

## *Effect of Quercetin on Methotrexate-induced Hepatic and Renal Damages in Male Rats*

Elham Moradi<sup>1</sup>,  
Esfandiar Heidarian<sup>2</sup>,  
Mostafa Gholami-Arjenaki<sup>3</sup>,  
Javad Saffari-Chaleshtori<sup>4</sup>,  
Gashtasb Mardani<sup>5</sup>,  
Alireza Karimi-Taghanaki<sup>6</sup>,  
Zahra Normohammadian<sup>7</sup>

<sup>1</sup> General Practitioner, Clinical Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

<sup>2</sup> Professor, Clinical Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

<sup>3</sup> MSc in Animal Physiology, Clinical Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

<sup>4</sup> MSc in Biochemistry, Clinical Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

<sup>5</sup> MSc in Environmental Health, Medical Plants Research Centre, Faculty of Health, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

<sup>6</sup> Medical Laboratory Technician, Medical Plants Research Centre, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

<sup>7</sup> BSc in Medical Laboratory, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

(Received April 27, 2015 ; Accepted July 25 , 2015)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Methotrexate as a chemotherapy drug causes chronic liver damage, infiltration of neutrophils, oxidative stress, and direct renal tubular damage. Quercetin is a flavonoid with antioxidant and anti-inflammatory properties. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of quercetin on eliminating the liver and kidney toxicity of methotrexate.

**Materials and methods:** In this experimental study, 32 rats were divided into 4 groups. Group I (control) was given regular diet. Group II received single-dose methotrexate. Group III received methotrexate + a single dose quercetin and the last group (positive control) received methotrexate + a single dose silymarin. After five days, blood samples were taken and the serum GOT, GPT, ALP, Cr, urea and antioxidant capacity of plasma were measured. Some parts of liver and kidney were removed to measure the liver and kidney SOD, MDA, catalase activity and histopathological studies.

**Results:** Serum GOT, GPT, ALP, Cr, and liver and kidney MDA were significantly higher ( $P < 0.05$ ) in group II, compared with those of the control group. These parameters significantly decreased ( $P < 0.05$ ) in group III. Compared to the control group, antioxidant capacity of plasma, activity of the liver and kidney SOD, catalase and serum urea decreased significantly in group II ( $P < 0.05$ ). Administration of quercetin significantly increased these parameters ( $P < 0.05$ ) and decreased hepatic and renal lymphocyte infiltration.

**Conclusion:** According to the results, administration of quercetin could have a protective role in preventing liver and renal toxicity induced by methotrexate which could be due to its antioxidant property.

**Keywords:** Quercetin, liver toxicity, renal toxicity, methotrexate

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(127): 25-37 (Persian).

## بررسی اثر کوئرستین بر آسیب های کبدی و کلیوی ناشی از متوترکسات در موش صحرایی نر

الهام مرادی<sup>۱</sup>

اسفندیار حیدریان<sup>۲</sup>

مصطفی غلامی ارجنکی<sup>۳</sup>

جواد صفاری چالشتی<sup>۴</sup>

گشتاسب مردانی<sup>۵</sup>

علیرضا کریمی طاقانکی<sup>۶</sup>

زهرا نورمحمدیان<sup>۷</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** متوترکسات به عنوان داروی شیمی درمانی باعث آسیب مزمن هیپاتوسلولار، ارتشاح سلول های التهابی، استرس اکسیداتیو و آسیب مستقیم روی لوله های کلیه می شود. کوئرستین یک فلاونوئید با خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی است. بنابراین، هدف از این پژوهش بررسی اثر کوئرستین روی رفع سمیت کبدی و کلیوی ناشی از متوترکسات می باشد.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی، ۳۲ سر موش صحرایی به ۴ گروه تقسیم شدند. گروه اول (شاهد) غذای معمولی، گروه دوم (تست بدون درمان) متوترکسات تک دوز، گروه سوم متوترکسات با کوئرستین و گروه چهارم (کنترل مثبت) متوترکسات با سیلیمارین دریافت کردند. پس از ۵ روز، نمونه های خون تهیه شد و GOT، GPT، ALP، Cr، اوره سرم و ظرفیت آنتی اکسیدانی پلازما اندازه گیری شدند. بخش های از کبد و کلیه جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز، مالون دی آلدئید و SOD کبدی و کلیوی و مطالعات هیستوپاتولوژیکی برداشته شد.

**یافته ها:** مقادیر سرمی Cr، ALP، GPT، GOT و MDA کبدی و کلیوی در گروه دوم، نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری ( $p < 0/05$ ) را نشان داد. پارامترهای مذکور به طور معنی داری ( $p < 0/05$ ) در گروه دریافت کننده کوئرستین کاهش یافت. SOD، FRAP، کاتالاز کبدی و کلیوی و اوره سرم در گروه دوم، به طور معنی داری ( $p < 0/05$ ) نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. تجویز کوئرستین باعث افزایش معنی دار ( $p < 0/05$ ) این پارامترها و کاهش ارتشاحات لنفوسیتی کبدی و کلیوی گردید.

**استنتاج:** بر اساس این نتایج، تجویز کوئرستین در رفع مسمومیت کبدی و کلیوی ناشی از متوترکسات نقش محافظتی دارد که به علت خاصیت آنتی اکسیدانی این ماده می باشد.

**واژه های کلیدی:** کوئرستین، مسمومیت کبدی، مسمومیت کلیوی، متوترکسات

### مقدمه

متوترکسات (Methotrexate, MTX) یکی از ترکیبات ضد سرطان با کاربرد بالینی می باشد (۱). این ترکیب به طور وسیعی به عنوان یک داروی شیمی درمانی استفاده می شود. متوترکسات در درمان فرم های

E-mail: heidarian46@yahoo.com

**مؤلف مسئول:** اسفندیار حیدریان - شهرکرد: رحمتیه، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

۱. پزشک عمومی، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲. استاد بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۳. کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۴. کارشناس ارشد بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۵. کارشناس ارشد بهداشت محیط، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۶. کارداران علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۷. کارشناس علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۲/۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۵/۳

