

## **Evaluating the Effect of Ginger Extract on Azathioprine-Induced Renal Failure in Mature Female Rats**

Godarzian Z, Hosseini S.E\*

Department of Biology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

\*Corresponding author. Tel: +987143311148, Fax: +987143311172, E-mail: ebrahim.hossini@yahoo.com

Received: Jan 21, 2018 Accepted: May 20, 2018

### **ABSTRACT**

**Background & objectives:** Azathioprine is widely used for the treatment of autoimmune diseases. It has negative effects on the function of kidney. Therefore, considering the protective effects of ginger on nephrotoxins, the present study was conducted to investigate the effect of ginger on renal changes induced by azathioprine in rats.

**Methods:** In this experimental study, 56 female rats were divided into 7 groups including control, sham and 5 experimental groups receiving azathioprine (50mg/kg), ginger (200mg/kg), azathioprine plus ginger (200,100 and 50 mg/kg). In this study, ginger was administered by gavage and azathioprine intraperitoneally in 21 consecutive days. At the end, serum levels of urea, uric acid and creatinine were measured and the histological structure of the kidneys was examined. The results were analyzed by ANOVA and Duncan tests at significance level of  $p < 0.05$ .

**Results:** The results showed that azathioprine caused the destruction of structure along with cell necrosis, tubular degeneration, glomerular atrophy, urinary space enlargement, hyperemia and inflammatory cell infiltration in the renal tissue, as well as an increase in the serum level of urea, uric acid and creatinine at  $p < 0.05$ . However, simultaneous use of ginger and azathioprine reduced the serum levels of urea, uric acid, creatinine and improved the kidney structure compared to the azathioprine group.

**Conclusion:** The results showed that ginger had a protective effect on kidney tissue, due to its antioxidant properties, by inhibiting free radicals produced by azathioprine and decreasing the severity degradation effects of azathioprine on kidney tissue and function.

**Keywords:** Azathioprine; Uric Acid; Creatinine; Kidney; Urea; Rat

## بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی زنجیبل بر روی نارسایی کلیوی القاء شده با آزاتیوپرین در موش‌های صحرایی ماده بالغ

زهرا گودرزیان، سید ابراهیم حسینی\*

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران  
\* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۷۱۴۳۳۱۱۱۴۸ - فاکس: ۰۷۱۴۳۳۱۱۱۷۲ - پست الکترونیک: ebrahim.hossini@yahoo.com

### چکیده

**زمینه و هدف:** آزاتیوپرین دارویی با کاربرد وسیع در درمان بیماری‌های خودایمنی است که بر عملکرد و ساختار بافتی کلیه دارای اثرات منفی می‌باشد. لذا با توجه به اثرات محافظتی زنجیبل در برابر نفروتوکسین‌های مختلف مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر عصاره زنجیبل بر تغییرات کلیوی ناشی از مصرف آزاتیوپرین در موش‌های صحرایی صورت گرفت.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی از ۵۶ سرموش صحرایی ماده بالغ که به ۷ گروه شامل کنترل، شاهد و ۵ دسته تجربی دریافت کننده آزاتیوپرین ( $5.0 \text{ mg/kg}$ ،  $200 \text{ mg/kg}$ ، آزاتیوپرین به همراه زنجیبل با دوزهای  $200 \text{ mg/kg}$  و  $50 \text{ mg/kg}$ ) تقسیم شدند. در این بررسی زنجیبل به صورت گاواظ و آزاتیوپرین به صورت درون صفائی و برای مدت ۲۱ روز تجویز شدند. در پایان سطح سرمی اوره، اسید اوریک و کراتینین اندازه گیری و ساختار بافتی کلیه های حیوانات بررسی گردید. نتایج از طریق آزمون‌های ANOVA و دانکن در سطح معناداری  $0.5 / p < 0.05$  آنالیز شدند.

**یافته ها:** نتایج نشان داد آزاتیوپرین باعث تخریب ساختار بافتی همراه با نکروزه شدن سلولی، تخریب توبولی، کوچک شدن گلومرول‌ها، بزرگ شدن فضای ادراری، پرخونی و ارتashان سلول‌های آمامی در بافت کلیه و همچنین افزایش سطح سرمی اوره و اسید اوریک و کراتینین در سطح  $0.5 / p < 0.05$  می‌شود. در حالی که مصرف همزمان زنجیبل با آزاتیوپرین باعث کاهش معنادار میزان سرمی اوره، اسید اوریک و کراتینین و بهبود ساختار بافتی کلیه در مقایسه با گروه آزاتیوپرین می‌گردد.

**نتیجه گیری:** داده‌های این مطالعه نشان داد که زنجیبل به واسطه خواص آنتی اکسیدانی خود توانسته با مهار رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط آزاتیوپرین، بر بافت کلیه اثر محافظتی داشته باشد و از شدت آثار تخریبی آزاتیوپرین بر بافت و عملکرد کلیه ها بکاهد.

**واژه‌های کلیدی:** آزاتیوپرین، کراتینین، اسید اوریک، اوره، کلیه، موش صحرایی

دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۰۱ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۳۰

### مقدمه

پیوند اعضا شده‌اند و برای درمان بعضی از سرطان‌ها و بیماری‌های التهابی روده نیز تجویز می‌شود و موجب کاهش درد و التهاب شده و همچنین آسیب‌های مفصلی را محدود کرده و در دراز مدت از معلولیت جلوگیری می‌کند [۱]. آزاتیوپرین از طریق جلوگیری از تولید مجدد بازهای پورینی و ممانعت از سنتز DNA و RNA و با

آزاتیوپرین یکی از مشتقات داروی ۶-مرکاپتوپورین با فرمول مولکولی C9H7N7O2S می‌باشد که در درمان آرتریت روماتوئید، لوپوس، میوزیت و اسکولیت و بعضی بیماری‌های دیگر روماتیسمی تجویز می‌شود. این دارو یکی از داروهای تضعیف کننده سیستم ایمنی است که در بیمارانی که

زنجبیل احتمالاً با داشتن خواص آنتی اکسیدانی دارای خواص محافظتی قابل توجهی در بافت‌های کلیوی در مقابل دوز بالای پاراستامول است [۷]. زنجیبل می‌تواند به طور موثری با تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن مقابله کند و این کار را با افزایش فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز<sup>۱</sup>، انجام می‌دهد. عصاره زنجیبل می‌تواند از تخلیه کلیه جلوگیری کند و این آنزیم‌های آنتی اکسیدانی کلیه جلوگیری می‌کند و این اثرات حفاظتی توسط پلی فنل‌ها و فلاونوئیدهای موجود در آن اعمال می‌شود [۸]. در یک بررسی نشان داده شد که مصرف خوراکی پودر زنجیبل هیچگونه اثر جانبی بر کبد، کلیه و پانکراس ندارد [۹]. استفاده از زنجیبل به همراه داروی ضدصرع لاموتریزین<sup>۲</sup> موجب کاهش عوارض جانبی این دارو در کلیه می‌شود، به طوری که زنجیبل باعث کاهش سطوح سرمی اوره و کراتینین و همچنین بهبود ساختار گلومرول‌ها و لوله‌های پیچیده در کلیه‌های موش‌های تیمارشده با این دارو می‌شود [۱۰]. مصرف عصاره هیدروالکلی زنجیبل باعث بهبود اختلال عملکرد کلیوی و کاهش قابل توجه غلظت پلاسمایی کراتینین، اوره و سیستاتین C ناشی از مصرف الكل می‌شود [۱۱]. مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهد که زنجیبل از طریق مهار مسیرهای سیکلواکسیژنаз و لیپواکسیژناز و با جلوگیری از متابولیسم اسید آرشیدونیک دارای اثرات ضد التهابی است [۱۲]. مطالعات نشان داده اند که جینجرول موجود در ریزوم زنجیبل دارای اثرات ضد التهابی و ضد درد است [۱۳]. در موش‌های صحرایی نر دارای تومور کبدی، تیمار با زنجیبل باعث کاهش میزان فعالیت سوپر اکسیداز دیسموتاز می‌گردد و سطح مالون دی آلدھید را نیز کاهش می‌دهد و همچنین باعث افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز می‌شود به طوری که با خنثی سازی رادیکال‌های آزاد و کاهش فعالیت

