Preventive effect of novel nanomicelle of silymarin on liver injury induced by carbon tetrachloride in rat

Yasaman Safian Isfahani[1], Abolfazl Aslani[2], Mohammad Reza Memarzadeh[3], Mohammad Hosein Aarabi[4]

1. MSc Student, Department of Clinical Biochemistry, School of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. ORCID ID: 0000-0003-2563-4408

2. Associate Professor, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy and Novel Drug Delivery Systems Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. ORCID ID: 0000-0002-3290-6806

3. PhD of Analytical chemistry, Barij Essence Medicinal Plants Research Center, Kashan, Iran. ORCID ID: 0000-0001-5965-9182

4. Associate Professor, Department of clinical Biochemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran., (Corresponding Author), Tel: 031-37927052, E-mail: mh.aarabi@pharm.mui.ac.ir, ORCID ID: 0000-0001-5377-178X

ABSTRACT

Background and Aim: Silymarin is used for the treatment of liver disease due to its hepatoprotective effects. however, the use of its extract is limited due to poor aqueous solubility and low bioavailability. This study aimed to prepare a new formulation of silymarin and to evaluate its hepatoprotective effect after liver injury induced by carbon tetrachloride in rats.

Materials and Methods: In an experimental study, a new form of silymarin was prepared. A total number of 24 rats were divided into 4 groups. The two treatment groups were administered with silymarin extract and silymarin nanomicelle for 14 days before being damaged by CCl4. At the end of the study, blood samples were collected to determine serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and, lipid profile. Moreover, antioxidant and oxidative stress enzyme activities were assessed in hepatic tissue. A one-way ANOVA test was used for statistical analysis.

Results: The activity of ALT and AST liver enzymes and the level of lipid profile parameters were significantly decreased in nanomicelle treated group compared to the silymarin-treated group ($P<0.05$). Also, the activity of liver antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in the nanomicelle treated group showed a significant increase compared to the silymarin extract ($P<0.05$). The level of the Liver MDA was significantly decreased in the nanomicelle group compared to the silymarin extract ($P<0.05$).

Conclusion: The results of this study showed that silymarin nanomicelle has better hepatoprotective effects in ameliorating CCl_4 toxicity in rats compared with extract of silymarin.

Keywords: Silymarin, Oxidative Stress, Superoxide Dismutase, Hepatotoxicity, Nitric Oxide

Received: Dec 3, 2019 **Accepted:** Nov 20, 2020

How to cite the article: Yasaman Safian Isfahani Abolfazl Aslani, Mohammad Reza Memarzadeh, Mohammad Hosein Aarabi. Preventive Effect of Novel Nanomicelle of Silymarin on Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride in Rat. SJKU. 2021;26(2):1-11.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

بررسی اثر محافظتی نانومیسل جدید سیلیمارین بر آسیب کبدی القاء شده با کربن تتراکلراید در موش صحرایی

یاسمن صافیان اصفهانی[۱]، ابوالفضل اصلانی[۲]، محمدرضا معمار زاده[۳]، محمدحسین اعرابی[۴]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۲۵۶۳-۴۴۰۸

۲. دانشیار گروه فاماسیوتیکس، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، مرکز تحقیقات سیستم‌های نوین دارو رسانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۳۲۹۰-۶۸۰۶

۳. دکتری شیمی تجزیه، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی شرکت داروسازی باریج اسانس، کاشان، ایران.کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۵۹۶۵-۹۱۸۲

۴. دانشیار گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران (نویسنده مسئول)، پست الکترونیک: mh.aarabi@pharm.mui.ac.ir، تلفن ثابت: ۰۳۱-۳۷۹۲۷۲۵۲، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۵۳۷۷-۱۷۸X

چکیده

زمینه و هدف: سیلیمارین به دلیل اثرات حفاظت کبدی در درمان اختلالات کبدی استفاده می‌شود؛ اما استفاده از عصاره آن به دلیل حلالیت کم در محیط آبی و فراهمی زیستی پایین محدود شده است. هدف از این مطالعه تهیه فرم جدیدی از نانومیسل سیلیمارین و بررسی اثر محافظتی آن بر آسیب کبدی القاء شده با کربن تتراکلراید در موش صحرایی می‌باشد

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه تجربی، ابتدا فرم جدید سیلیمارین به شکل نانومیسل تهیه شد. تعداد ۲۴ سر موش صحرایی به چهار گروه تقسیم شدند. دو گروه درمانی به مدت ۱۴ روز و قبل از ایجاد آسیب با CCL_4 با عصاره سیلیمارین و نانومیسل سیلیمارین تیمار گردیدند. در پایان مطالعه، نمونه‌های خون جهت تعیین سطح سرمی آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلکالن فسفاتاز (ALP) و پروفایل لیپیدی جمع‌آوری شد. همچنین، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و استرس اکسیداتیو در بافت کبد بررسی شد. نتایج با آزمون ANOVA یکطرفه آنالیز شد.