خطرناک تومورهای بدخیم مثل بدخیمی‌های خون، لنف، پستان، رحم و برخی بیماری‌های دیگر مثل آرتریت روماتوئید (۴-۲) و بیماری‌های پوستی مثل لیکن پلان ژنرالیزه (۵) استفاده می‌شود. به هر حال متوترکسات درمان اساسی در برخی بیماری‌ها است، اما عوارض جانبی متفاوتی در استفاده از آن گزارش شده است، به طوری که متوترکسات در بافت‌های مختلف بدن خصوصاً کیسه صفرا، کبد و کلیه تجمع می‌یابد (۶). بنابراین، متوترکسات به علت ایجاد سمیت کبدی و کلیوی می‌تواند تهدید کننده حیات باشد (۷، ۸) و موجب کاهش مصرف این دارو برای بیماران شود (۲). متوترکسات یک هپاتوتوکسیک بالقوه است و مطالعات حاکی از اثر سمی متوترکسات به واسطه تشکیل رادیکال فعال اکسیژن می‌باشد (۹). مطالعات نشان داده‌اند که متوترکسات با مکانیسم استرس اکسیداتیو باعث ایجاد رادیکال‌های آزاد و منجر به آسیب مستقیم توبول‌های کلیه می‌شود (۱۰). کوئرستین (Quercetin) یک محصول پلی فنلی در گیاهان است. کوئرستین یکی از فراوان‌ترین و مهم‌ترین ترکیبات خانواده فلاونوئیدها به شمار می‌رود، زیرا بیش‌ترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را در میان سایر فلاونوئیدها دارد و حتی در مقایسه با ویتامین "ث" نیز حدود شش برابر قوی‌تر است. کوئرستین در سبزیجات، میوه‌جات، پیاز، سیب، انگور قرمز، مرکبات، کلم بروکلی و گوجه فرنگی، چای سبز و سیاه و شکلات تیره وجود دارد (۱۱-۱۳). تحقیقات انجام گرفته حاکی از اثرات حفاظتی کوئرستین بر روی کبد، قلب، کلیه‌ها، نورون‌ها و DNA در برابر عوامل آسیب‌زا می‌باشد (۱۴-۱۶). هم‌چنین، این ترکیب اثرات ضد سرطانی، ضد ویروسی، ضد میکروبی، ضد آلرژی، ضد فشارخون و محافظت در برابر کاتاراکت (۱۷، ۱۸) دارد. علاوه بر این، کوئرستین خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی نیز دارد (۱۳، ۱۷) و باعث حفظ سطح سرمی گلوکوتایون و کاهش سطح سرمی مالون دی‌آلدئید و کاهش متابولیسم نیتریک اکسید و تشکیل سوپر اکسید،

کاهش آزادسازی واسطه‌های اکسیدانی و التهابی می‌شود (۱۹). این ترکیب دارای اثر محافظتی در برابر آسیب اکسیداتیو است و با کاهش آسیب اکسیداتیو در کبد از افزایش آلکالین فسفاتاز (ALP)، آلانین ترانسفراز (GPT) و آسپاراتات ترانسفراز (GOT) جلوگیری می‌کند (۲۰). در رابطه با اثر کوئرستین بر آسیب کبدی و کلیوی ناشی از متوترکسات اطلاعات جامعی در دست نیست و در مطالعات قبلی پارامترهای محدودی بررسی شده‌اند (۲۱). بنابراین، هدف از این تحقیق بررسی اثر کوئرستین بر رفع اثرات سمی متوترکسات بر روی بافت کبدی، کلیوی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کبد و کلیه می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، از ۳۲ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار، با سن ۸ هفته و وزن  $50 \pm 20$  گرم استفاده شد. موش‌های صحرایی از دانشگاه علوم پزشکی اهواز خریداری شدند. این مطالعه در مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد در سال ۱۳۹۳ انجام شد. برای کاهش میزان تلفات موش‌ها و تطابق بیش‌تر با محیط، ۲ هفته قبل از شروع تحقیق، موش‌ها به محل نگهداری منتقل شدند. موش‌های صحرایی در دمای ۲۴-۲۲ درجه سانتی‌گراد و سیکل ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. غذای موش‌های صحرایی، غذای استاندارد پلیت شده (تهیه شده از شرکت پارس دام ایران) و آب بود که به صورت نامحدود در دسترس آن‌ها قرار گرفت و از هیچ نوع واکسن و داروی دیگری استفاده نشد. روش‌ها و مراحل تحقیق توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد مورد تایید قرار گرفت. در این مطالعه، تمام نکات اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد و موش‌ها در شرایط استاندارد نگهداری شدند. وسایل مورد استفاده شامل اسپکتروفتومتر Unico (مدل ۲۱۰۰، آمریکا)، دستگاه هموژنایزر Heidolph (مدل Silencerusher M)،

آلمان)، دستگاه اتو آنالیزور BT300 (فرانسه)، کیت‌های تجاری ALP, GPT و GOT، اوره، کراتینین از شرکت پارس آزمون (ایران، تهران)، تری پیریدیل تری آذین، استاندارد مالون دی آلدئید آب اکسیژن از شرکت مرک (آلمان) و کوئرستین، متوترکسات و سلیمارین از شرکت سیگما (آمریکا) خریداری شدند. موش‌های صحرایی نر به طور تصادفی به ۴ گروه هشت‌تایی تقسیم شدند. گروه اول (شاهد): غذای استاندارد پلیت شده را دریافت کرد و ۰/۵ سی سی سرم فیزیولوژی به صورت درون صفاقی (برای برابری در شوک حاصل از تزریق با سایر گروه‌ها) دریافت کردند و به مدت ۵ روز ۰/۵ سی سی آب مقطر به صورت دهانی با گاوآژ دریافت کردند. گروه دوم (گروه تست بدون درمان)، که ۲۰ mg/Kg وزن بدن متوترکسات تک دوز (طبق مطالعات انتشار یافته) به روش درون صفاقی دریافت کردند (۲۱) و سپس به مدت ۵ روز ۰/۵ سی سی آب مقطر به صورت دهانی با گاوآژ دریافت کردند. گروه سوم: ۲۰ mg/Kg وزن بدن متوترکسات تک دوز به روش درون صفاقی و ۵۰ mg/Kg وزن بدن کوئرستین (طبق مطالعات انتشار یافته) نیز به صورت دهانی (۲۱، ۲۲) با گاوآژ به مدت ۵ روز دریافت کردند. گروه چهارم (گروه کنترل مثبت): ۲۰ mg/Kg وزن بدن متوترکسات تک دوز به روش درون صفاقی و ۵۰ mg/Kg وزن بدن سلیمارین را به صورت دهانی با گاوآژ به مدت ۵ روز دریافت کردند (۲۳). پس از پایان ۵ روز، موش‌های صحرایی با کلروفورم بیهوش شدند و از قلب آن‌ها خون گیری شد. سپس سرم و پلاسما جهت اندازه گیری GOT (گلوتامات اگزالواستات ترانس آمیناز)، GPT (گلوتامات پیرووات ترانس آمیناز)، ALP (آلکالین فسفاتاز)، ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم، اوره، کراتینین و مالون دی آلدئید تهیه شد. بخشی از بافت کبد و کلیه هم جهت مطالعات هیستوپاتولوژیکی و اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز کبدی و کلیوی برداشته شد.