اثر بر روی رشد لنفوسيت‌ها باعث مهار سیستم ایمنی می‌گردد و در نتیجه از حمله آنها به بافت‌های پیوندی و مفاصل در بیماری‌های روماتیسمی جلوگیری می‌کند [۲]. آزاتیوپرین عمدتاً به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد باعث ایجاد مسمومیت در اندام‌های مختلف از جمله مغز استخوان، کبد، دستگاه گوارش و پانکراس می‌شود [۲]. آزاتیوپرین در بدن به وسیله آنزیم‌های تیوبورین متیل ترانسفراز (TPMT) و گزانتین اکسیداز (XO) سریعاً متابولیزه و به مواد بی‌اثر تبدیل می‌شود به طوری که کمبود فعالیت این آنزیم‌ها باعث افزایش تولید متابولیت‌های سمی می‌شود [۳]. نتایج حاصل از بک مطالعه نشان داد که آزاتیوپرین باعث تغییرات ناچا و ساختاری در سلول، قطعه قطعه شدن کروموزوم‌ها، کاهش تقسیم میتوزی و افزایش تعداد سلول‌های دارای کروموزوم‌های چند برابر می‌شود [۴]. زنجیبل گیاهی با نام علمی Zingiber officinale از خانواده Zingiberaceae از جمله گیاهان دارویی مهم می‌باشد که از دیرباز تاکنون به عنوان طعم‌دهنده مواد غذایی و در جهت درمان برخی از بیماری‌ها مورد استفاده انسان‌ها قرار می‌گیرد. در عصاره ریزوم گیاه زنجیبل، بیش از ۶۴ نوع ترکیب مختلف نظیر جینجرون، جینجرول، جینجرادیول، زینجبیرون، ترپن، فلاندرن، دکستروکامفن و سسکی ترپن یافته می‌شود که اکثرًا دارای خواص آنتی اکسیدانی می‌باشند [۵]. عصاره زنجیبل با داشتن ۶ اجزای آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی خود نظیر ۶ جینجرول، ۶ شوگوال و زینجرول می‌تواند از طریق اثر بر مکانیزم‌های ضدالتهابی، آنتی اکسیدانی و ضد سروتونینی باعث کاهش فاکتورهای التهابی نظیر سیتوکین‌ها و کموکین‌های التهابی، کاهش آنزیم‌های آنتی اکسیدانی شده و در کاهش ابتلا، کاهش عوارض نیز درمان بیماری‌های التهابی مفید باشد [۶]. نتایج یک مطالعه نشان داد در موش‌های صحرایی که مبتلا به آسیب‌های کلیوی هستند عصاره اتیل استاتی

<sup>1</sup> Superoxide Dismutase

<sup>2</sup> Lamotrigine

شاهد و پنج دسته تجربی دریافت کننده دوز ۲۰۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی گیاه زنجیبل به تنهایی و دوز ۵۰ mg/kg داروی آزاتیوپرین به تنهایی و تحت تیمار با دوز ۵۰ mg/kg داروی آزاتیوپرین همراه با دوزهای ۵۰ mg/kg و ۱۰۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی گیاه زنجیبل تقسیم شدند. در این مطالعه حیوانات گروه کنترل تحت هیچ تیماری قرار نگرفتند و گروه شاهد نیز تحت تیمار به صورت کاواز و تزریق درون صفاقی روزانه ۵٪ میلی لیتر نرمال سالین به عنوان حلال داروها قرار گرفتند. در این بررسی تجویز داروی آزاتیوپرین به صورت درون صفاقی و عصاره زنجیبل به صورت گاواز برای مدت ۲۱ روز انجام گرفت.

#### عصاره گیری

در این مطالعه برای تولید ریشه گیاه زنجیبل مقداری از ریزوم این گیاه از فروشگاه تیبه و پس از ایجاد شرایط رشد گیاه، در گلخانه کشت داده شد و توسط متخصصین دانشگاه شیراز، گیاه تائید گردید و به آن شماره هرباریوم ۲۴۹۹۹ اختصاص داده شد. در این بررسی برای تیبه عصاره ریشه زنجیبل از روش پرکولاسیون استفاده شد. برای این کار به مقدار کافی ریشه گیاه زنجیبل تیبه و پس از تمیز و خشک کردن، آسیاب نموده تا به صورت پودر در آید و سپس مقدار کافی از پودر بدست آمده را به مدت ۷۳ ساعت با ۱۰۰۰ میلی لیتر اتانول ۵۰ درصد در دستگاه پرکولاتور ریخته تا به خوبی مورد خیس خوردن قرار گیرد، سپس شیر پرکولاتور باز گردید تا مایع قطره قطره به ظرف پایین وارد گردد. جهت پیشگیری از خشک شدن پودر گیاه، به طور مداوم حلال (الکل) را به کمک پیپت به بالای ظرف اضافه گردید. بعد از این مرحله مایع بدست آمده در زیر پرکولاتور که حاوی حلال الکلی و ماده استخراجی تام بود، به کمک دستگاه روتاری، حلال اضافی از آن جدا، تا کاملاً تغییظ گردد. آنگاه به کمک دسیکاتور و پمپ خلاء عصاره به صورت پودر در آورده شد [۱۸].

لیپیدپراکسیداسیون باعث سرکوب اثرات سرطان‌زاوی در کبد می‌شود [۱۵، ۱۶]. ترکیبات فعال موجود در زنجیبل قادر به کاهش سطوح استرس اکسیداتیو و اعمال اثرات آنتی اکسیدانی می‌باشند [۱۶]. عصاره زنجیبل از طریق مهار آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ که نقش مهمی در تولید پروستاگلاندین‌ها در بافت‌های ملتیپ دارد، باعث مهار تولید پروستاگلاندین‌های مختلف از جمله پروستاگلاندین E2 می‌گردد و در نتیجه باعث مهار تولید گونه‌های فعال اکسیژن و آسیب اکسیداتیو بافت می‌شود [۱۷]. با توجه به اثرات نفروتوکسینی داروی آزاتیوپرین که در درمان برخی از بیماری‌ها از آن استفاده می‌شود. این مطالعه با هدف بررسی اثر عصاره هیدروالکلی زنجیبل بر ساختار بافتی و عملکردی کلیه‌ها در موش‌های صحرایی ماده بالغ انجام گردید.