یافته‌ها: فعالیت آنزیم‌های کبدی ALT، AST و پارامترهای پروفایل لیپیدی در گروه تیمار شده با نانومیسل نسبت به گروه تیمار شده با عصاره سیلیمارین به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<۰/۰۵$). همچنین فعالیت بافت کبدی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیددیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) در گروه تیمارشده با نانومیسل سیلیمارین نسبت به عصاره سیلیمارین افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P<۰/۰۵$). میزان مالون دی آلدئید (MDA) بافت کبدی در گروه تیمار شده با نانومیسل نسبت به عصاره سیلیمارین کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج در این مطالعه نشان داد، نانومیسل سیلیمارین دارای اثرات حفاظت کبدی بهتری نسبت به عصاره سیلیمارین در تعدیل اثرات سمیت القاشده با CCL_4 در موش‌ها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سیلیمارین، استرس اکسیداتیو، سوپراکسیددیسموتاز، سمیت کبدی، نیتریک اکساید

وصول مقاله: ۹۸/۹/۱۲ اصلاحیه نهایی:۹۹/۸/۶ پذیرش: ۹۹/۸/۳۰

مقدمه

کبد یکی از مهم‌ترین اعضای بدن است که مرکز واکنش‌های بیوشیمیایی ضروری و محل متابولیسم داروهاست و نقش مهمی را در سم‌زدائی و دفع زنوبیوتیک-های متعدد و انواع داروها دارد؛ بنابراین آسیب یا تخریب کبد پیامدهای شدیدی را در سلامت فرد مبتلا ایجاد می‌کند(۱). این آسیب‌ها به علل مختلفی ازجمله استفاده‌ی مداوم از الکل، هپاتیت‌های ویروسی، بیماری‌های متابولیک ارثی، سموم محیطی، استفاده‌ی نادرست دارویی و...ایجاد می‌گردد که نهایتاً منجر به بیماری‌های کبدی متفاوتی ازجمله هپاتیت، فیبروز، سیروز، نکروز، سرطان‌های کبدی و... می‌شود(۲). امروزه مطالعه و درمان اختلالات کبدی توسط گیاهان و ترکیبات گیاهی با توجه به امکان دسترسی بیشتر و عوارض جانبی کمتر نسبت به درمان‌های دارویی موردتوجه بیشتری قرارگرفته است(۳). ازجمله این ترکیبات گیاهی، پلی فنول‌ها هستند که به وفور در گیاهان مختلف یافت می‌شوند و به نظر می‌رسد نقش عمده‌ای در حفاظت گیاهان از آسیب‌های محیطی مانند اشعه فرابنفش خورشید یا حمله پاتوژن های گیاهی دارند و همچنین با جذب رادیکال‌های آزاد نقش بسیار مهمی در سلامت انسان‌ها ایفا می‌نماید(۴, ۵). سیلیمارین یکی از ترکیبات پلی فنول است که اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی آن مدت‌هاست موردتوجه و بررسی قرارگرفته است و به‌خوبی می‌تواند به‌عنوان یک مهارکننده‌ی رادیکال آزاد و متعاقب آن مهار پراکسیداسیون لیپید ها عمل کند. علاوه بر این،سیلیمارین ورود مواد سمی مانند آفت‌کش‌ها، فلزات سنگین و CCl_4 به سلول‌های کبدی را متوقف می‌کند؛ بنابراین از آن‌ها در برابر آسیب‌های بعدی محافظت می‌کند(۶).