اندازه گیری پارامترهای بیوشیمیایی سرم GOT, GPT, ALP، اوره و کراتینین سرم با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون و با دستگاه اتوآنالیزور BT3000 به روش آنزیمی اندازه گیری شدند.

اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی پلاسما (FRAP) ظرفیت آنتی اکسیدانی (FRAP) با استفاده از تری پیریدیل تری آذین طبق طبق روشی که قبلاً توضیح داده شده است (۲۴) با استفاده از روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد. در این روش  $Fe^{2+}$  با ترکیب تری پیریدیل تری آذین ایجاد کمپلکس آبی رنگی می کند که در طول موج ۵۹۳ نانومتر دارای ماکزیم جذب نوری است. منحنی استاندارد با استفاده از  $FeSO_4$  و در غلظت‌های مختلف ( $1000-500-250-125 \mu M$ ) تهیه و به صورت خطی رسم گردید و جذب نوری تمامی نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد تعیین غلظت شدند.

#### اندازه گیری مالون دی آلدئید

غلظت مالون دی آلدئید (MDA) سرم با دستگاه HPLC (Agilent, USA) و به روشی که قبلاً توضیح داده شد، اندازه گیری شد (۲۵). به طور خلاصه، در یک میکروتیوب ۲ میلی لیتری، ۵۰ میکرولیتر از سرم ریخته و سپس به آن ۵۰ میکرولیتر محلول ۰/۰۵ درصد از BHT- (Butylatedhydroxytoluene) تهیه شده در اتانول ۰/۹۵ درصد، ۴۰۰ میکرولیتر اسید فسفریک ۰/۴۴ میلی مولار و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول اسید تیوباریتوریک (TBA) ۴۲ میلی مولار اضافه شد. محلول حاصله ورتکس شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه در انکوباتور گذاشته شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ جهت سرد شدن، قرار داده شدند. متعاقباً ۲۵۰ میکرولیتر بوتانول جهت استخراج کمپلکس -MDA TBA به میکروتیوب اضافه و به مدت ۵ دقیقه ورتکس و در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و از محلول رویی ۱۰۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق

آنزیم بر حسب فعالیت مخصوص محاسبه شد.

#### اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم SOD

برای اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم SOD بافت کبدی و کلیوی، از کیت (Glory Science, USA) و طبق دستور شرکت سازنده استفاده شد.

#### بررسی بافت شناسی

نمونه‌های بافت کبد و کلیه موش‌ها تهیه و در فرمالین ۲۰ درصد نگهداری شد. پس از مراحل آماده‌سازی بافتی و تهیه بلوک‌های پارافینی، مقاطع ۵ میکرونی از بافت‌ها تهیه و به روش هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ آمیزی شد (۲۸). سپس توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند و آسیب بافتی در آن‌ها ارزیابی شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS (Version 18) و تست ANOVA یک طرفه برای آنالیز نتایج استفاده شد. از تست Post hoc Tukey برای مقایسه گروه‌ها به صورت دو به دو استفاده شد و  $P < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

در جدول شماره ۱ اثر متوترکسات و کوثرستین بر روی مقادیر سرمی ALP، GOT، GPT، GPT، اوره، کراتینین و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلازما (FRAP) در گروه‌های تحت آزمایش دیده می‌شود. میانگین فعالیت آنزیم‌های ALP، GPT، GOT و مقدار کراتینین در گروه ۲ (دریافت‌کننده متوترکسات بدون درمان)، نسبت به سایر گروه‌ها به طور معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) افزایش پیدا کرد، ولی FRAP و اوره در گروه ۲ نسبت به سایر گروه‌ها به طور معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) کاهش پیدا کرد. از طرف دیگر، تجویز کوثرستین و سلیمارین باعث کاهش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) غلظت سرمی GPT، GOT و کراتینین به ترتیب در گروه سوم (تحت درمان با کوثرستین) و گروه چهارم (گروه کنترل مثبت) شد،

شد. شرایط دستگاه HPLC عبارت بود از ستون C18، فاز متحرک شامل متانول و بافر فسفات پتاسیم منوبازیک ۵۰ میلی مولار با pH مساوی ۶/۸ (به نسبت ۴۰ به ۶۰)، سرعت فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر در دقیقه، دمای ستون ۳۷ درجه سانتی‌گراد، Excitation دتکتور فلورسانس در طول موج ۵۱۵ نانومتر و Emission دتکتور در طول موج ۵۵۳ نانومتر تنظیم شد. از 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (TEP) به عنوان استاندارد مالون دی‌آلدئید استفاده شد.

#### اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (بافت کبد)

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز بافت کبدی طبق روشی که قبلاً توضیح داده شد، اندازه‌گیری شد (۲۶). پس از خارج کردن بافت کبدی، بافت‌های زائد آن جدا گردید و با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد. سپس ۱ گرم از بافت کبد قطعه قطعه و در یک استوانه شیشه‌ای ریخته شد و به میزان ۴ برابر حجم، به آن بافر فسفات ۵۰ میلی مولار هموژنیزاسیون اضافه و با استفاده از هموژنایزر (Heidolph, Silentcrusher M model, Germany) به مدت ۴ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ RPM هموژنیزه شد. سوپانسیون حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۵۰۰ سانتریفوژ شد تا سلول‌های هموژنیزه نشده رسوب کنند و محلول هموژن خالص برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از آب اکسیژن به عنوان سوپسترا طبق روش مورد استفاده قرار گرفت. ۵۰ میکرولیتر از مایع فوقانی سانتریفوژ شده را برداشته و با ۲۵ میلی‌لیتر بافر فسفات به میزان ۵۰۰ بار رقیق گردید. سپس ۲ میلی‌لیتر از این محلول در داخل کووت ریخته شد و ۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۳۰ میلی مولار را به آن اضافه گردید و کاهش جذب نوری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر در مقابل بلانک هر ۱۵ ثانیه یک بار قرائت شد. مقدار پروتئین به روش برادفورد (۲۷) و با استفاده از سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد اندازه‌گیری گردید و سپس فعالیت

