

تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه زنجبیل بر نیتروژن اوره خون (BUN) و کراتینین موشهای کوچک آزمایشگاهی

دکترمهرداد مدرسی^۱، دکتر منوچهر مصری پور^{**}، مژگان قبادی پور^{***}

^{*}استادیار گروه علوم دامی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان، ^{**}استاد گروه بیوشیمی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان
^{***}کارشناس ارشد گروه زیست شناسی - دانشگاه پیام نور اصفهان

تاریخ دریافت: ۱۵/۴/۳ تاریخ تأیید: ۱۵/۸/۶

چکیده:

زمینه و هدف: اکثر جمعیت جهان به خصوص در کشورهای در حال توسعه، برای احتیاجات اساسی بهداشتی خود از داروهای گیاهی استفاده می کنند. زنجبیل (*Zingiber officinale Roscoe*) یک چاشنی غذایی می باشد که از دو هزار سال پیش به عنوان دارو در طب چینی، پزشکی سنتی ایران و طب اسلامی استفاده شده است. از آنجایی که افزایش اوره سرم و سطوح کراتینین در آزمایش های کلینیکی بیانگر نارسایی کلیوی می باشد، این مطالعه با هدف بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی زنجبیل بر نیتروژن اوره خون و کراتینین به منظور ارزیابی عملکرد کلیه انجام شد.

روش بررسی: در یک مطالعه تجربی عصاره هیدروالکلی زنجبیل به صورت یک روز در میان در یک دوره ۲۰ روزه با دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم در ۴۸ ساعت به صورت داخل صفاقی به موشهای نر آزمایشگاهی تزریق شد. سپس خونگیری با استفاده از روش پانکسیون سینوس چشمی انجام و میزان نیتروژن اوره خون (BUN) و کراتینین اندازه گیری شد. داده ها با استفاده از آزمون های آنالیز واریانس یک طرفه و کروسکال والیس تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها: میانگین غلظت BUN در گروه کنترل $37/68 \pm 3/89$ و در گروههای دریافت کننده ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم در ۴۸ ساعت زنجبیل به ترتیب $21/54 \pm 11/38$ ($p < 0/05$)، $25/03 \pm 3/42$ ($p < 0/01$) و $20/79 \pm 6/61$ ($p < 0/01$) بود، ولی تغییر چشمگیری در سطوح کراتینین دیده نشد ($p > 0/05$). نسبت BUN به کراتینین در همه گروهها نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی داری نشان داد ($p < 0/05$).

نتیجه گیری: با توجه به نتایج این تحقیق زنجبیل می تواند برای تغییر نیتروژن اوره خون و نسبت BUN به کراتینین جهت بازگرداندن تعادل به بدن مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: اوره، زنجبیل، عصاره هیدروالکلی، کراتینین، نیتروژن.

مقدمه:

سلامتی و کاهش بیماری می گردد که احتمالاً به خاطر انواع گوناگون ترکیبات شیمیایی گیاهی (Phytochemicals) با خصوصیات آنتی اکسیدانی موجود در این غذاها می باشد (۱). زنجبیل گیاهی است از خانواده Zingiberaceae که به طور متداول در بسیاری از قسمت های دنیا جزئی از برنامه غذایی می باشد. از ریزوم زنجبیل معمولی پودری به نام ادویه

از گذشته های دور تا به امروز از گیاهان مختلف جهت درمان انواع بیماری ها استفاده می گردد. با پیشرفت علم و تکنولوژی آزمایش های مختلفی بر روی گیاهان، صورت گرفت تا اثرات شفا بخش گیاه ها و اثر ویژه هر گیاه بر بافت یا اندام خاص مشخص شود. گزارشات حاکی از آنست که مصرف میوه ها و سبزیجات باعث پیشرفت

^۱ نویسنده مسئول: اصفهان - دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان - گروه علوم دامی - تلفن: ۰۳۱۱-۵۳۵۴۰۰۱، E-mail: mehrdad_modaresi@hotmail.com