بااین‌حال، سیلیمارین به علت ساختار به‌شدت آب‌گریز و غیر یونی در آب نامحلول است و تنها ۲۰ تا ۵۰ درصد از سیلیمارین خوراکی از دستگاه گوارش جذب می‌شود؛ بنابراین اثر خوراکی سیلیمارین بر عملکرد کبد به علت محلولیت ضعیف، فراهمی زیستی پایین، تخریب جزئی آن در مایع معده، جذب کم آن در روده و کوتاه بودن نیمه‌عمر خود فلاونوئیدها، باعث کاهش غلظت خونی سیلیمارین و متعاقب آن، کاهش غلظت آن در رسیدن به اندام هدف می‌شود و همین امر باعث محدود شدن استفاده از آن شده است(۱). وجود این محدودیت، موجب انجام تحقیقات گسترده‌ای جهت افزایش محلولیت، فراهمی زیستی و جذب آن گردیده است. نتیجه این پژوهش‌ها منجر به طراحی و تهیه انواع فرمولاسیون برای سیلیمارین گردیده است که از آن جمله می‌توان به کمپلکس‌های فسفولیپیدی، نانوامولسیونی و نانومیسل‌ها اشاره کرد(۸, ۷, ۳). اما تقریبا تمام این روش‌ها پیچیده و پرهزینه می‌باشند. هدف ما در این مطالعه، برای اولین بار، تهیه فرم ساده، کم‌هزینه و جدیدی از سیلیمارین به شکل نانومیسل با قابلیت انحلال و جذب بیشتر می باشد. علاوه بر این اثرات این فرم جدید نسبت به عصاره سیلیمارین بر خاصیت حفاظتی سلول‌های کبدی در برابر سمیت CCl_4، مورد بررسی و مقایسه قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، عصاره سیلیمارین از شرکت سیگما آلدریچ (Sigma Aldrich) و مواد دیگر مثل پلی‌اتیلن گلیکول ۴۰۰، پلی‌پروپیلن گلیکول، توئین ۸۰ (TWEEN80) و گلیسیرین از شرکت Merck آلمان تهیه شد. به‌منظور رسیدن به بهترین فرمولاسیون جهت تشکیل یک نانومیسل پایدار نسبت‌های مختلفی از امولسیفایرها و حلال‌ها همراه با عصاره سیلیمارین ترکیب شدند (نتایج منتشر نشده است). نانومیسل سیلیمارین New (NFSM) Form of Sylimarinبا استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول ۴۰۰ به‌عنوان حلال و توئین ۸۰ به‌عنوان امولسیفایر با روش‌های ساده‌ی انحلال تهیه شد. در مرحله بعد برخی پارامترهای دارویی لازم برای نانومیسل، مانند اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات(Polydispersity index (PDI، با استفاده از تکنیک(Dynamic light scattering (DLS، میزان محصورسازی(Entrapment Efficiency (EE% و میزان

آزادسازی سیلیمارین (In Vitro Release) در نانومیسل، مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. پس از تهیه و تائید نانومیسل، کار حیوانی بر اساس مطالعه قبلی(۲)، با استفاده از ۲۴ سر موش صحرایی نر بالغ، از نژاد Wistar، با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ که از مرکز پرورش حیوانات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تهیه شدند، آغاز گردید. همه موش‌ها در قفسه‌های پلی‌اتیلنی در شرایط آزمایشگاهی و استاندارد از نظر دما، روشنایی و رطوبت نگهداری شدند. اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مطابق با دستورات کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اصفهان رعایت شد. این حیوانات به صورت تصادفی به چهار گروه کنترل نرمال (NC)، کنترل سمی (CC)و دو گروه درمانی با عصاره سیلیمارین (SM+CMC) و نانومیسل (NFSM) تقسیم شدند. گروه کنترل نرمال: آب و غذای معمول دریافت کردند. گروه کنترل سمی: روزانه به مدت ۱۴ روز یک میلی‌لیتر، محلول ۰/۵٪ کربوکسی متیل سلولز (CMC) دریافت کردند، به دو گروه درمانی: روزانه به مدت ۱۴ روز، یک میلی‌لیتر محلول mg/kg ۱۰۰ سیلیمارین (SM) حل‌شده در ۰/۵٪ کربوکسی متیل سلولز (CMC) و یک میلی‌لیتر نانومیسل (NFSM)، به‌صورت خوراکی داده شد. بر اساس مطالعات قبلی دوز مناسب برای سیلمیارین انتخاب شد(۹, ۱). در روز پانزدهم به جز گروه کنترل نرمال، به بقیه موش‌ها ml/kg ۱/۵ محلول CCl_4 حل شده به نسبت مساوی با روغن زیتون، به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد و به گروه کنترل نرمال، ۱/۵میلی لیتر روغن زیتون به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید. بیست‌وچهار ساعت پس از تزریق CCl_4، موش‌ها با تزریق داخل صفاقی کتامین_زایلازین (به ترتیب ۱۰۰ و ۱۰ میلی‌گرم برکیلوگرم) بی‌هوش شده و سپس خون‌گیری انجام شد. پس از جداسازی سرم، نمونه‌های سرم در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد جهت ارزیابی آنزیم‌های کبدی مانند آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلکالن فسفاتاز (ALP)، کلسترول تام (TC)، تری گلیسیرید (TG) و آلبومین (ALB) با استفاده از کیت‌های تجاری بر اساس روش‌های آنزیماتیک و رنگ سنجی ذخیره گردید. با استفاده از وسایل جراحی، کبد موش‌ها خارج گردید و سپس با سرم فیزیولوژی به خوبی شست‌وشو داده و سپس هموژنایز شد و مایع رویی جهت اندازه‌گیری پارامترهای آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسید دیس موتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) و میزان نیتریک اکساید (NO) در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید. اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدهید (MDA) با استفاده از تیوباربیتوریک اسید (TBA) و اندازه‌گیری جذب کمپلکس TBA-MDA با اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر قرائت گردید. تمام داده‌های مربوط به تأثیر نانومیسل و عصاره سیلیمارین بر پارامترهای بیوشیمیایی سرم و فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی و استرس اکسیداتیو بافت کبد کمی بوده و جهت نرمال‌بودن داده‌ها از آزمون Kolmogorov-Smirnov استفاده شد. سپس با استفاده از آزمون آنالیز ANOVA و نرم‌افزار ۱۸ SPSS داده‌ها مورد آنالیز قرار گرفت. برای مقایسه‌ی دوبه‌دوی گروه‌ها از پس‌آزمون Tukey استفاده گردید. سطح معنی‌دار جهت تفسیر نتایج $P<0/05$ در نظر گرفته شد.