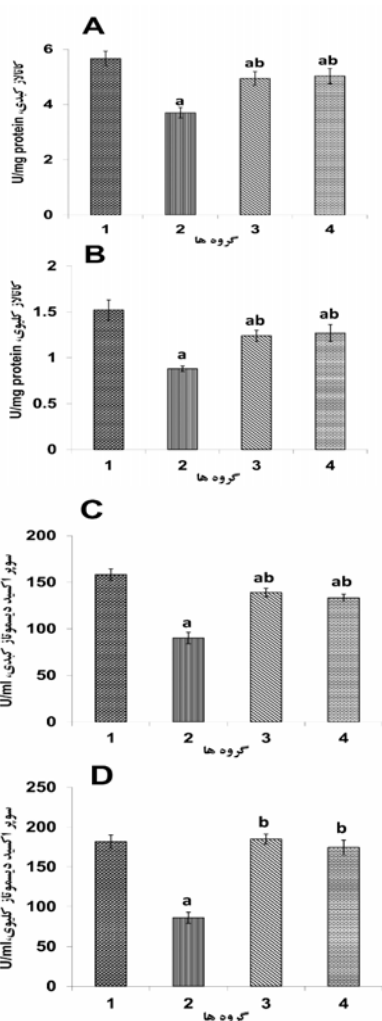
جدول شماره ۱: مقادیر سرمی ALP، GOT، GPT، اوره، کراتینین و FRAP در گروه های مورد مطالعه

گروه ها	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	FRAP (میکرومولار)	کراتینین (mg/dl)	اوره (mg/dl)
گروه ۱ (شاهد)	۳۵۶/۱۲±۳۳/۴۳	۵۵/۸۷±۷/۴۷	۱۴۲/۷۷±۷/۴۸	۶۸۱/۳۲ ± ۲۶/۴۸	۰/۶۰ ± ۰/۰۸	۴۱/۱۸ ± ۱/۹۶
گروه ۲ (متوترکسات)	۷۸۲/۱۲±۶۱/۵۴ <sup>a</sup>	۲۷۷/۸۷±۲۵/۶۵ <sup>a</sup>	۳۰۵/۵۵±۲۵/۷۱ <sup>a</sup>	۵۱۱/۰۱ ± ۲۸/۰۶ <sup>a</sup>	۰/۸۲ ± ۰/۰۷ <sup>a</sup>	۳۰/۲۰ ± ۱/۴۲ <sup>a</sup>
گروه ۳ (کوئرستین)	۵۴۲/۳۷±۴۲/۴۴ <sup>ab</sup>	۹۳/۸۷±۱۱/۴۵ <sup>ab</sup>	۱۷۳/۷۵±۸/۴۶ <sup>ab</sup>	۷۸۷/۰ ± ۵۰/۱۳ <sup>ab</sup>	۰/۷۵ ± ۰/۰۷ <sup>ab</sup>	۳۵/۷۷ ± ۱/۳۶ <sup>ab</sup>
گروه ۴ (سیلیمارین)	۴۵۳/۱۲±۲۶/۸۷ <sup>abc</sup>	۸۹/۶۲±۹/۱۳ <sup>ab</sup>	۱۶۵/۳۷±۶/۳۲ <sup>ab</sup>	۸۲۸/۹۶ ± ۵۴/۵۸ <sup>ab</sup>	۰/۷۴ ± ۰/۰۴ <sup>ab</sup>	۳۷/۶۵ ± ۱/۴۶ <sup>ab</sup>

حجم نمونه در هر گروه ۸ سر موش صحرایی نر. گروه اول شاهد (Control)، گروه دوم موش های تست (دریافت کننده متوترکسات ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بدون درمان، گروه سوم موش های تست تحت درمان با کوئرستین (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و گروه چهارم موش های تست تحت درمان با سیلیمارین (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن).

<sup>a</sup>:  $p < 0.05$  در مقایسه با مقادیر میانگین گروه اول (گروه شاهد). <sup>c</sup>:  $p < 0.05$  در مقایسه با مقادیر میانگین گروه سوم.

<sup>b</sup>:  $p < 0.05$  در مقایسه با مقادیر میانگین گروه دوم. اعداد به صورت Mean±SEM نشان داده شده اند.



ولی در این دو گروه تجویز کوئرستین و سیلیمارین باعث افزایش معنی داری ( $p < 0.05$ ) در میزان FRAP و اوره نسبت به گروه ۲ (دریافت کننده متوترکسات بدون درمان) شد. نتایج حاکی از اثر تقریباً یکسان کوئرستین در دوز به کار رفته در مقایسه با دوز به کار رفته سیلیمارین بود.

نتایج فعالیت مخصوص کاتالاز کبدی و کلیوی در گروه های مورد مطالعه

در تصویر شماره ۱ (A و B) مشاهده می گردد که میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز کبدی و کلیوی در گروه دوم (دریافت کننده متوترکسات بدون درمان) نسبت به سایر گروه ها، کاهش معنی داری را نسبت به سایر گروه ها نشان داد ( $p < 0.05$ ). میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز کبدی و کلیوی در گروه سوم (تحت درمان با کوئرستین) و چهارم (دریافت کننده سیلیمارین)، نسبت به گروه ۲ (دریافت کننده متوترکسات بدون درمان) افزایش معنی داری را نشان داد ( $p < 0.05$ ). از طرف دیگر، میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز کبدی و کلیوی در گروه ۴ (تحت درمان با سیلیمارین)، نسبت به گروه ۳ (تحت درمان با کوئرستین)، اختلاف معنی دار پیدا نکرد ( $p > 0.05$ ). کوئرستین در بالا بردن فعالیت آنزیم کاتالاز کبدی و کلیوی، اثر و قدرتی تقریباً مشابه با سیلیمارین (گروه کنترل مثبت) در دوز مورد استفاده را نشان داد.