آنها ممکن است از پلاسما به توبولهای کلیوی منتقل شوند و تا چند برابر سطحی که در دیگر بافت ها یافت می شود تغلیظ گردند. به علاوه، کلیه ها تقریباً ۲۵ درصد برون ده قلبی را دریافت می کنند که توزیع مواد شیمیایی را به کلیه ها به خوبی افزایش می دهد. با انجام تحقیق و بررسی مشخص شد که تاکنون هیچ مطالعه ای در این زمینه صورت نگرفته است. لذا ضرورت ایجاد می کند که در ابتدا اثر این عصاره بر روی جانور سالم مورد بررسی قرار گیرد تا با مشاهده تغییرات ایجاد شده و بر اساس نتایج بدست آمده بتوان گام های بعدی یعنی اثر دارویی عصاره بر روی درمان بیماریهای کلیوی را بررسی کرد و از آنجایی که BUN و کراتینین از تست های معتبر بررسی عملکرد کلیه می باشند (۱۸) لذا این مطالعه با هدف بررسی تأثیر عصاره هیدروآلکلی زنجبیل بر نیتروژن اوره خون و کراتینین به منظور ارزیابی عملکرد کلیه انجام شد.

روش بررسی:

ریزوم زنجبیل از عطاری ها تهیه گردید و عصاره اتانولی آن با استفاده از پودر زنجبیل با الکل اتیلیک ۹۰ درصد به نسبت ۱ به ۳ تهیه شد. عصاره ها قبل از مصرف در یخچال نگهداری می شد. از آنجایی که به ازاء هر ۱۰ گرم از وزن بدن موشها ۰/۲ میلی لیتر از غلظت های فراهم شده به موشها در طول مدت آزمایش تزریق گردید به ترتیب دوزهای ۴۰، ۲۰، ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم در ۴۸ ساعت برای گروههای تجربی فراهم شد.

به منظور انجام آزمایش ها از موشهای کوچک آزمایشگاهی (موش سفید Souris) نر بالغ با نام علمی *Mus musculus* (Var. albinos) که از لانه حیوانات دانشکده داروسازی خریداری شده بود استفاده گردید. موشهای سوری در بدو ورود محدوده وزنی ۲۶

زنجبیل تهیه می کنند که طعم تند و معطر آن برای خوش طعم کردن غذاها از قدیم مورد استفاده بوده است (۲). جالینوس پزشک یونانی از زنجبیل به عنوان عامل تصفیه کننده بدن استفاده می کرد. او از زنجبیل برای درمان شرایطی که توسط عدم تعادل در بدن ایجاد شده بود استفاده می کرد (۳). در پزشکی سنتی از زنجبیل به عنوان جذب کننده رطوبت در اطراف سر و گلو و معده استفاده می کردند و با خوردن و یا در چشم کشیدن زنجبیل تیرگی چشم ناشی از رطوبت را درمان می کردند (۵،۴). در پژوهش های اخیر یافته اند که زنجبیل به خاطر انواع ترکیبات فعالش خصوصیات مختلف فارماکولوژیکی دارد که این ترکیبات شامل شوگالها و جینجرونها می باشند که مسئول عطر قوی آن هستند. زنجبیل همچنین گیاهی است که محتوی بیشترین آنتی اکسیدانها می باشد (۸،۷،۶،۱) و به عنوان دارو و چاشنی غذایی استفاده می گردد. تاکنون مطالعات بسیاری بر روی آن انجام گرفته و اثرات درمانی آن جهت درمان بیماری های مختلف بررسی شده است. مطالعات بیشتر نشان داده است که عصاره زنجبیل دارای خاصیت های ضد التهابی (۱۰،۹)، ضد باکتریایی (۱۱)، ضد قارچی (۱۳،۱۲)، تحریک سیستم ایمنی و خاصیت ضد میکروبی (۱۵،۱۴) می باشد. مطالعات *In vitro* نشان دادند که زنجبیل عامل درمانی جدیدی برای جمع آوری NO (پراکسی نیتريت) و تنظیم شرایط آسیب شناختی که توسط تولید بیش از حد NO و محصولات اکسیداسیونی آن ایجاد می گردد می باشد (۱۶) و رادیکال های آزاد بدن موش را مهار و یا جمع آوری می کند (۱۷). سیستم ادراری نیز یکی از سیستم های اصلی بدن است که در بیشتر پروتوکل های روتین جهت آزمایش تعیین مقدار سمیت، مورد بررسی قرار می گیرد. کلیه ها نقش اساسی در فیلتراسیون، متابولیسم و دفع گزنویوتیکها و یا محصولات متابولیکی آنها دارند. مواد شیمیایی و یا شکل های فعال متابولیکی