#### روش کار

##### گروه بندی حیوانات

پژوهش حاضر یک مطالعه تجربی است که در سال ۱۳۹۶ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز انجام شد. در این پژوهش از ۵۶ سر موش صحرایی ماده بالغ از نژاد ویستار در محدوده وزنی ۱۹۰–۲۰۵ گرم و سن ۹۵ تا ۱۰۰ روز استفاده شد. در طول دوره تجویز، همه حیوانات از آب و غذای یکسان و بدون محدودیت برخوردار بوده و در یک اتاق مخصوص در دمای  $22 \pm 2$  درجه سلسیوس و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند و آب و غذا به میزان کافی در اختیار آن‌ها قرار گرفت. پرتوکل این تحقیق بر اساس قوانین بین‌المللی در مورد حیوانات آزمایشگاه تنظیم و در کمیته اخلاق دانشگاه تحت شماره IR.miau139622440 بررسی پس از هم سیکل نمودن موش‌ها [۱۷]، حیوانات به ۷ گروه ۸ تایی شامل گروه‌های کنترل،

مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و معناداربودن اختلاف داده‌ها در سطح  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

نتایج این مطالعه نشان داد که تیمار با داروی آزاتیوپرین باعث افزایش غلظت سرمی اوره، کراتینین و اسید اوریک خون نسبت به گروه کنترل در سطح  $p < 0.05$  می‌شود. در حالی که در حیوانات دریافت‌کننده دوز  $200 \text{ mg/kg}$  عصاره زنجیل غلظت سرمی اوره، کراتینین و اسید اوریک نسبت به حیوانات گروه‌های کنترل و دریافت‌کننده آزاتیوپرین به تنهایی کاهش معناداری در سطح  $p < 0.05$  مشاهده گردید (جدول ۱). همچنین بر اساس نتایج حاصل آنالیز داده‌های این بررسی، در غلظت سرمی اوره و کراتینین در حیوانات دریافت‌کننده آزاتیوپرین به همراه دوز  $50 \text{ میلی گرم}$  بر کیلو گرم عصاره هیدروالکلی زنجیل نسبت به گروه تحت تیمار با آزاتیوپرین به تنهایی، تفاوت معناداری مشاهده نگردید، اما در غلظت سرمی اوره، کراتینین و اسید اوریک در حیوانات دریافت‌کننده آزاتیوپرین به همراه دوزهای  $200 \text{ mg/kg}$  و  $100 \text{ mg/kg}$  عصاره هیدروالکلی زنجیل نسبت به گروه تحت تیمار با آزاتیوپرین به تنهایی کاهش معناداری در سطح  $p < 0.05$  مشاهده گردید (جدول ۱). همچنین در این بررسی مشخص گردید که تیمار با داروی آزاتیوپرین و دوز  $200 \text{ mg/kg}$  عصاره زنجیل هر کدام به تنهایی تاثیر معناداری بر اندازه قطر کورتکس کلیه ندارند. در حالی که تیمار با دوز  $50 \text{ mg/kg}$  آزاتیوپرین به همراه دوزهای  $200 \text{ mg/kg}$  و  $100 \text{ mg/kg}$  عصاره زنجیل باعث کاهش معنادار قطر کورتکس کلیه نسبت به گروه دریافت‌کننده آزاتیوپرین به تنهایی در سطح  $p < 0.05$  می‌شود (جدول ۲). به علاوه نتایج این مطالعه نشان داد که تیمار با داروی آزاتیوپرین باعث افزایش معنادار اندازه قطر بخش مدولای کلیه و تیمار با

خون گیری و اندازه‌گیری شاخص‌های مورد مطالعه در این بررسی جایت سنجش میزان سرمی کراتینین، بیلی روئین و اوره پس از بیهود نمودن موش‌ها به وسیله اتر، با استفاده از سرنگ انسولینی از قلب آن‌ها خون گیری به عمل آمد. خون گرفته شده از حیوانات به منظور انعقاد به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه انکوباتور در دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتیگراد قرار داده شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه ساتریفیوژ با سرعت  $5000 \text{ دور در دقیقه}$  ساتریفیوژ گردید. در این بررسی کراتینین با روش اندازه‌گیری Jaffe/Fixed Rate or Kinetic Berthelot/Endpoint و با استفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری شدند. همچنین در این مطالعه پس از خون‌گیری از قلب حیوانات، کلیه‌های چپ و راست هر حیوان خارج و پس از حذف تمام بافت‌های اضافی با ترازوی دیجیتالی با دقت  $0.001 \text{ g}$  گرم توزین و در طرفهای حاوی ثبت‌کننده فرمالین  $10\%$  قرار داده تا جای تهیه بافت و مقطع گیری آماده شوند و سپس به منظور بررسی ساختار کلیه‌ها و جایت تهیه مقاطع بافتی پس از انجام مراحل آبگیری و قالب‌گیری، با کمک دستگاه میکروتوم دوار (LEIYZ استرالیا مدل ۱۵۱۲) مقاطع بافتی با ضخامت  $5 \mu\text{m}$  میکرونی تهیه و پس از رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین-ائوزین با کمک میکروسکوپ نیکون ساخت کشور ژاپن اقدام به بررسی درجه التهاب و نکروز بافت کلیه به صورت نیمه کمی گردید و به صورت عدم وجود تغییرات هیستولوژیک (درجه صفر)، تغییرات هیستولوژیک جزیی (درجه یک)، تغییرات هیستولوژیک متوسط (درجه دو)، تغییرات هیستولوژیک شدید (درجه سه) درجه بندی شدند.

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج به دست آمده از مطالعات سرولوژیک و هیستولوژیک در این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS-20 و با کمک آزمون‌های ANOVA و دانکن

هیدروالکلی زنجیبل نسبت به حیوانات تحت تیمار با آزاتیوپرین باعث کاهش معنا دار قطر لوله هنله نسبت به گروه دریافت کننده آزاتیوپرین در سطح  $5.0 \text{ mg/kg}$  می‌گردد. به علاوه داده‌های این بررسی نشان داد که تیمار با آزاتیوپرین به همراه دوزهای  $200 \text{ mg/kg}$  و  $100 \text{ mg/kg}$  گروه آزاتیوپرین به تنهایی تاثیر معناداری بر قطر لوله هنله نشان نمی‌دهد (جدول ۲). همچنین تصاویر بافتی تیمه شده از مقطع بافتی کلیه در گروه‌های مختلف نشان‌دهنده ساختار بافتی کاملاً سالم و طبیعی کلیه‌ها بدون هیچ گونه اثری از پرخونی، اتساع وریدها، نکروز توبولی، ارتashag سلول‌های آماتی و تغییرات گلومرولی در مقاطع بافتی در گروه‌های کنترل، شاهد و دریافت کننده عصاره زنجیبل با دوز  $200 \text{ mg/kg}$  می‌باشد. در حالی که در حیوانات دریافت کننده آزاتیوپرین به تنهایی و همراه با دوز  $5.0 \text{ mg/kg}$  عصاره زنجیبل در مقایسه با گروه کنترل، نکروزه شدن سلولی، تخریب توبولی، کوچک شدن گلومرول‌ها، بزرگ شدن فضای ادراری، پرخونی و ارتashag سلول‌های آماتی در بافت کلیه مشاهده می‌گردد. همچنین تصاویر بافتی نشان دهنده، نکروزه شدن کمتر سلولی (هسته‌های تیره رنگ)، تخریب توبولی کمتر، ارتashag کمتر سلول‌های آماتی، نرمال شدن ساختار گلومرولی و کاهش اثرات تخریبی آزاتیوپرین در حیوانات دریافت کننده آزاتیوپرین به همراه دوز  $100 \text{ mg/kg}$  عصاره زنجیبل و نکروزه شدن بسیار خفیف سلولی (هسته‌های تیره رنگ)، تخریب توبولی بسیار خفیف، ارتashag بسیار کم سلول‌های آماتی، نرمال شدن ساختار گلومرولی که نشان‌دهنده کاهش اثرات تخریبی آزاتیوپرین به وسیله دوز  $200 \text{ mg/kg}$  عصاره زنجیبل می‌باشد (تصاویر ۱ تا ۷).