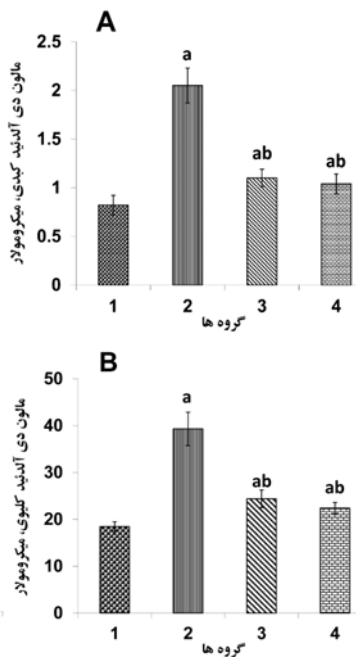
تصویر شماره ۱: مقادیر سوپراکسیددیسموتاز (SOD) و کاتالاز کبدی و کلیوی در گروه های مورد مطالعه

<sup>a</sup>:  $p < 0.05$  در مقایسه با مقادیر میانگین گروه اول (گروه شاهد).

<sup>b</sup>:  $p < 0.05$  در مقایسه با مقادیر میانگین گروه دوم.

اعداد به صورت Mean±SEM نشان داده شده اند.

حجم نمونه در هر گروه ۸ سر موش صحرایی نر. گروه اول شاهد (Control)، گروه دوم موش های تست (دریافت کننده متوترکسات ۲۰



تصویر شماره ۲: مقادیر مالون دی آلدئید (MDA) کبدی و کلیوی در گروه های مورد مطالعه

حجم نمونه در هر گروه ۸ سر موش صحرایی نر. گروه اول شاهد (Control)، گروه دوم موش های تست (دریافت کننده متوترکسات ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بدون درمان، گروه سوم موش های تست تحت درمان با کوئرستین (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و گروه چهارم موش های تست تحت درمان با سیلیمارین (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن).  $p < 0.05$  در مقایسه با مقادیر میانگین گروه اول (گروه شاهد).  $p < 0.05$  در مقایسه با مقادیر میانگین گروه دوم. اعداد به صورت Mean  $\pm$  SEM نشان داده شده اند.

#### نتایج تاثیر کوئرستین بر تغییرات هیستوپاتولوژی بافت های کبدی و کلیوی گروه های مورد مطالعه

تغییرات هیستوپاتولوژی بافت کبدی و کلیوی به ترتیب در تصاویر شماره ۳ و ۴ مشاهده می شود. همان طور که دیده می شود در موش های صحرایی شاهد مورفولوژی سلول ها طبیعی می باشیم (تصاویر ۳ و ۴-A). اما، در گروه دوم (دریافت کننده متوترکسات بدون درمان) بافت کبدی و کلیوی نسبت به بقیه، دارای ارتشاحات لنفوسیتی و پرخونی می باشند (پیکان ها در تصاویر ۳ و ۴-B). از طرف دیگر، درمان با کوئرستین در گروه سوم باعث کاهش قابل توجه ارتشاحات لنفوسیتی و پرخونی نسبت به گروه تست بدون درمان شد (تصاویر ۳ و ۴-C).

میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بدون درمان، گروه سوم موش های تست تحت درمان با کوئرستین (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و گروه چهارم موش های تست تحت درمان با سیلیمارین (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن).

#### نتایج فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتازز کلیوی و کبدی (SOD) در گروه های مورد مطالعه

در تصویر شماره ۱ (C و D) مشاهده می گردد که میانگین فعالیت آنزیم SOD کبدی و کلیوی در گروه دوم (دریافت کننده متوترکسات بدون درمان) نسبت به بقیه گروه ها دارای کاهش معنی داری ( $p < 0.05$ ) بود. میانگین فعالیت آنزیم SOD کلیوی و کبدی در گروه ۳ (تحت درمان با کوئرستین) و ۴ (تحت درمان با سیلیمارین) نسبت به گروه دوم دارای افزایش معنی داری بود ( $p < 0.05$ ), اما اختلاف معنی داری با گروه اول (شاهد) نداشت ( $p > 0.05$ ). هم چنین، میانگین فعالیت آنزیم SOD کلیوی و کبدی در گروه ۳ (تحت درمان با کوئرستین) و ۴ (تحت درمان با سیلیمارین) اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند ( $p > 0.05$ ). کوئرستین در بالا بردن فعالیت آنزیم SOD کلیوی و کبدی، اثر و قدرتی تقریباً مشابه با سیلیمارین (گروه کنترل مثبت) در دوز مورد استفاده را نشان داد.

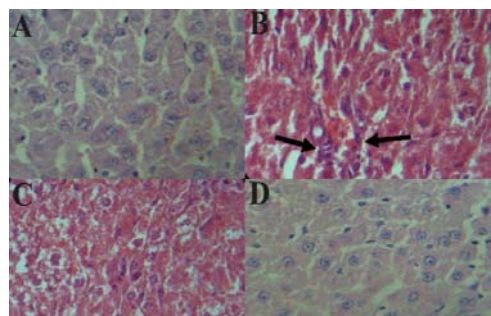
#### نتایج غلظت مالون دی آلدئید (MDA) کبدی و کلیوی در گروه های مورد مطالعه

در تصویر شماره ۲ مشاهده می گردد که میانگین MDA کبدی و کلیوی در گروه ۲ (دریافت کننده متوترکسات بدون درمان)، نسبت به سایر گروه ها به طور معنی داری ( $p < 0.05$ ) افزایش پیدا کرده است. از طرف دیگر، میانگین MDA کبدی و کلیوی در گروه ۳ (تحت درمان با کوئرستین)، نسبت به گروه ۲ کاهش معنی داری ( $p < 0.05$ ) داشت، اما نسبت به گروه ۴ (تحت درمان با سیلیمارین) اختلاف معنی داری را نشان نداد ( $p > 0.05$ ). سیلیمارین و کوئرستین تقریباً در دوزهای مورد استفاده به یک میزان در کاهش MDA کبدی و کلیوی موثر بودند.