زرد رنگی تولید نمود که با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر شدت رنگ حاصل با طول موج ۴۷۵ نانومتر اندازه گیری شد. جذب نوری رنگ نارنجی حاصل از مجاورت کراتینین با اسید پیکریک در محیط قلیایی نیز با استفاده از طول موج ۵۰۰ نانومتر اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد (۱۸).

از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه برای مقایسه میانگین های متغیر های کمی در گروه های مستقل از یکدیگر، و به منظور تعیین مکان تفاوت بین گروهها در صورت وجود از آزمون تفاوت معنی دار حقیقی توکی استفاده شد. در صورت عدم پیروی داده ها از توزیع نرمال و همسان نبودن واریانس گروههای تحت مطالعه از آزمون کروسکال والیس استفاده شد.

یافته ها:

با بررسی و مقایسه میانگین غلظت نیتروژن اوره خون در سرم خون موشهای گروه کنترل و گروه های تجربی مشخص گردید که تفاوت معنی داری بین تیمار با دوز تجربی ۴۰ میلی گرم در کیلوگرم در ۴۸ ساعت زنجبیل با گروه شاهد وجود داشته است ($p < 0/01$) و همچنین تفاوت معنی داری بین تیمار با دوز تجربی ۱۰ میلی گرم در کیلوگرم در ۴۸ ساعت زنجبیل با گروه شاهد وجود داشته است ($p < 0/05$) و نیز در سطح $p < 0/01$ تیمار با دوز تجربی ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم در ۴۸ ساعت نتور زنجبیل با گروه کنترل تفاوت معنی داری را نشان می دهد (جدول شماره ۱).

در بررسی و مقایسه میانگین غلظت کراتینین در سرم خون موشهای گروه کنترل و گروههای تجربی بر حسب واحد میلی گرم بر دسی لیتر مشخص گردید تفاوت معنی داری وجود نداشته است (جدول شماره ۱).

با بررسی و مقایسه میانگین نسبت BUN به کراتینین

تا ۳۱ گرم داشتند که به مدت دو هفته جهت سازش با محیط جدید در لانه حیوانات دانشگاه پیام نور مرکز اصفهان با دوره نوری طبیعی نگهداری شدند. در طول دوره آزمایش از قفس های پلاستیکی شفاف (پلی پروپیلن) استاندارد استفاده شد. جهت بستر از خاک اره و پنبه هم به عنوان عایق حرارتی، هم جاذب ادرار و مدفوع استفاده شد. موشها در خوردن غذا و نوشیدن آب هیچ محدودیتی نداشتند. در این پژوهش تعداد ۳۲ عدد موش به ۴ گروه شاهد (هیچ تزریقی انجام نشد) گروه یک (تزریق زنجبیل با دوز ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم در ۴۸ ساعت) گروه دو (تزریق زنجبیل با دوز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم در ۴۸ ساعت) و گروه سه (تزریق زنجبیل با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم در ۴۸ ساعت) تقسیم شدند که در هر گروه ۸ موش قرار داشت. از آنجایی که موشها نر بودند سعی شد در قفس ها به صورتی قرار بگیرند که حداقل برخورد ممکن را داشته باشند و کمتر نزاع کنند و در طول آزمایش به صورت مسالمت آمیز با همدیگر به سر برند. در کار با موشها سعی بر این بود که اصول اخلاقی تا حد ممکن رعایت شود.