دوز  $200 \text{ mg/kg}$  عصاره زنجیبل باعث کاهش معنادار اندازه قطر بخش مدولای کلیه در سطح  $5.0 \text{ mg/kg}$  می‌شود. در حالی که تیمار هم‌زمان دوز  $5.0 \text{ mg/kg}$  آزاتیوپرین به همراه دوزهای  $200 \text{ mg/kg}$  و  $100 \text{ mg/kg}$  عصاره زنجیبل باعث کاهش معنادار قطر بخش مدولای کلیه نسبت به گروه دریافت کننده آزاتیوپرین به تنهایی در سطح  $5.0 \text{ mg/kg}$  می‌شود (جدول ۲). همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز داروی آزاتیوپرین تاثیر معناداری بر اندازه قطر گلومرول و جسمک کلیوی (لوله مالپیگی) ندارد در حالی که تیمار با دوز  $200 \text{ mg/kg}$  عصاره زنجیبل باعث کاهش معنادار اندازه قطر گلومرول و جسمک کلیوی در سطح  $5.0 \text{ mg/kg}$  نسبت به گروه کنترل می‌گردد (جدول ۲). به علاوه نتایج این بررسی نشان داد که تیمار با آزاتیوپرین به همراه دوزهای  $5.0 \text{ mg/kg}$  و  $200 \text{ mg/kg}$  عصاره هیدروالکلی زنجیبل تاثیر معناداری بر اندازه قطر گلومرول و جسمک کلیوی نسبت به گروه آزاتیوپرین به تنهایی ندارد، در حالی که اندازه قطر گلومرول در حیوانات دریافت کننده آزاتیوپرین به همراه دوز  $100 \text{ mg/kg}$  عصاره زنجیبل نسبت به حیوانات تحت تیمار با آزاتیوپرین به تنهایی کاهش معناداری در سطح  $5.0 \text{ mg/kg}$  مشاهده گردید (جدول ۲). به علاوه نتایج این بررسی نشان داد که اندازه قطر لوله‌های خمیده نزدیک و دور، لوله جمع‌کننده و قطر فضای ادراری در هیچ کدام از گروه‌های مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل یا گروه آزاتیوپرین به تنهایی تغییر معناداری را نشان نمی‌دهد. همچنین نتایج این بررسی نشان داد که تجویز داروی آزاتیوپرین قادر تاثیر معنادار بر قطر لوله هنله نسبت به حیوانات گروه کنترل می‌باشد. در حالی که تیمار با دوز  $200 \text{ mg/kg}$  عصاره

جدول ۱. مقایسه غلظت سرمی اوره، اسید اوریک و کراتینین خون در حیوانات گروههای مختلف (Mean±SEM)

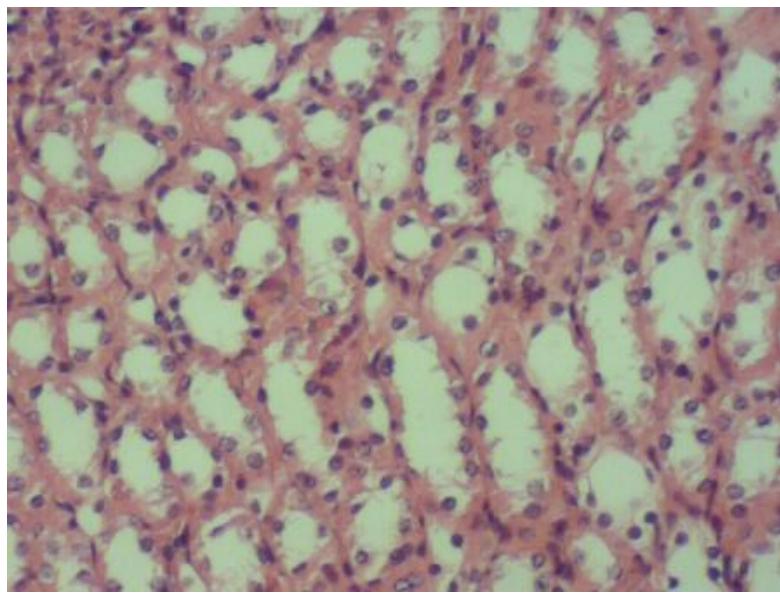
گروهها	اوره mg/dl	اسید اوریک mg/dl	کراتینین mg/dl
کنترل	۲۰/۷۱±۱/۵۲	۱/۷۰±۰/۱۰	۰/۶۰±۰/۰۲۵
شاهد	۲۰/۷۱±۱/۵۲	۱/۷۰±۰/۱۰	۰/۶۰±۰/۰۲۵
آزاتیوپرین ۵۰ mg/kg	۳۰/۸۵±۲/۰۷*	۳/۷۵±۰/۲۶*	۰/۸۳±۰/۰۳*
عصاره زنجیل ۲۰۰ mg/kg	۲۰/۷۱±۱/۴۷&	۱/۳۴±۰/۱۲&	۰/۵۹±۰/۰۱&
آزاتیوپرین ۵۰ mg/kg + عصاره زنجیل ۵۰ mg/kg	۲۹/۵۷±۱/۴۶*	۳/۵۱±۰/۲۳*	۰/۷۵±۰/۰۲*
آزاتیوپرین ۱۰۰ mg/kg + عصاره زنجیل ۵۰ mg/kg	۲۲/۰۰±۰/۴۸&	۱/۹۷±۰/۱۵&	۰/۶۵±۰/۰۱۷&
آزاتیوپرین ۲۰۰ mg/kg + عصاره زنجیل ۵۰ mg/kg	۲۳/۵۷±۰/۷۱&	۲/۰۱±۰/۲۰&	۰/۶۴±۰/۰۲&

\* نشان دهنده اختلاف معنادار در سطح  $P<0.05$  نسبت به گروه کنترل& نشان دهنده اختلاف معنادار در سطح  $P<0.05$  نسبت به گروه دریافت کننده داروی آزاتیوپرین به تنهایی

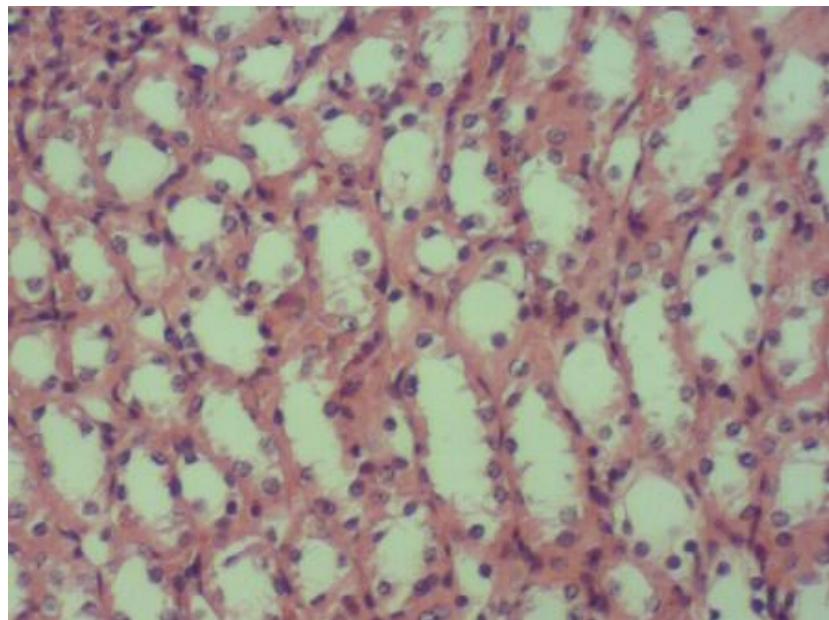
جدول ۲. مقایسه قطر بخش‌های مختلف کلیه در حیوانات گروههای مختلف (Mean±SEM)