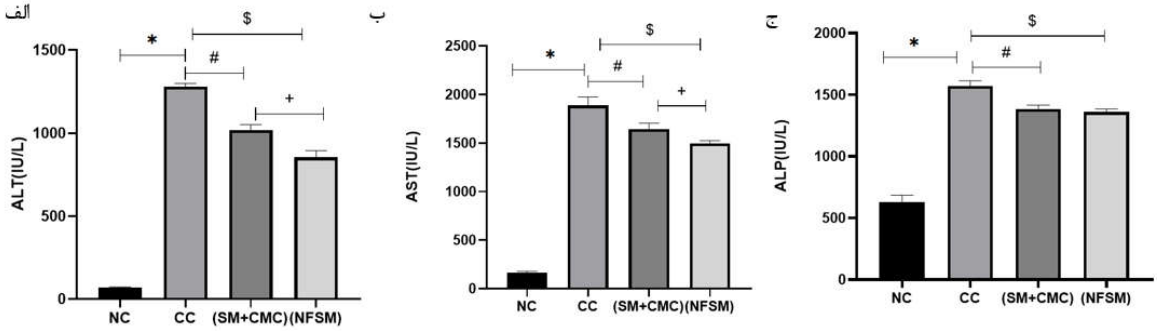
یافته‌ها

۱- تهیه و ارزیابی نانومیسل:

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از تکنیک DLS، محلول نانومیسل، با مشخصات: اندازه ذرات تقریباً nm ۲۲۷/۵، توزیع اندازه ذرات PDI<۰/۱ و پتانسیل زتای (Zeta potential)محلول برابر ۱/۶۵- (نشان‌دهنده تشکیل نانو ذرات مناسب و هموژن است) تهیه گردید. میزان محصورسازی سیلیمارین (EE%) برابر با ۸۵٪ و آزادسازی سیلیمارین در محلول نانومیسل در طی ۴۸ ساعت برابر ۷۲٪ است.

۲- اثر محلول خوراکی جدید و عصاره سیلیمارین بر پارامترهای بیوشیمیایی سرم:

نتایج حاصل از این مطالعه در مورد آنزیم‌های کبدی نشان داد که تزریق CCl۴ می‌تواند سطح سرمی آنزیم‌های AST,ALT,ALP را در مقایسه با گروه نرمال به‌صورت قابل‌ملاحظه‌ای افزایش دهد (P<۰/۰۰۱)؛ بنابراین تزریق داخل صفاقی CCl۴ به‌صورت تک‌دوز توانست به‌طور موفقیت‌آمیزی سمیت موردنظر را در سلول‌های کبدی حیوانات مورد آزمایش القا کند (نمودار ۱- الف، ب، ج). با توجه به نمودار ۱، سطح سرمی سه آنزیم کبدی، در هر دو گروه درمانی (عصاره سیلیمارین و نانومیسل) نسبت به گروه کنترل سمی کاهش قابل‌توجهی داشت که این کاهش با P<۰/۰۵ معنی‌دار تلقی می‌شود. همان‌طور که در نمودار ۱ مشخص است، نانومیسل سیلیمارین اثر بهبودی بیشتری را نسبت به عصاره سیلیمارین در فعالیت سرمی آنزیم ALT و ASTنشان می‌دهد که به ترتیب با P<۰/۰۰۰۱ و P< ۰/۰۰۱ معنی دار محسوب می‌شود. یافته دیگر در این نمودار این بود که فعالیت سرمی آنزیم ALP در نانومیسل نسبت به عصاره سیلیمارین با P>۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری ندارد (نمودار ۱، ج).