بین ساعت های ۱۴-۱۱ ظهر ابتدا هر موش وزن شده و بر اساس وزنش به ازاء هر ده گرم وزن بدن ۰/۲ میلی لیتر محلول تزریقی برای آن در نظر گرفته می شد و تزریق به صورت داخل صفاقی صورت می گرفت. پس از یک دوره تیمار ۲۰ روزه به صورت یک روز در میان خونگیری انجام شد. خونگیری با استفاده از روش پانکسیون سینوس چشمی با استفاده از لوله همتوکریت صورت پذیرفت. جهت جداسازی سرم، لوله های آزمایش با دوز ۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفوژ قرار گرفتند. سپس مطابق روشهای معمول اندازه گیری اوره، دی استیل حاصل از هیدرولیز معرف دی استیل مونواکسیم با اوره ترکیب و محصول نهایی

جدول شماره ۱: مقایسه میانگین غلظت نیترژن اوره خون (BUN) و کراتینین در گروه‌های دریافت کننده عصاره هیدروالکلی زنجبیل و کنترل

| گروه | متغیر | اوره خون | کراتینین | نسبت نیترژن اوره خون به کراتینین |
|--------|-------|---------------|-------------|----------------------------------|
| کنترل | | ۳۷/۶۸±۴/۸۹ | ۰/۳۵۲±۰/۰۶۹ | ۱۱۰/۴۱±۱۲/۶۸ |
| گروه ۱ | | ۲۱/۵۴±۱۱/۳۸* | ۰/۴۰۲±۰/۰۶۷ | ۵۱/۹۰±۸/۱۷* |
| گروه ۲ | | ۲۵/۰۳±۳/۴۲** | ۰/۴۵۳±۰/۰۵۱ | ۵۵/۹۴±۳/۰۴* |
| گروه ۳ | | ۲۰/۷۹± ۶/۶۱** | ۰/۳۸۷±۰/۰۸۳ | ۵۴/۳۴±۵/۸۳* |

- گروه کنترل: بدون دریافت هیچگونه عصاره‌ای. - گروه ۱: دریافت کننده ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم در ۴۸ ساعت. - گروه ۲: دریافت کننده ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم در ۴۸ ساعت. - گروه ۳: دریافت کننده ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم در ۴۸ ساعت. - داده‌ها به صورت انحراف معیار میانگین و بر حسب میلی گرم بر دسی لیتر است.
* $p < 0.05$ نسبت به گروه کنترل ** $p < 0.01$ نسبت به گروه کنترل

(از طایفه گل صد تومانی یا صد برگ) انجام گرفته است می باشد (۲۰) و نیز مشابه مطالعات Tirkey و همکاران بر گیاه *Curcuma longa L.* عضوی دیگر از خانواده زنجبیل می باشد (۲۱) و بر خلاف نتایج Hsu و همکاران بر روی گیاه *Erycibe obtusifolia* است (۲۲). از این یافته‌ها می توان به این نتیجه رسید که زنجبیل روی عملکرد کلیه اثر منفی ندارد. بلکه تا حدودی اثر مثبت در دفع مواد زائد دارد. به نظر می رسد که زنجبیل در ناحیه انتهایی مجاری جمع کننده ادرار که ناحیه باز جذب اوره شناخته شده است (۱۷) باز جذب اوره را در این ناحیه کاهش داده است.

استفاده از سطوح کراتینین پلاسما ابزاری برای ارزیابی عملکرد کلیه می باشد. با توجه به اینکه گزارش شده است که روش آلکالین پیکرات که روش روتین اندازه گیری کراتینین می باشد میزان کراتینین را بیشتر از مقدار واقعی کراتینین پلاسما نشان می دهد (۲۳)، میزان کراتینین اندازه گیری شده در آزمایش‌های انجام شده بسیار کم می باشد. در انسان سطوح کراتینین حدود ۰/۵-۱/۳ mg/dl می باشد در صورتی که میانگین

در سرم خون موشهای گروه کنترل و گروههای تجربی تفاوت معنی داری در همه گروهها نسبت به گروه کنترل وجود داشت ($p < 0.05$) (جدول شماره ۱).