گروهها	قطر کورتکس میلی متر	قطر مدوا میلی متر	قطر گلومرول میلی متر	قطر ادراری میلی متر	قطر خمیده نزدیک میلی متر	قطر جمع کننده میلی متر	قطر لوله هنله میلی متر
کنترل	۴/۴۶±۰/۲۶	۶/۳۷±۰/۲۰	۰/۳۳±۰/۰۲	۰/۲۶±۰/۰۲	۰/۰۳±۰/۰۰۲	۰/۰۷±۰/۰۰۵	۰/۰۹±۰/۰۰۴
شاهد	۴/۵۰±۰/۲۸	۶/۴۲±۰/۱۲	۰/۳۴±۰/۰۱	۰/۲۷±۰/۰۱	۰/۱۲±۰/۰۰۳	۰/۰۷±۰/۰۰۳	۰/۱۰±۰/۰۰۸
آزاتیوپرین	۴/۹۰±۰/۱۶	۶/۷۶±۰/۱۲*	۰/۳۷±۰/۰۲	۰/۳۰±۰/۰۱	۰/۱۱±۰/۰۰۴	۰/۰۸±۰/۰۰۵	۰/۰۶±۰/۰۰۳
زنجبیل ۲۰۰ mg/kg	۴/۴۵±۰/۲۶	۶/۰۵±۰/۱۵*	۰/۲۸±۰/۰۲&	۰/۲۱±۰/۰۲&	۰/۱۱±۰/۰۰۶	۰/۰۸±۰/۰۰۴	۰/۰۴±۰/۰۰۳&
آزاتیوپرین + زنجیل ۵۰ mg/kg	۴/۷۲±۰/۱۸	۶/۷۲±۰/۰۷*	۰/۳۵±۰/۰۳	۰/۲۸±۰/۰۳	۰/۰۸±۰/۰۰۶	۰/۰۸±۰/۰۰۲	۰/۰۵±۰/۰۰۴
آزاتیوپرین + زنجیل ۱۰۰ mg/kg	۴/۳۲±۰/۱۶&	۶/۱۱±۰/۰۳۰&	۰/۳۴±۰/۰۱&	۰/۲۱±۰/۰۱&	۰/۱۲±۰/۰۰۹	۰/۰۷±۰/۰۰۴	۰/۱۰±۰/۰۰۴
آزاتیوپرین + زنجیل ۲۰۰ mg/kg	۴/۱۲±۰/۱۴&	۵/۹۹±۰/۲۱&	۰/۳۴±۰/۰۰۲	۰/۲۵±۰/۰۲&	۰/۱۱±۰/۰۰۵	۰/۰۸±۰/۰۰۹	۰/۰۵±۰/۰۰۵

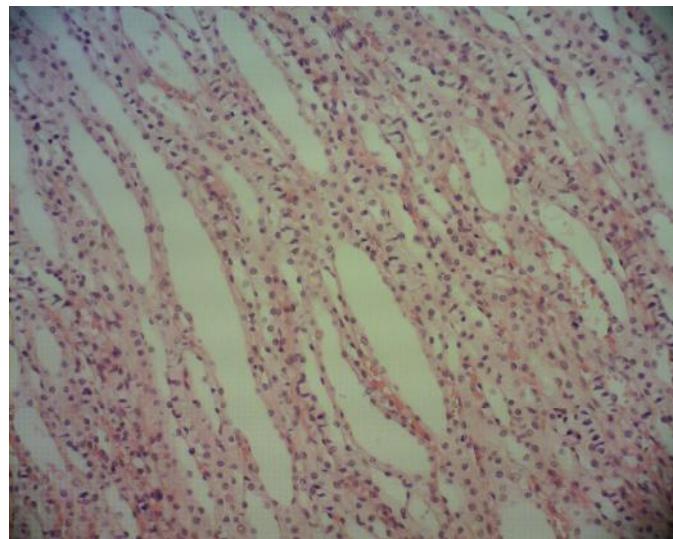
\* نشان دهنده اختلاف معنادار در سطح  $P<0.05$  نسبت به گروه کنترل می‌باشد.& نشان دهنده اختلاف معنادار در سطح  $P<0.05$  نسبت به گروه دریافت کننده داروی آزاتیوپرین به تنهایی



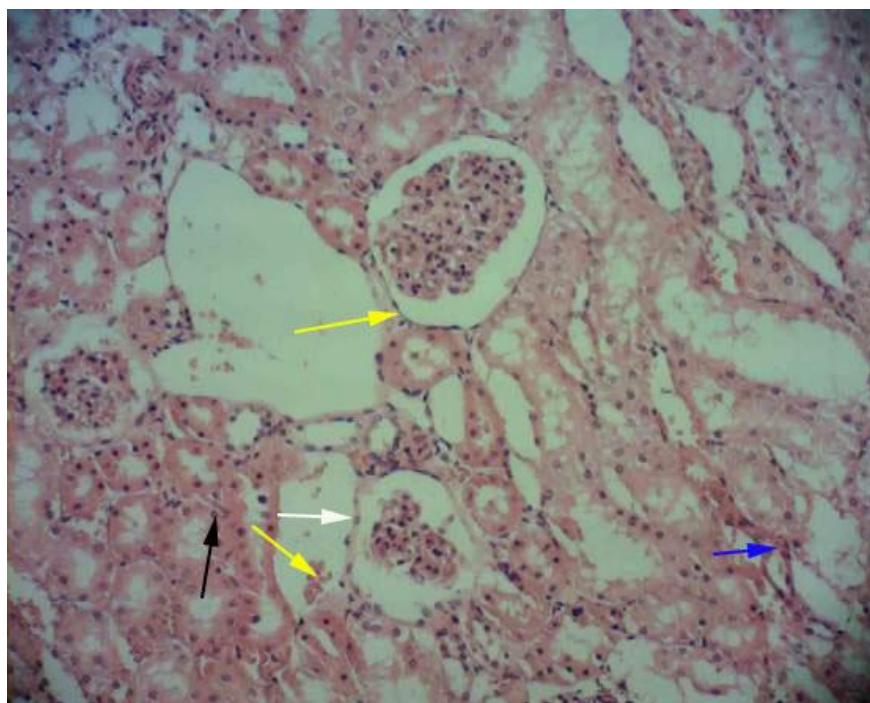
شکل ۱. فتومیکروگراف‌های بافت کلیه در حیوانات گروه کنترل با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اوزین با درشت نمایی ۱۰۰× تصویر نشان دهنده ساختار کاملاً سالم و طبیعی بافت کلیه است.



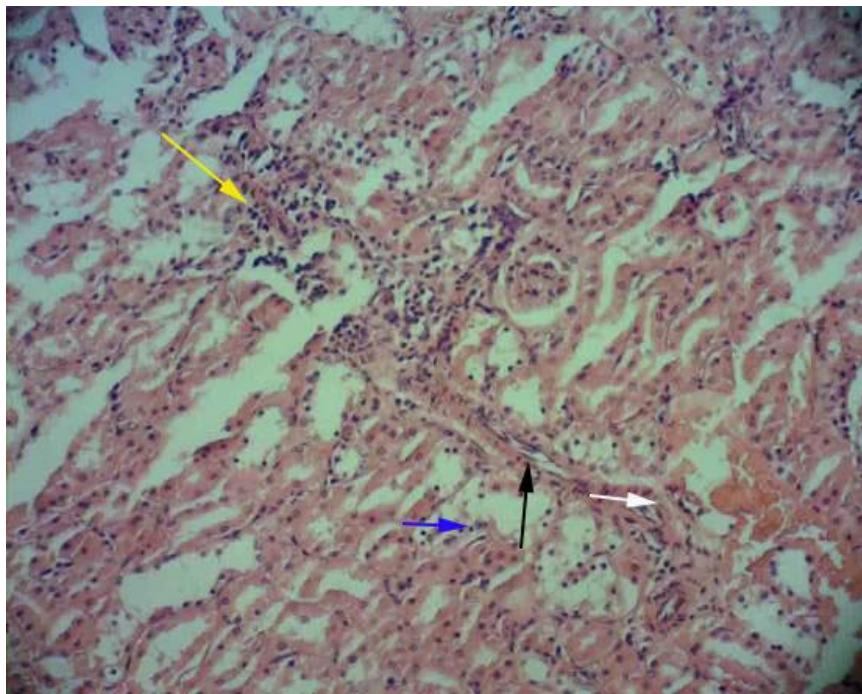
شکل ۲. فتومیکروگراف‌های بافت کلیه در حیوانات گروه شاهد با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اوزین با درشت نمایی ۱۰۰× تصویر نشان دهنده ساختار کاملاً سالم و طبیعی بافت کلیه است.