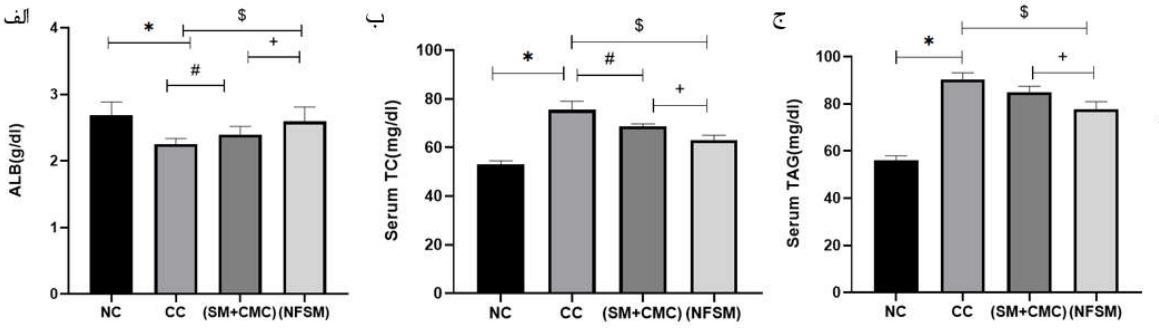
نمودار ۱. اثر نانومیسل خوراکی در مقایسه با عصاره سیلیمارین بر آنزیم‌های کبدی (الف) آنزیم ALT، (ب) آنزیم AST، (ج) آنزیم ALP.

نتایج بر اساس Mean±SD نمایش داده‌شده‌اند. (*) نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی دار بین گروه کنترل سمی با گروه کنترل نرمال، (#) نشان‌دهنده تفاوت معنی دار بین گروه کنترل سمی و گروه درمانی با عصاره سیلیمارین، ($) نشان دهنده تفاوت معنی دار بین گروه کنترل سمی و گروه درمانی با نانومیسل و (+) تفاوت معنی دار بین دو گروه درمانی را نشان می دهد.

همان‌طور که در نمودار ۲ (الف) ملاحظه می‌گردد، تزریق CCl۴ باعث کاهش معنی‌داری در مقدار سنتز آلبومین گردید (P<۰/۰۰۱)؛ اما در گروه‌درمانی با عصاره سیلیمارین، میزان افزایش آلبومین نسبت به گروه کنترل سمی تغییر محسوسی مشاهده نشد (P>۰/۰۵). یافته مهم دیگر این بود که تجویز نانومیسل سیلیمارین (NFSM) به‌طور معنی‌داری موجب افزایش آلبومین سرم نسبت به گروه کنترل سمی گردید (P<۰/۰۵). با این وجود دو گروه درمانی در افزایش میزان آلبومین تفاوت معنی دار باهم نشان ندادند (P>۰/۰۵). با توجه به نمودار ۲_ (ب)، ایجاد سمیت، موجب افزایش معنی‌داری در میزان کلسترول توتال در گروه کنترل سمی نسبت به کنترل نرمال با (P<۰/۰۰۱) گردید. چهارده روز پیش درمانی با NFSM و عصاره سیلیمارین باعث کاهش کلسترول نسبت به گروه کنترل سمی گردید که با (P<۰/۰۰۱) در گروه عصاره سیلیمارین و با P<۰/۰۰۰۱ در گروه (NFSM) معنی‌دار تلقی می‌شود. طبق نمودار ۲_(ب)، پیش درمانی با نانومیسل نسبت به عصاره سیلیمارین به‌طور مؤثرتری موجب کاهش کلسترول گردید (P<۰/۰۱)

.در نمودار ۲- (ج) میزان سطح تری گلیسیرید سرمی در گروه کنترل سمی نسبت به گروه کنترل نرمال افزایش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۰۱). چهارده روز تیمار با

عصاره سیلیمارین تغییر محسوسی در کاهش میزان تری گلیسیرید ایجاد نکرد (P>۰/۰۵)؛ اما تیمار با NFSM باعث کاهش معنی‌دار در میزان تری گلیسیرید نسبت به گروه کنترل سمی گردید (P<۰/۰۰۱). علاوه بر این NFSM نسبت به عصاره سیلیمارین به‌طور مؤثرتری تری گلیسیرید را با P<۰/۰۵ کاهش داد.

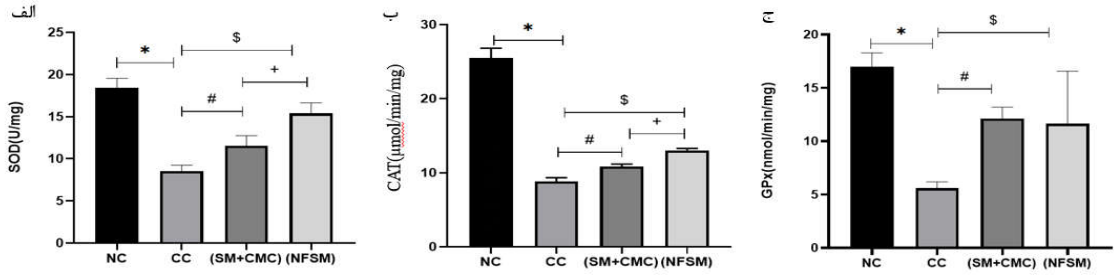


نمودار ۲. اثر نانومیسل خوراکی در مقایسه با عصاره سیلیمارین بر پارامترهای بیوشیمیایی (الف) آلبومین، (ب) کلسترول توتال، (ج) تری گلیسیرید.