بحث:

به منظور بررسی اثر زنجبیل بر سیستم ادراری موشهای کوچک آزمایشگاهی، موشها در معرض دوزهای مختلف تنور زنجبیل قرار گرفتند که این امر منجر به ایجاد تغییراتی در فاکتورهای خونی آنها گردید که در مطالعه حاضر اثر زنجبیل به طور اختصاصی بر سطوح نیترژن اوره خون و کراتینین آنها بررسی گردید. سطوح BUN در موشهای گروه کنترل حدود ۳۷±۵ میلی گرم بر دسی لیتر می باشد که در مقایسه با BUN طبیعی در سرم خون انسان که بین ۸-۲۵ میلی گرم بر دسی لیتر است (۱۹)، به طور قابل توجهی بیشتر است.

نتایج نشان داد که تیمار با زنجبیل در همه دوزها موجب کاهش معنی داری در میزان غلظت نیترژن اوره خون نسبت به گروه شاهد شد. این نتیجه مشابه مطالعات Huang و همکاران که بر روی گیاه *Radix paeoniae ALBA*

خالص شده سم مار و یا داروی سیس پلاتین کلیه هایش تخریب شده است) بهتر است که صورت پذیرد.

نتیجه گیری:

با توجه به نتایج این تحقیق زنجبیل می تواند برای تغییر نیتروژن اوره خون و نسبت BUN به کراتینین جهت بازگرداندن تعادل به بدن مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از تمامی کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند قدردانی می گردد.

کراتینین گروه شاهد برابر ۰/۳۵ mg/dl در موش است. با توجه به وزن کم موشهای کوچک آزمایشگاهی به همان نسبت هم میزان کراتینین حاصل از ماهیچه های آنها بسیار اندک است که میزان کراتینین کم موجود در سرم خون موشها مؤید این امر است و همانگونه که ملاحظه می شود میزان کراتینین در گروههای مختلف در مقایسه با گروه شاهد تغییر چشمگیری ننموده است. نتایج نشان می دهند که احتمالاً زنجبیل به خاطر خاصیت آنتی اکسیدانی قویی که دارد باعث کاهش BUN شده و پیشنهاد می شود که بررسی اثر آن بر نمونه هایی با افت کلیوی با استفاده از حیوان مدل بیمار کلیوی (حیوانی که با استفاده از الکل مطلق یا پروتئیناز

منابع:

1. Lako J, Trenerry C, Wahlqvist ML, Wattanapenpaiboon N, Sotheeswaran S, Premier R. Total antioxidant capacity and selected flavonols and carotenoids of some Australian and Fijian fruits and vegetables. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2004; 13(Suppl): S127.
2. اوکالاهاان کریستوفر، برنر باری ام. فیزیوپاتولوژی کلیه. ترجمه: علی خواه دکتر حسین. تهران: انتشارات قاضی جانی با همکاری گلبن و آریان طب. ۱۳۸۲، ۳۹-۱۲.
3. Murata P, Kase Y, Ishige A, Sasaki H, Kurosawa S, Nakamura T. The herbal medicine Dai-kenchu-to and one of its active components [6]-shogaol increase intestinal blood flow in rats. *Life Sci.* 2002 Mar; 70(17): 2061-70.
4. ابوعلی سینا شیخ رئیس. قانون در طب (کتاب دوم). تهران: انتشارات سروش. ۱۳۷۰. ۴۰-۲۳۷.
5. محمد بن زکریا الرازی الطیب ابوبکر. الحاوی فی الطب (الجزء الثانی) فی أمراض العین. تهران: انتشارات مجلس دائرة المعارف العثمانیه. ۱۳۷۴، ۳۰-۲۲۱.
6. Blomhoff R. Antioxidants and oxidative stress. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2004 Jun; 124(12): 1643-5.
7. Murcia MA, Egea I, Romojaro F, Parras P, Jimenez AM, Martinez-Tome M. Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives. Influence of irradiation procedure. *J Agric Food Chem.* 2004 Apr; 52(7): 1872-81.
8. Halvorsen BL, Holte K, Myhrstad MC, Barikmo I, Hvattum E, Remberg SF, et al. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *J Nutr.* 2002 Mar; 132(3): 461-71.
9. Frondoza CG, Sohrabi A, Polotsky A, Phan PV, Hungerford DS, Lindmark L. An in vitro screening assay for inhibitors of proinflammatory mediators in herbal extracts using human synoviocyte cultures. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2004 Mar-Apr; 40(3-4): 95-101.