## بحث

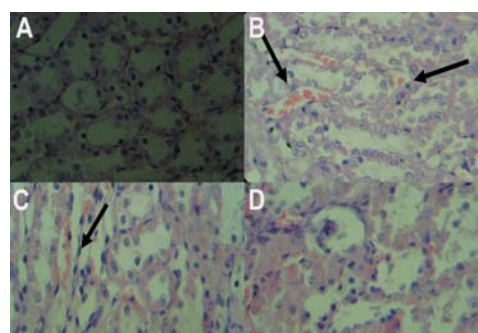
امروزه استفاده از گیاهان دارویی به عنوان یک جایگزین داروهای سنتتیک شیمیایی به طور فزاینده ای در حال گسترش است (۲۹). نتایج این مطالعه نشان داد مقادیر ALP, GPT, GOT, MDA, کبدی و کلیوی در گروه دوم (دریافت کننده متوترکسات بدون درمان)، نسبت به موش های دریافت کننده رژیم معمولی (گروه شاهد)، افزایش معنی داری را نشان می دهد که حاکی از ایجاد آسیب کبدی و کلیوی در گروه تست بدون درمان است و با نتایج گزارش شده توسط سایر محققین همخوانی دارد (۳۰، ۳۱، ۷). از طرف دیگر، تجویز کوئرستین در گروه های تست تحت درمان نشان داد که کوئرستین قادر به کاهش موثری در میزان GOT, GPT و ALP سرم و هم چنین میزان MDA سرمی و بافتی می باشد. Dalaklioglu و همکاران و هم چنین Tunali-Akbay و همکاران در مطالعات جداگانه که به بررسی اثر Resveratrol بر سمیت کبدی متوترکسات در موش پرداختند، نشان دادند متوترکسات باعث افزایش سطح سرمی GOT, GPT, ALP و پراکسیداسیون چربی می شود که ترکیب مذکور باعث بهبود این پارامترها می شود (۳۰، ۳۲) که با نتایج به دست آمده در تحقیق ما همخوانی دارد. هم چنین، مطالعات قبلی نشان داد که کوئرستین باعث بهبود فعالیت آنزیم های کبدی و پارامترهای آنتی اکسیدان و افزایش فعالیت گلوکوتایون (۳۱، ۳۳، ۳۴) می شود که با نتایج به دست آمده در این تحقیق هم خوانی دارد. Shanmugarajan و همکاران در بررسی اثر فلاونوئید کوئرستین بر آسیب اکسیداتیو کبد ناشی از آزاتیوپرین در موش ویستار نشان دادند که کوئرستین با کاهش ALT, AST و ALP دارای اثرات محافظتی بر سمیت کبدی است (۳۵) که با نتایج به دست آمده در این تحقیق همخوانی دارد. با توجه به این که کوئرستین دارای خاصیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی می باشد (۳۱)، بنابراین در تحقیق ما اثرات مثبت ایجاد شده در مهار سمیت متوترکسات

هم چنین، گروه چهارم موش های تست تحت درمان با سلیمارین به عنوان کنترل مثبت نیز کاهش قابل توجه ارتشاحات لنفوسیتی و پرخونی نسبت به گروه تست بدون درمان شد (تصاویر ۳ و ۴-D).



تصویر شماره ۳: نمای ریزینی از کبد موش های ویستار مورد آزمایش (هماتوکسیلین-ئوزین)

A- نمای ریزینی از کبد گروه شاهد سالم که ساختار آن طبیعی است.  
B- نمای ریزینی از کبد گروه تیمار با متوترکسات که در آن ارتشاحات لنفوسیتی مشخص می باشد (پیکان ها).  
C- نمای ریزینی از کبد گروه تیمار با دوز کوئرستین ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن که در آن ارتشاحات لنفوسیتی بسیار کاهش یافته بود.  
D- نمای ریزینی از کبد گروه شاهد مثبت که با سلیمارین ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن درمان شده است و کبد آن نسبتاً سالم به نظر رسیده و تغییر پاتولوژیک خاصی ندارد.



تصویر شماره ۴: نمای ریزینی از کلیه موش های ویستار مورد آزمایش (هماتوکسیلین-ئوزین)

A- نمای ریزینی از کلیه گروه شاهد سالم که ساختار آن طبیعی است.  
B- نمای ریزینی از کلیه گروه تیمار با متوترکسات که در آن ارتشاحات لنفوسیتی مشخص می باشد (پیکان ها).  
C- نمای ریزینی از کلیه گروه تیمار با دوز کوئرستین ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن که در آن ارتشاحات لنفوسیتی بسیار کاهش یافته بود (پیکان ها).  
D- نمای ریزینی از کلیه گروه شاهد مثبت که با سلیمارین ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن درمان شده است و کلیه آن نسبتاً سالم به نظر رسیده و تغییر پاتولوژیک خاصی ندارد.



های انتهایی در بافت بینابینی کلیه موش می شود (۳۷) که با نتایج به دست آمده در تحقیق ما هم خوانی دارد. با این وجود، در این تحقیق مشاهده گردید که غلظت سرمی اوره در گروه دوم (گروه تست بدون درمان) کاهش معنی داری نسبت به گروه دریافت کننده سیلیمارین (گروه چهارم)، یک آنتی اکسیدان محافظ کبدی (۲۶)، داشت که این اثر احتمالاً می تواند ناشی از آسیب بافت کبدی توسط متوترکسات و به دنبال آن کاهش سنتز اوره در سیکل اوره کبدی باشد چرا که در گروه تحت درمان با سیلیمارین، غلظت سرمی اوره تقریباً به سطح سرمی گروه شاهد نزدیک شد. به طور کلی در این رابطه می توان به مطالعات انجام گرفته بر روی کوئرستین اشاره کرد که نشان داده اند کوئرستین دارای خاصیت ضدالتهابی، آنتی اکسیدانی و محافظ کبدی و کلیوی قوی می باشد (۱۵، ۱۶، ۱۸). سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آنزیمی است که در سیتوپلاسم سلولی حضور دارد و یکی از خطوط دفاعی در برابر رادیکال های آزاد است که سبب محافظت بافت ها از رادیکال های بسیار فعال هیدروکسیل می شود (۳). در این مطالعه فعالیت SOD کبدی و کلیوی، هم چنین فعالیت کاتالاز کبدی و کلیوی در گروه بدون درمان نسبت به گروه های درمان کاهش معنی داری داشت (تصویر شماره ۱). این کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی می تواند منجر به برخی اثرات مخرب ناشی از رادیکال ها شود. با تجویز کوئرستین، فعالیت آنزیم های کاتالاز کبدی و کلیوی افزایش معنی داری را نسبت به گروه دوم (گروه تست بدون درمان) نشان داد که با مطالعات محققین دیگر همخوانی دارد، به طوری که در تحقیقات Cetinkaya و همکارانش بر روی N-استیل سیستین و در تحقیقات Cetin و همکارانش روی اثر عصاره Grape seed در برابر آسیب اکسیداتیو کبدی ناشی از متوترکسات در موش صحرايي، مشخص شد که متوترکسات با افزایش پراکسیداسیون چربی، کاهش فعالیت SOD و کاتالاز کبدی باعث آسیب اکسیداتیو