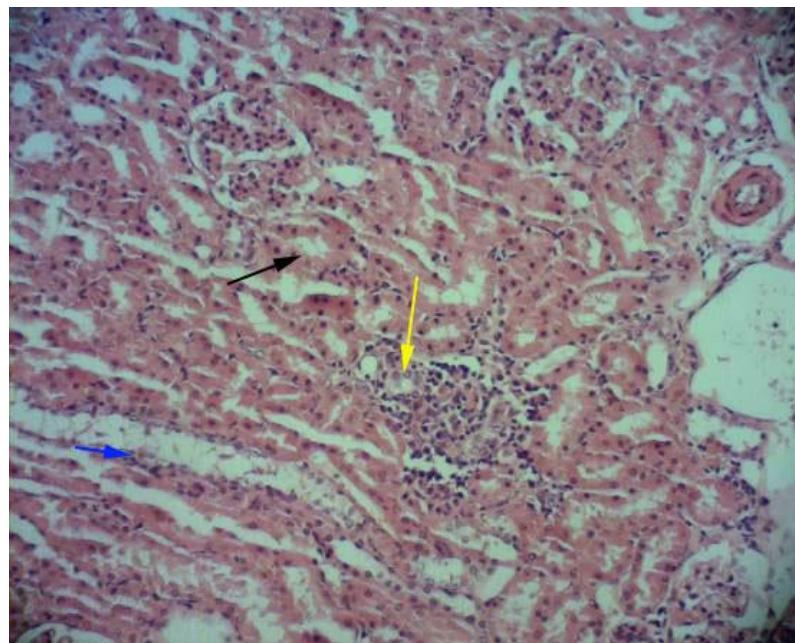
شکل ۳. فتومیکروگراف‌های بافت کلیه در حیوانات گروه دریافت کننده عصاره زنجیبل با دوز  $200\text{ mg/kg}$  با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-آئوزین و با درشت نمایی  $100\times$   
تصویر نشان دهنده ساختار کاملاً سالم و طبیعی بافت کلیه است.



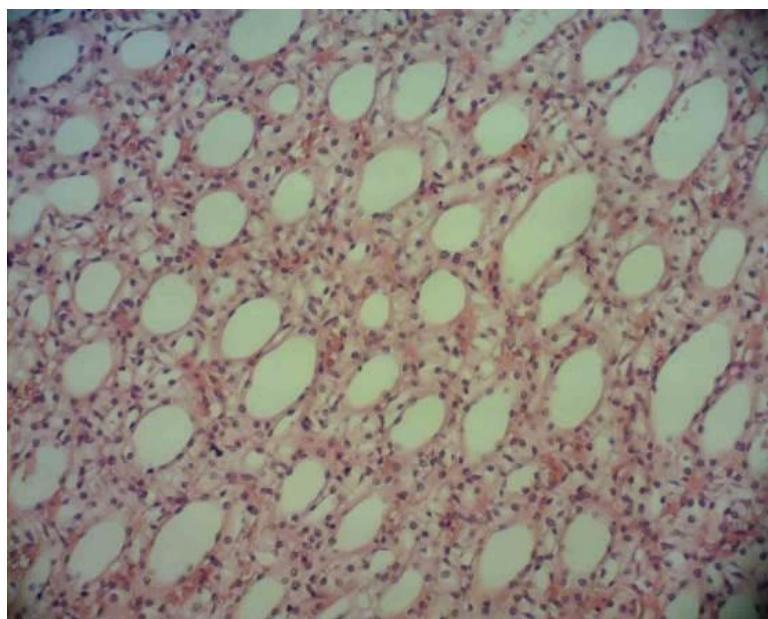
شکل ۴. فتومیکروگراف‌های بافت کلیه در حیوانات گروه دریافت کننده آزاتیوپرین با دوز  $50\text{ mg/kg}$  با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-آئوزین و با درشت نمایی  $100\times$   
تصویر نشان دهنده نکروزه شدن سلولی (هسته‌های تیره رنگ فلش نازک مشکی رنگ)، تخریب توبولی (فلش زرد رنگ)، کوچک شدن گلومرول (فلش سفید رنگ)، بزرگ شدن فضای ادراری (فلش آبی رنگ) می‌باشد.



شکل ۵. فتومیکروگراف‌های بافت کلیه در حیوانات گروه دریافت کننده آزاتیوپرین همراه با عصاره زنجیبل با دوز ۵۰ mg/kg با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و با درشت نمایی ۱۰۰ تصویر نشان دهنده نکروزه شدن سلولی (هسته‌های تیره رنگ، فلشن نازک مشکی رنگ)، تخریب توبولی (فلشن آبی رنگ)، پرخونی (فلشن سفید رنگ)، ارتباخ سلول‌های آمامی (فلشن زرد رنگ) می‌باشد.



شکل ۶. فتومیکروگراف‌های بافت کلیه در حیوانات گروه دریافت کننده آزاتیوپرین همراه با عصاره زنجیبل با دوز ۱۰۰ mg/kg با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و با درشت نمایی ۱۰۰ تصویر نشان دهنده نکروزه شدن کمتر سلولی (هسته‌های تیره رنگ، فلشن نازک مشکی رنگ)، تخریب توبولی کمتر (فلشن آبی رنگ)، ارتباخ کمتر سلول‌های آمامی (فلشن زرد رنگ)، نرمال شدن ساختار گلومرولی می‌باشد.



شکل ۷. فتومیکروگراف‌های بافت کلیه در حیوانات گروه دریافت کننده آزاتیوپرین همراه با عصاره زنجیل با دوز  $200 \text{ mg/kg}$  با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اوزین و با درشت نمایی  $100\times$

تصویر نشان دهنده عدم مشاهده نکروزه شدن سلوی، تخریب توبلی بسیار خفیف، ارتشاح بسیار کم سلول‌های آماسی، نرمال شدن ساختار گلومرولی و توبلی می‌باشد.

کاهش فیلتراسیون گلومرولی باشد [۱۹]. لذا با عنایت به نتایج مطالعه حاضر مبنی بر اثرات مخرب داروی آزاتیوپرین بر ساختار بافتی کلیه افزایش میزان اوره و کراتینین خون را می‌توان به آسیب بافتی کلیه در نتیجه مصرف آزاتیوپرین نسبت داد. اوره محصول نهایی اصلی متابولیسم پروتئین در کبد از آمونیاک ساخته شده و از طریق کلیه دفع می‌شود. میزان اوره در خون از طرفی به رژیم غذایی و از طرف دیگر به وضعیت کارکرد کلیه‌ها وابسته است. این پروتئین‌ها لزوماً از پروتئین‌های رژیم غذایی نیستند بلکه می‌توانند از پروتئین‌های خود بدن نیز باشند زیرا به هنگام التهاب بافتی میزان اوره در بدن افزایش می‌باید. علاوه بر این کاهش نرخ فیلتراسیون گلومرول نیز سبب افزایش اوره در خون خواهد شد. سطح اوره در خون بیانگر وجود متابولیت‌های غیر پروتئینی نیتروژن‌دار، میزان جذب پروتئین و همچنین نشان‌دهنده توان عملکردی کلیه‌ها در دفع این گونه از متابولیت‌ها است [۲۰].

## بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نکروزه شدن سلوی، تخریب توبلی، کوچک شدن گلومرول‌ها، بزرگ شدن فضای ادراری، پرخونی و ارتشاح سلول‌های آماسی در بافت کلیه و میزان سرمی اوره، کراتینین و اسید اوریک در حیوانات دریافت کننده داروی آزاتیوپرین افزایش می‌باید.