10. Thomson M, Al-Qattan KK, Al-Sawan SM, Alnaqeeb MA, Khan I, Ali M. The use of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) as a potential anti-inflammatory and antithrombotic agent. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002 Dec; 67(6): 475-8.
11. Akoachere JF, Ndip RN, Chenwi EB, Ndip LM, Njock TE, Anong DN. Antibacterial effect of *Zingiber officinale* and *Garcinia kola* on respiratory tract pathogens. *East Afr Med J*. 2002 Nov; 79(11): 588-92.
12. Ficker CE, Amason JT, Vindas PS, Alvarez LP, Akpagana K, Gbeassor M, et al. Inhibition of human pathogenic fungi by ethnobotanically selected plant extracts. *Mycoses*. 2003 Feb; 46(1-2): 29-37.
13. Ficker C, Smith ML, Akpagana K, Gbeassor M, Zhang J, Durst T, et al. Bioassay-guided isolation and identification of antifungal compounds from ginger. *Phytother Res*. 2003 Sep; 17(8): 897-902.
14. Jagetia GC, Baliga MS, Venkatesh P, Ulloor JN. Influence of ginger rhizome (*Zingiber officinale* Rosc) on survival, glutathione and lipid peroxidation in mice after whole-body exposure to gamma radiation. *Radiat Res*. 2003 Nov; 160(5): 584-92.
15. Tan BK, Vanitha J. Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional Chinese medicinal herbs: a review. *Curr Med Chem*. 2004 Jun; 11(11): 1423-30.
16. Baliga MS, Jagetia GC, Rao SK, Babu K. Evaluation of nitric oxide scavenging activity of certain spices in vitro: a preliminary study. *Nahrung*. 2003 Aug; 47(4): 261-4.
17. Liu N, Huo G, Zhang L, Zhang X. Effect of *Zingiber officinale* Rosc on lipid peroxidation in hyperlipidemia rats. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2003 Jan; 32(1): 22-3
۱۸. مشتاقی سید علی اصغر. بیوشیمی آزمایشگاهی (عمومی و کلینیکی). اصفهان: انتشارات جهاد دانشگاهی. ۱۳۷۷، ۱۲۷.
۱۹. مورای راب، گرانر داریل، مایس پیتر، رادول ویکتور. بیوشیمی هارپر. ترجمه: پاسالار پروین، ملک نیا ناصر، نیاورانی احمدرضا. تهران: انتشارات سماط. ۱۳۸۱، ۱۰۱۰.
20. Huang L, Shi P, Wang X. The effect of the extract from *Radix Paeoniae alba* on IgA Glomerulonephritis in mice. *Zhong Yao Cai*. 2003 Feb; 26(2): 109-11.
21. Tirkey N, Kaur G, Vij G, Chopra K. Curcumin, a diferuloylmethane, attenuates cyclosporine-induced renal dysfunction and oxidative stress in rat kidneys. *BMC Pharmacol*. 2005 Oct; 5: 15.
22. Hsu HY, Lin CC, Chen JY, Yang JJ, Zhang R. Toxic effects of *erycibe obtusifolia*, a Chinese medicinal herb, in mice. *J Ethnopharmacol*. 1998 Sep; 62(2): 101-5.
23. Dunn SR, Qi Z, Bottinger EP, Breyer MD, Sharma K. Utility of endogenous creatinine clearance as a measure of renal function in mice. *Kidney Int*. 2004 May; 65(5): 1959-67.