مربوط به خاصیت آنتی اکسیدانی کوئرستین است، که قادر به افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی و کاهش استرس اکسیداتیو در سلول می باشد (جدول شماره ۱ و تصاویر شماره ۱ و ۲). ظرفیت آنتی اکسیدانی پلاسما (FRAP) در گروه دوم به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است (جدول شماره ۱) ولی ظرفیت آنتی اکسیدانی پلاسما به طور معنی داری در گروه تحت درمان با کوئرستین افزایش نشان داد و در عین حال با افزایش FRAP، کاهش MDA سرمی و بافت کلیوی نیز مشاهده شد (جدول شماره ۱ و تصویر شماره ۲) که می توان آن را به وجود آنتی اکسیدان کوئرستین نسبت داد (۱۳). هم چنین، در مطالعه ای عبدالوهاب و همکاران بر روی اثر اسفناج عراقی (*Spinaciaoleracea*) بر سمیت کبدی متوترکسات در موش، نشان دادند که متوترکسات باعث افزایش MDA، ALT و کاهش گلو تاتیون می شود، که درمان با عصاره این گیاه منجر به کاهش معنی دار در MDA و ارتشاحات بافت کبد شد که این اثر مربوط به خاصیت آنتی اکسیدانی کوئرستین موجود در اسفناج عراقی می باشد (۳۶) که با نتایج هیستولوژیکی و آزمایشگاهی به دست آمده برای بافت کلیه در تحقیق ما همخوانی دارد. علاوه بر این، در تحقیق ما نتایج مطالعات هیستوپاتولوژیک کبد و کلیه همسو با یافته های بیوشیمیایی است و آن ها را تایید می کند (تصاویر شماره ۱، ۳، ۲ و ۴). در تحقیق انجام گرفته توسط ما یافته ها بیانگر وجود ارتشاحات لنفوسیتی شدید در بافت کبد و کلیه گروه تست بدون درمانی است که تنها متوترکسات دریافت کرده اند (تصاویر شماره ۳ و ۴)، اما تجویز کوئرستین سبب کاهش ارتشاحات لنفوسیتی و به طور کلی کم کردن آسیب کبدی و کلیوی شده است. Hu و همکاران در بررسی اثر کوئرستین، روتین و آلوپورینول بر سطح اسید اوریک و اختلال عملکرد کلیه ناشی از دریافت فروکتوز در موش نشان دادند که این مواد باعث کاهش اسید اوریک، اوره، کراتینین و کاهش ارتشاح سلول

آلکالین فسفاتاز، کراتینین و ترانس آمینازهای GOT و GPT سرم و از طرف دیگر باعث افزایش فعالیت کاتالاز کبدی و کلیوی، و هم‌چنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم می‌شود. بنابراین، کوئرستینمی تواند به عنوان یک ماده درمانی سودمند در جلوگیری و درمان عوارض جانبی ناشی از مصرف متوترکسات مورد توجه قرار گیرد.

### سپاسگزاری

این تحقیق مربوط به پایان‌نامه خانم الهام مرادی به شماره ثبت طرح تحقیقاتی ۷۷۱ معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد است. هم‌چنین، بدین وسیله پژوهشگران مراتب تقدیر و تشکر خود را از پرسنل محترم مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد که در اجرای این تحقیق ما را یاری نمودند، ابراز می‌دارند.

کبد می‌شود و استفاده از N-استیل سیستین و عصاره Grape seed از یک طرف با افزایش فعالیت SOD و کاتالاز و از طرف دیگر با کاهش سطح MDA باعث محافظت کبد در برابر اثرات سوء متوترکسات می‌شوند (۳۸، ۳۹) که با مطالعه انجام گرفته توسط ما، که نشان می‌دهد تجویز کوئرستین باعث افزایش فعالیت SOD، کاتالاز و از طرف دیگر باعث کاهش غلظت MDA سرمی و بافت کلیوی و نهایتاً محافظت کبد در برابر متوترکسات می‌شود، همخوانی دارد. در این مطالعه، میزان کراتینین سرم در گروه دریافت‌کننده متوترکسات، به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد، در حالی که تجویز کوئرستین باعث کاهش کراتینین سرم شد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، تجویز کوئرستین، به عنوان یک آنتی‌اکسیدان گیاهی، باعث کاهش آسیب کبدی و کلیوی ناشی از متوترکسات در موش آزمایشگاهی می‌شود، به طوری که از یک طرف باعث کاهش مالون دی‌آلدئید کبدی و کلیوی (به عنوان شاخص پراکسیداسیون چربی‌ها)،

### References

1. Jouyban A, Shaghghi M, Manzoori J, Soleymani J, Jalilvaez-Gharamaleki J. Determination of methotrexate in biological fluids and a parenteral injection using terbium-sensitized method. *Iran J Pharm Res* 2011; 10(4): 695-704.
2. Banji D, Pinnapureddy J, Banji OJ, Saidulu A, Hayath MS. Synergistic activity of curcumin with methotrexate in ameliorating Freund's Complete Adjuvant induced arthritis with reduced hepatotoxicity in experimental animals. *Eur J Pharmacol* 2011; 668(1-2): 293-298.
3. Bishnoi P, Kumari R, Thappa DM. Monitoring methotrexate hepatotoxicity in psoriasis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2011; 77(5): 545-548.
4. Çağlar Y, Özgür H, Matur I, Yenilmez ED, Tuli A, Gönülşen G, et al. Ultrastructural evaluation of the effect of N-acetylcysteine on methotrexate nephrotoxicity in rats. *Histol Histopathol* 2013; 28(7): 865-874.
5. Malekzad F, Saeedi M, Ayatollahi A. Low dose Methotrexate for the treatment of generalized lichen planus. *Iran J Dermatol* 2012; 14(58): 131-135.
6. Iqbal MP. Accumulation of methotrexate in human tissues following high-dose methotrexate therapy. *J Pak Med Assoc* 1998; 48(11): 341-343.