نتایج بر اساس Mean±SD نمایش داده‌شده‌اند. (*) نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی دار بین گروه کنترل سمی با گروه کنترل نرمال، (#) نشان‌دهنده تفاوت معنی دار بین گروه کنترل سمی و گروه درمانی با عصاره سیلیمارین، ($) نشان‌دهنده تفاوت معنی دار بین گروه کنترل سمی و گروه درمانی با نانومیسل و (+) تفاوت معنی دار بین دو گروه درمانی را نشان می دهد.

۳- اثر محلول خوراکی جدید و عصاره سیلیمارین بر پارامترهای استرس اکسیداتیو:

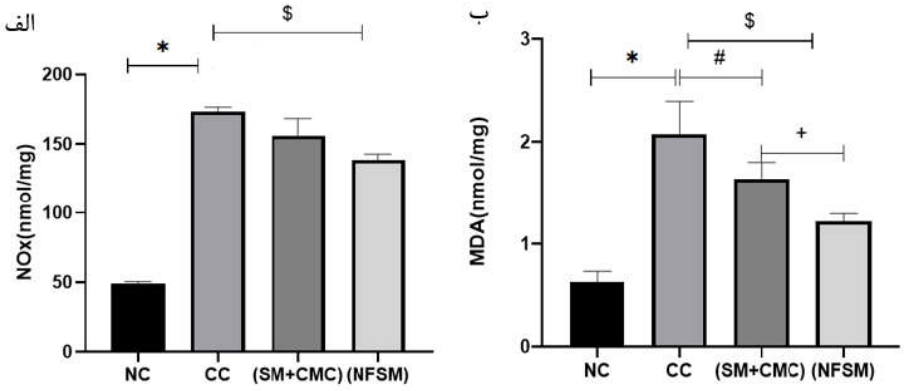
در این مطالعه کاهش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نشان‌دهنده‌ی آسیب شدید به سلول توسط CCl۴ است که این اثر با P<۰/۰۰۰۱ در آنزیم SOD و CAT و ۰/۰۰۱ >P در آنزیم GPx نسبت به گروه نرمال قابل‌توجه است. همان‌طور که در نمودار ۳ ملاحظه می‌شود عصاره سیلیمارین و NFSM باعث افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAT و GPx نسبت به گروه CCl۴ گردید. نانومیسل سیلیمارین در مقایسه با عصاره آن باعث افزایش بیشتری در سطح آنزیم‌های SOD و CAT گردید که با P<۰/۰۵ این افزایش معنی‌دار تلقی می‌گردد؛ ولی در دو گروه درمانی فعالیت آنزیم GPx تفاوت معنی‌داری یافت نشد (P>۰/۰۵).



نمودار ۳. اثر نانومیسل خوراکی در مقایسه با عصاره سیلیمارین بر پارامترهای آنتی‌اکسیدانی (الف)SOD، (ب) CAT، (ج)GPx.

نتایج بر اساس Mean±SD نمایش داده‌شده‌اند. (*) نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل سمی با گروه کنترل نرمال، (#) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل سمی و گروه‌درمانی با عصاره سیلیمارین، ($) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل سمی با گروه‌درمانی نانومیسل و (+) تفاوت معنی‌دار بین دو گروه‌درمانی را نشان می‌دهد.

همان‌طور که در نمودار ۴ (الف) ملاحظه می‌گردد، محتوای NOx سلول‌های کبدی در گروه CCl۴ در مقایسه با گروه نرمال افزایش‌یافته است (P< ۰/۰۰۰۱). پیش درمانی با عصاره سیلیمارین تغییر محسوسی در میزان محتوای NO ایجاد نکرد (P>۰/۰۵). نانومیسل سیلیمارین بعد از تزریق CCl۴ توانست محتوای NOx افزایش‌یافته در سمیت ایجادشده با CCl۴ را متعادل کند (P<۰/۰۰۱)؛ ولی این کاهش در نانومیسل نسبت به عصاره سیلیمارین با P>۰/۰۵ معنی‌دار نیست؛ بنابراین تفاوت قابل‌توجهی بین دو گروه درمانی وجود ندارد. تجویز تک‌دوز CCl۴ به موش‌ها، با ایجاد رادیکال‌های آزاد و شروع پر اکسیداسیون لیپیدی باعث افزایش قابل‌توجهی در سطح MDA در مقایسه با گروه کنترل نرمال گردید (P<۰/۰۰۰۱). با توجه به نمودار ۴-(ب) تجویز عصاره سیلیمارین و نانومیسل سیلیمارین به‌صورت پیش درمانی، سطح MDA را در مقایسه با گروه CCl۴ به‌طور معنی‌داری کاهش دادند (به ترتیب P<۰/۰۵ و P<۰/۰۰۱). نانومیسل سیلیمارین در مقایسه با عصاره سیلیمارین به‌طور مؤثرتری میزان MDA تولیدشده را کاهش داد که با P<۰/۰۵ معنی‌دار محسوب می‌شود.



