. The effect of *Tribulus terrestris* fruits and *Urtica dioica* leaves extracts on renal calculus induced by sodium oxalate in experimental rats. *Bull Natl Nutr Inst Arab Repub Egypt* 2023; 61(1): 100-137.
25. Kaushik J, Tandon S, Bhardwaj R, Kaur T, Singla SK, Kumar J, Tandon C. Delving into the antiurolithiatic potential of *Tribulus terrestris* extract through in vivo efficacy and preclinical safety investigations in Wistar rats. *Sci Rep* 2019; 9(1):15969.
26. Scorei IR. Calcium fructoborate: plant-based dietary boron as potential medicine for cancer therapy. *Front Biosci* 2011; S3:205-215.
27. Green AK, Haley SL, Barnes DM, Dearing MD, Karasov WH. Is alpha-pinene a substrate for permeability-glycoprotein in wood rats? *J Chem Ecol* 2006; 32:1197-1211.
28. Levin JO, Eriksson K, Falk A, Löf A. Renal elimination of verbenols in man following experimental α -pinene inhalation exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 1992; 63:571-573.