7. Kumar BS, Chung BC, Kwon OS, Jung BH. Discovery of common urinary biomarkers for hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride, acetaminophen and methotrexate by mass spectrometry-based metabolomics. *J Appl Toxicol* 2012; 32(7): 505-520.
8. Mohammadi-Samani S, Miri R, Salmanpour M, Khalighian N, Sotoudeh S, Erfani N. Preparation and assessment of chitosan-coated superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for controlled delivery of methotrexate. *Res Pharm Sci* 2013; 8(1): 25-33.
9. Ghaffari AR, Noshad H, Ostadi A, Ghojzadeh M, Asadi P. The effects of milk thistle on hepatic fibrosis due to methotrexate in rat. *Hepat Mon* 2011; 11(6): 464-468.
10. el-Badawi MG, Abdalla MA, Bahakim HM, Fadel RA. Nephrotoxicity of low-dose methotrexate in guinea pigs: an ultrastructural study. *Nephron* 1996; 73(3): 462-466.
11. Chen X. Protective effects of quercetin on liver injury induced by ethanol. *Pharmacogn Mag* 2010; 6(22): 135-141.
12. Duthie G, Morrice P. Antioxidant capacity of flavonoids in hepatic microsomes is not reflected by antioxidant effects in vivo. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 2012: 165127.
13. Vieira EK, Bona S, Di Naso FC, Porawski M, Tieppo J, Marroni NP. Quercetin treatment ameliorates systemic oxidative stress in cirrhotic rats. *ISRN Gastroenterol* 2011; 2011: 604071.
14. 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; 21(2): 148-155.
15. Abo-Salem OM, Abd-Ellah MF, Ghonaim MM. Hepatoprotective activity of quercetin against acrylonitrile-induced hepatotoxicity in rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2011; 25(6): 386-392.
16. 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; 25(12): 1150-60.
17. Cuevas MJ, Tieppo J, Marroni NP, Tuñón MJ, González-Gallego J. Suppression of amphiregulin/epidermal growth factor receptor signals contributes to the protective effects of quercetin in cirrhotic rats. *J Nutr* 2011; 141(7): 1299-305.
18. Del Prete A, Scalera A, Iadevaia MD, Miranda A, Zulli C, Gaeta L, et al. Herbal products: benefits, limits, and applications in chronic liver disease. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012: 837939.
19. Raygude KS, Kandhare AD, Ghosh P, Ghule AE, Bodhankar SL. Evaluation of ameliorative effect of quercetin in experimental model of alcoholic neuropathy in rats. *Inflammopharmacology* 2012; 20(6): 331-341.
20. Coballase-Urrutia E, Pedraza-Chaverri J, Cárdenas-Rodríguez N, Huerta-Gertrudis B, García-Cruz ME, Montesinos-Correa H, et al. Acetonic and Methanolic Extracts of *Heterotheca inuloides*, and Quercetin, Decrease CCl<sub>4</sub>-Oxidative Stress in Several Rat Tissues. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013: 659165.
21. Kose E, Sapmaz HI, Sarihan E, Vardi N, Turkoz Y, Ekinci N. Beneficial effects of montelukast against methotrexate-induced liver toxicity: a biochemical and histological study. *Scientific World Journal* 2012; 2012: 987508.
22. Luangaram S, Kukongviriyapan U, Pakdeechote

- 
- P, Kukongviriyapan V, Pannangpetch P. Protective effects of quercetin against phenylhydrazine-induced vascular dysfunction and oxidative stress in rats. *Food Chem Toxicol* 2007; 45(3): 448-455.
23. Heidarian E, Rafieian-Kopaei M. Effect of silymarin on liver phosphatidate phosphohydrolase in hyperlipidemic rats. *Biosci Res* 2012; 9(2): 59-67.
24. Heidarian E, Soofiniya Y. Hypolipidemic and hypoglycemic effects of aerial part of *Cynara scolymus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Plant Res* 2011; 5(13): 2717-2723.
25. Heidarian E, Movahed-Mohammadi G, Saffari J, Ghatreh-Samani K. Protective Effect of Hydroethanolic Extract of Cress against Hepatotoxicity due to Acetaminophen in Rats. *J Mazand Univ Med Sci* 2013; 23(102): 73-84 (Persian).
26. Heidarian E, Saffari J, Jafari-Dehkordi E. Hepatoprotective action of *Echinophora platyloba* DC leaves against acute toxicity of acetaminophen in rats. *J Diet Suppl* 2014; 11(1): 53-63.
27. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
28. Heidarian E, Rafieian-Kopaei M. Protective effect of artichoke (*Cynara scolymus*) leaf extract against lead toxicity in rat. *Pharm Biol* 2013; 51(9): 1104-1109.
29. Rezaei A, Heidarian E. Co-administration of trientine and flaxseed oil on oxidative stress, serum lipids and heart structure in diabetic rats. *Indian J Exp Biol* 2013; 51(8): 646-652.
30. Dalaklioglu S, Genc GE, Aksoy NH, Akcıt F, Gumuslu S. Resveratrol ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid peroxidation. *Hum Exp Toxicol* 2013; 32(6): 662-671.
31. Hadi NR, Al-Amran FG, Swadi A. Metformin ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity. *J Pharmacol Pharmacother* 2012; 3(3): 248-253.
32. Tunali-Akbay T, Sehirli O, Ercan F, Sener G. Resveratrol protects against methotrexate-induced hepatic injury in rats. *J Pharm Pharm Sci* 2010; 13(2): 303-310.
33. Faddah LM, Abdel Baky NA, Al-Rasheed NM, Al-Rasheed NM, Fatani AJ, Atteya M. Role of quercetin and arginine in ameliorating nano zinc oxide-induced nephrotoxicity in rats. *BMC Complement Altern Med* 2012; 12: 60.
34. Wang G, Zhang J, Liu L, Sharma S, Dong Q. Quercetin potentiates doxorubicin mediated antitumor effects against liver cancer through p53/Bcl-xl. 2012; 7(12): e51764.
35. Shanmugarajan TS, Prithwish N, Somasundaram I, Arunsundar M, Niladri M, Lavande JP, et al. Mitigation of azathioprine-induced oxidative hepatic injury by the flavonoid quercetin in wistar rats. *Toxicol Mech Methods* 2008; 18(8): 653-660.
36. Wahab FK, Abdul-Jalil Th Z. Study of Iraqi spinach leaves (Phytochemical and protective effects against methotrexate-induced hepatotoxicity in rats). *Iraqi J Pharm Sci* 2012; 21(2):8-17.
37. Hu QH, Wang C, Li JM, Zhang DM, Kong LD. Allopurinol, rutin, and quercetin attenuate hyperuricemia and renal dysfunction in rats induced by fructose intake:renal organic ion transporter involvement. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297(4): F1080-1091.

38. Cetin A, Kaynar L, Kocyigit I, Hacıoglu SK, Saraymen R, Ozturk A, et al. Role of grape seed extract on methotrexate induced oxidative stress in rat liver. *Am J Chin Med* 2008; 36(5): 861-72.
39. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Kantarceken B. N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Med Sci Monit* 2006; 12(8): BR274-278.