نمودار ۴. اثر نانومیسل خوراکی در مقایسه با عصاره سیلیمارین بر پارامترهای استرس اکسیداتیو(الف)NOx، (ب) MDA.

نتایج بر اساس Mean±SD نمایش داده‌شده‌اند. (*) نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل سمی با گروه کنترل نرمال، (#) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل سمی و گروه‌درمانی با عصاره سیلیمارین، ($) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل سمی و گروه درمانی با نانومیسل و (+) تفاوت معنی دار بین دو گروه درمانی را نشان می دهد.

بحث

سیلیمارین یک پلی فنول گیاهی است که به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی در درمان اختلالات کبدی استفاده می‌شود. بااین‌حال، سیلیمارین در آب نامحلول است که عمدتاً به دلیل ساختار شدید هیدروفوبی و غیر یونی آن است. این محدودیت میزان تأثیر سیلیمارین بر عملکرد کبد را کاهش می‌دهد. برای غلبه بر این مشکل، با تهیه فرمولاسیون‌های مختلف محلولیت و زیست فراهمی سیلیمارین را افزایش می دهند. در این مطالعه، فرم ساده، پایدار، کم‌هزینه و جدیدی از سیلیمارین (NFSM) به شکل نانومیسل با قابلیت انحلال

و جذب بیشتر تهیه شد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه مشاهده شد که پس از تیمار موش‌های صحرایی به مدت ۱۴ روز و سپس ایجاد سمیت با CCl_4، نانومیسل سیلیمارین در مقایسه با عصاره آن به‌طور مؤثری موجب افزایش حفاظت کبدی در برابر سمیت CCl_4 می‌گردد.

در مطالعه حاضر، سطح سرمی سه آنزیم کبدی، در هر دو گروه درمانی (عصاره سیلیمارین و نانومیسل) نسبت به گروه کنترل سمی (گروه تیمار نشده) کاهش قابل‌توجهی داشتند که این کاهش با $P<۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی می‌شود که نشان می‌دهد تجویز خوراکی عصاره سیلیمارین و نانومیسل سیلیمارین باعث حفاظت هپاتوسیت‌ها در برابر سمیت CCl_4 و بازگشت سلول‌ها به سمت نرمال شدن می‌شود. همان‌طور که از داده‌ها مشخص است، نانومیسل سیلیمارین اثر بهبودی بیشتری را نسبت به عصاره سیلیمارین در آنزیم ALT و AST نشان می‌دهد که می‌تواند حاکی از افزایش محلولیت و اثربخشی این نانومیسل نسبت به عصاره سیلیمارین باشد. این یافته با مطالعات صورت گرفته قبلی هم‌راستا است(۱۱, ۱۰). در مطالعه‌ای که توسط Parveen و همکاران (۲۰۱۱) بر روی نانو امولسیونی حاوی سیلیمارین انجام گرفت، پس از تیمار رت ها به مدت ۵ روز و تزریق CCl_4 در روز دوم و سوم، آنزیم‌های کبدی سرم اندازه‌گیری شد. نتایج کاهش معنی‌داری در میزان این پارامترها نشان داد(۱۲). در مطالعه‌ای دیگر، میزان آنزیم‌های کبدی پس از سه روز تیمار با نانو امولسیونی از سیلیمارین و سپس ایجاد سمیت در موش‌ها مورد اندازه‌گیری قرار گرفت(۱۰). نتایج نشان داد میزان آنزیم‌های کبدی پس از تیمار با نانو امولسیون نسبت به گروه سیلیمارین کاهش معنی‌داری دارد.