کلیه به عنوان محل اصلی فیلتراسیون و یکی از مکان‌های سم‌زدایی در بدن، مستقیماً تحت تأثیر داروهای مختلف قرار می‌گیرد. متابولیت‌های حاصل از سوم مختلف با منشاء داخلی و خارجی، موجب آسیب به ساختار بافتی و عملکردی کلیه‌ها می‌شوند. برطبق مطالعات انجام شده، در آسیب به پارانشیم کلیه؛ غلظت سرمی اوره، کراتینین و اسید اوریک افزایش می‌باید [۱۹]. افزایش میزان اوره و کراتینین خون به دلیل ضعف کلیوی، می‌تواند ناشی از آسیب و تخریب پاهای کاذب پودوسیت‌های گلومرولی و در نتیجه کاهش تماس آن‌ها با غشا پایه گلومرولی و

کلیه در موش‌های تیمارشده با داروی ضدصرع لاموتريزین می‌گردد [۱۰]. در مطالعه شیرپور و همکاران نیز مشخص شد که مصرف عصاره زنجیبل همراه با مصرف الکل باعث کاهش مجدد و قابل توجه غلظت پلاسمایی کراتینین، اوره می‌شود [۱۱]. همچنین در یک بررسی دیگر نشان داده شد که عصاره اتیل استاتی زنجیبل دارای خواص محافظتی قابل توجهی در بافت کلیه در مقابل دوز بالای استامینوفن است که احتمالاً به علت ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قوی زنجیبل است [۷]. مطالعات انجام شده توسط صالح و همکاران نیز نشان‌دهنده تاثیر زنجیبل در پیشگیری از افزایش اوره و کراتینین سرم در حیوانات تحت تیمار با استامینوفن می‌باشد [۲۵]. نشان داده شده است که زنجیبل می‌تواند به طور موثری با تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن مقابله کند و این کار را با افزایش فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز انجام می‌دهد. برخلاف اثرات آزاتیوپرین که با تخلیه آنتی‌اکسیدانی کلیه باعث تخریب ساختار بافتی کلیه و اختلال در عملکرد آن می‌شود عصاره زنجیبل با داشتن ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی و با جلوگیری از تخلیه آنتی‌اکسیدان‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کلیه مانع اثرات تخریبی آزاتیوپرین بر ساختار بافتی و عملکردی کلیه می‌شود [۸]. کوئرستین به عنوان یکی از فلاونوئیدهای موجود در زنجیبل، به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی نقش ایمنی سلولی در برابر استرس اکسیداتیو دارد [۲۶]. همچنین تحقیقات انجام گرفته حاکی از اثرات حفاظتی کوئرستین بر روی کبد، قلب، کلیه‌ها، نورون‌ها و DNA در برابر عوامل آسیب رسان می‌باشد [۲۷-۲۹]. به علاوه ویتامین‌های C و B و روغن‌های فرار از جمله دیگر ترکیبات زنجیبل با خواص آنتی‌اکسیدانی و محافظتی در برابر عوامل آسیب رسان و رادیکال‌های آزاد هستند [۲۵]. بنابراین احتمالاً کاهش عوارض مخرب آزاتیوپرین بر عملکرد کلیه توسط عصاره زنجیبل در مطالعه حاضر،

کراتینین بیشتر از ماهیچه اسکلتی مشتق و از راه کلیه دفع می‌گردد. چون حجم توده عضلانی هر فرد کم و بیش ثابت است تصفیه کراتینین در جریان خون توسط کلیه‌ها صورت می‌گیرد و بنابراین اندازه‌گیری کراتینین در خون می‌تواند نشان‌دهنده کارکرد کلیه‌ها باشد بدین صورت که هرگاه کارکرد کلیه‌ها کاهش یابد میزان کراتینین درخون افزایش می‌یابد [۲۰]. اسیداوریک نیز همچون کراتینین توسط کلیه‌ها دفع می‌شود لذا در نارسایی کلیه میزان آن در خون افزایش می‌یابد بنابراین افزایش این فاکتورها طی مصرف آزاتیوپرین نشانه‌ای از التهاب و آسیب کلیوی است. هم سو با نتایج مطالعه حاضر در بک بررسی دیگر نشان داده شد که تیمار با آزاتیوپرین، باعث افزایش معنادار سطوح سرمی کراتینین و کاهش معنادار میزان فیلتراسیون گلومرولی و کاهش کلیرانس کراتینین در مقایسه با گروه تحت درمان با مایکوفولات موقتیل<sup>۱</sup> می‌شود [۲۱]. بر اساس نتایج حاصل از یک بررسی نشان داده شد که آزاتیوپرین باعث بر هم زدن و نقص سیستم آنتی‌اکسیدانی در بافت کلیه موش صحرایی می‌گردد [۲۲]. نشان داده شده است آزاتیوپرین با ایجاد استرس اکسیداتیو و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها باعث افزایش مالون دی‌آلدهید و بروز اثرات نفووتوكسیستی و اختلال در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت کلیه می‌شود [۲۳] و این وضعیت در نهایت ممکن است باعث مرگ سلولی همراه با علیم گسترده بیماری شود [۲۴] و از این طریق با اثر بر ساختار و عملکرد کلیه‌ها باعث افزایش سطوح سرمی اوره و کراتینین و اسید اوریک در موش‌های صحرایی می‌شود. هم سو با نتایج مطالعه حاضر در یک بررسی دیگر نشان داده شد که زنجیبل باعث کاهش سطوح سرمی اوره و کراتینین و همچنین ببود ساختار گلومرول‌ها و لوله‌های پیچیده بافت

<sup>۱</sup> Mycophenolate Mofetil

آسیب‌های بافتی در نتیجه مصرف داروی آزاتیوپرین می‌شود.

### نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که آزاتیوپرین با ایجاد آسیب به ساختار بافتی کلیه‌ها باعث افزایش میزان سرمی اوره، کراتینین و اسید اوریک می‌شود و عصاره هیدرولکلی زنجیل نیز احتمالاً به واسطه خواص آنتی‌اسیدانی قوی خود و با مهار رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط آزاتیوپرین، بر بافت کلیه اثر محافظتی داشته باشد و باعث کاهش شدت آثار تخریبی آزاتیوپرین بر ساختار بافتی کلیه‌ها می‌شود و از این طریق باعث کاهش میزان سرمی اوره، کراتینین و اسید اوریک می‌گردد.

### تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز به شماره ۱۴۵۴۳۰۹۰۰۱۴۵۴۳ می‌باشد. نویسنده‌ان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی شیراز تقدیر و تشکر می‌نمایند.

به خواص آنتی‌اسیدانی قوی ترکیبات موجود در این گیاه و مقابله با اثرات اکسیداتیو داروی آزاتیوپرین مرتبط می‌باشد. ناهنجاری‌های ایجاد شده در ساختار بافتی کلیه در حیوانات دریافت کننده آزاتیوپرین، نتیجه آسیب DNA یا آسیب کروموزومی است که منجر به نکروز سلولی و آسیب غشای گلومرولی می‌گردد [۲۲]. در آسیب‌های کلیوی، کورتکس خشن و نامنظم شده و بافت جوشگاه در گلومرول‌ها و لوله‌های ادرای تشکیل می‌شود و شاخه‌های شربان کلیوی ضخیم می‌گردد و در فیلتراسیون یون‌ها اشکال ایجاد می‌شود که نتیجه این فرآیند، آسیب شدید گلومرولی است. اکثر داروها با واکنش اکسیداتیو همراه بوده و با تغییر نفوذپذیری غشای سلول‌ها تعادل یونی را به هم زده و احتمالاً آزاتیوپرین هم با همین مکانیسم باعث آسیب به ساختار بافتی کلیه‌ها می‌شود [۲] و زنجیل با داشتن خواص آنتی‌اسیدانی و همچنین اثرات محافظتی در برابر نفروتوکسین‌های مختلف [۲۶] باعث ببود

### References

- 1-Amin A, Hamza AA. Hepatoprotective effects of Hibiscus, Rosmarinus and Salvia on azathioprine-induced toxicity in rats. Life Sci. 2005 Jun; 77(3):266-78.
- 2-Amouoghli Tabrizi B, Mohajeri D, Doostar Y, Baradaran Alizade S, Khodadadi A, Farajzade F. Biochemical and pathological study of protective effect of Vitamin A in Azathioprine - induced hepatotoxicity in Rat. Feyz. 2009 Oct; 13 (3) :180-87. [Full text in Persian]
- 3-Lee AU, Farrell GC. Mechanism of azathioprine-induced injury to hepatocytes: roles of glutathione depletion and mitochondrial injury. J Hepatol. 2001 Dec;35(6):756-64.
- 4-Fardous SK, Abeer EL. The protective effect of vitamin C on Azathioprine induced seminiferous tubular structural changes and cytogenetic toxicity in albino rats. Cancer Therapy. 2006 Mar; 4: 125-34.
- 5- Amiri H, Mohammadi M, Sadatmand S, Taheri E. Study the chemical composition of essential oil of Ginger (*Zingiber officinale*) and antioxidant and cell toxicity. JMP. 2016 May; 2 (58): 89-98. [Full text in Persian]
- 6-Tavakoli H, Aryaeian N. A review of the effect of Ginger in inflammation. rsj. 2016 Jun; 2 (1) :52-64.
- 7-Abdul-Hamid Z, Budin SB, Hamid A, Husain K, Mohamed J. Nephroprotective effects of Zingiber zerumbet smith ethyl acetate extract against paracetamol-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. J Zhejiang Univ Sci B. 2012 Mar; 13(3):176-85.

- 8-Maralla S. Effect of Ginger extracts consumption on renal function during ethanol withdrawal induced-stress. *Int j innov res sci eng technol.* 2013 Nov; 2(11): 6412-18.
- 9-Khoshvaghti A, Mard Khoshnood M. Investigation of Zingiber powder effects on liver, kidney and pancreas indexes in rat JVCS. 2015 Spring & Summer; 8(1):63-79. [Full text in Persian]
- 10-Zekrizadeh Z, Farokhy F. The effect of Hydroalcoholic extract of Ginger (HEG) on histological and biochemical parameters of kidney in epileptic rats treated with lamotrigin. *Qom Univ Med Sci J.* 2014; 8 (5) :54-62. [Full text in Persian]
- 11-Shirpour A, Rezaei F, Abdollahzadeh Fard A, Tagizadeh Afshari A. Ginger hydro -alcoholic extract ameliorates the alcohol-induced kidney dysfunction in rat. *J Urmia Nurs Midwifery Fac.* 2015 Jun; 13 (3) :246-52. [Full text in Persian]
- 12-Srivastava KC, Mustafa T. Ginger (*Zingiber officinale*) in rheumatism and musculoskeletal disorders. *Med Hypotheses.* 1992 Dec;39(4):342-48.
- 13-Prasanna K, Kalpagam P, Nirmala K. Alterations in antioxidant status of rats following intake of ginger through diet. *Food Chemistry.* 2008 Feb;106(3):991-96.
- 14-Yusof YA, Ahmad N, Das S, Sulaiman S, Murad NA. Chemopreventive efficacy of ginger (*Zingiber officinale*) in ethionine induced rat hepatocarcinogenesis. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2008 Oct;6(1):87-93.
- 15-Abdel-Azeem AS, Hegazy AM, Ibrahim KS, Farrag AR, El-Sayed EM. Hepatoprotective, antioxidant, and ameliorative effects of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) and vitamin E in acetaminophen treated rats. *J Diet Suppl.* 2013 Sep;10(3):195-209.
- 16-Minaiyan M, Ghannadi A, Mahzouni P, Nabi-Meibodi M. Anti-ulcerogenic effect of ginger (rhizome of *Zingiber officinale Roscoe*) hydroalcoholic extract on acetic acid-induced acute colitis in rats. *RPS.* 2008 Oct; 3(2):15-22.
- 17-Hosseini SE, Dalaeli Z. The effect of lithium carbonate on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in adult female Wistar rats. *FEYZ.* 2016Feb; 19 (6) :450-56. [Full text in Persian]
- 18-Mirzakhani Z, Hosseini SE. Effects of chamomile hydro-alcoholic extract (*Matricaria chamomilla*) on the aborted fetuses, serum sex hormones and ovarian follicles in adult female rats. *J Ardabil Univ Med Sci.* 2017 Spring; 17 (1) :22-31. [Full text in Persian]
- 19-Shereen BG, Doaa MZ. Beneficial effects of green tea extract on liver and kidney function, ultrastructure, lipid profile and hematological parameters in aged male rats. *Global Veterinaria.* 2013 Jan; 11(2): 191-205.
- 20-Mohseni Kouchesfehani H, Khoshnoud S, Nabiuni M. Evaluation of protective effect of hydro-alcoholic extract of raspberry fruit on the methotrexate-induced nephrotoxicity in male Wistar rats. *RJMS.* 2015 Mar; 22 (138):83-87. [Full text in Persian]
- 21-Ljuca F, Imamovi S, Meši D, Hasuki S, Omerovi S, Bazardžanovi M, et al. Mycophenolate mofetil versus azathioprine: effects on renal graft function in early post transplant period. *Bosn J Basic Med Sci.* 2009 May; 9(2): 156–160.
- 22-Elelaimy IA, Elfiky SA, Hassan AM, Ibrahim HM, Elsayad RI. Genotoxicity of anticancer drug Azathioprine (Imuran): role of omega-3( -3) oil as protective agent. *J Appl Pharm Sci.* 2012 Mar; 2 (4): 14-23.
- 23-Akinlolu AA, Akinola BO, Adedipe O, Oluyomi O. Azathioprine and methotrexate impaired the morphology and functions of the kidney in adult wistar rats. *AJOA.* 2014 Mar; 3 (1): 205-216.
- 24-Shariatzadeh SM, Kazemipour N, Nazifi S. Investigation of Protective Effect of hydroalcoholic extract of ginger on cytotoxicity of silver nanoparticles on hepatic enzymes, hematologic factors, blood oxidative stress markers and hepatic apoptosis in Balb-c mice. *AMUJ.* 2016; Mar 19(114): 78-87. [Full text in Persian]
- 25-Salah SH, Abdouh S, Booles H, Abdel Rahim EA. Effect of *Zingiber officinale* on paracetamol-induced genotoxicity in male rats. *J Med Plants Res.* 2012 Oct; 6(41): 5425-34.
- 26-Rahman S, Salehin F, Iqbal A. In vitro antioxidant and anticancer activity of young *Zingiber officinale* against human breast carcinoma cell lines. *BMC Complement Altern Med.* 2011 Sep;11:76.
- 27-Abo-Salem OM, Abd-Ellah MF, Ghonaim MM. Hepatoprotective activity of quercetin against acrylonitrile-induced hepatotoxicity in rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 2011 Nov-Dec; 25(6): 386-92.

- 28- Abarikwu SO. Protective effect of quercetin on atrazine-induced oxidative stress in the liver, kidney, brain, and heart of adult wistar rats. *Toxicol Int.* 2014 May; 21(2): 148-155.
- 29- Zhang Y, Gao Z, Liu J, Xu Z. Protective effects of baicalin and quercetin on an iron overloaded mouse: comparison of liver, kidney and heart tissues. *Nat Prod Res.* 2011 Jul; 25(12): 1150-60.