کبد جایگاه اصلی سنتز پروتئین‌ها به‌خصوص آلبومین است. در این مطالعه آلبومین به‌عنوان پارامتر ارزیابی عملکرد سنتزی کبد در نظر گرفته شده است. در مطالعه‌ای که به بررسی مقایسه‌ای حفاظت کبدی سیلیمارین با ترکیب TPE (عصاره Tanacetum Parthenium) در مقایسه با عصاره سیلیمارین در سال ۲۰۱۷ پرداخت(۱۱)، پس از تیمار موش‌ها به مدت ۱۴ روز و تزریق CCl_4 در روز پانزدهم، میزان آلبومین سرم اندازه‌گیری شد؛ که در گروه تیمار شده با سیلیمارین افزایش مقدار آلبومین نسبت به گروه کنترل سمی نشان داده شد؛ اما در مطالعه حاضر، میزان سطح آلبومین در گروه تیمار با عصاره سیلیمارین تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه CCl_4 یافت نشد($P>۰/۰۵$). عدم‌تغییر در میزان آلبومین در گروه تیمار با عصاره سیلیمارین می‌تواند به دلیل جذب روده‌ای ناکافی سیلیمارین و درنتیجه غلظت پایین آن در خون است؛ که قادر به تحریک افزایش بیان ژن ALB نیست. با این وجود یافته مهم این مطالعه این بود که درمان با NFSM باعث ممانعت از کاهش مقدار آلبومین نسبت به گروه کنترل سمی گردید که این امر می‌تواند به دلیل افزایش محلولیت و جذب بیشتر NFSM و درنتیجه تأثیر بیشتر بر سلول‌های کبدی از طریق استحکام بخشیدن به شبکه آندوپلاسمی و سنتز دوباره پروتئین و یا از طریق خنثی کردن ROS به‌وسیله این محلول باشد(۱۳). اگرچه مقدار افزایش سنتز آلبومین در دو گروه تیمار تفاوت قابل محسوسی را نشان نمی‌دهد ($P>۰/۰۵$).

همان‌طور که در نمودار ۲- (ب) و (ج) ملاحظه می‌شود، تزریق CCl_4 باعث افزایش قابل‌توجه در TG و TC می‌شود. افزایش سطح کلسترول بعد از تزریق CCl_4 می‌تواند ناشی از افزایش استری‌شدن اسیدهای چرب، ممانعت از بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب و کاهش خروج و دفع لیپیدهای سلولی باشد(۱۴). در یک مطالعه نشان داده شده است که سیلیمارین با مهار آنزیم ۳-هیدروکسی۳-متیل گلوتاریل کوآنزیم آردوکتاز، آنزیم کلیدی در سنتز کلسترول، تأثیر مستقیم خود را بر سنتز کلسترول در سلول‌های کبدی اعمال می‌نماید(۱۵). در مطالعه‌ای، پیش درمانی با سیلیمارین به مدت ۱۴ روز و سپس ایجاد سمیت با CCl_4، باعث کاهش کلسترول و تری گلیسرید با $P<۰/۰۰۱$ گردید(۱۱). در مطالعه حاضر، چهارده روز تیمار با نانومیسل سیلیمارین باعث کاهش کلسترول و تری

گلیسیرید نسبت به گروه CCl_4 شد. علاوه بر این نانومیسل نسبت به عصاره سیلیمارین به‌طور مؤثرتری میزان سرمی پارامترهای لیپیدی را با $P<0/05$ کاهش داد. نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش هم‌راستا با مطالعات قبلی می‌باشد(۱۶, ۱۵). این امر می‌تواند به‌علت افزایش محلولیت؛ و متعاقب آن، افزایش جذب روده‌ای نانومیسل نسبت به عصاره سیلیمارین باشد. بنابراین، تجویز نانومیسل سیلیمارین (NFSM) به‌صورت پیش درمانی قبل از تزریق CCl_4 به‌طور مؤثرتری می‌تواند میزان پروفایل لیپیدی را متعادل کند.

بدن به‌طور مؤثری مکانیسم‌های دفاعی در برابر رادیکال‌های آزاد و خنثی کردن آن‌ها را از طریق تنظیم عمل آنتی‌اکسیدانی داخل سلولی آنزیم‌هایی مانند گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیس موتاز و کاتالاز دارد. این آنزیم‌ها تشکیل یک سیستم آنتی‌اکسیدانی مشترک را می‌دهند(۱۶). در آسیب القاشده به وسیله‌ی CCl_4، تعادل بین میزان تولید ROS و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی این آنزیم‌ها به هم می‌خورد که نتیجه‌ی آن ایجاد استرس اکسیداتیو و اختلال عملکرد سلولی و آسیب کبدی و نهایتاً نکروز است(۱۷). یافته‌های مطالعه ما نشان داد، عصاره سیلیمارین و NFSM باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAT و GPx نسبت به گروه CCl_4 گردید. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که سیلیمارین قادر به تحریک آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن برای مقابله با ROS تولیدشده توسط CCl_4 می‌باشد(۱۸, ۹). نانومیسل سیلیمارین (NFSM) در مقایسه با عصاره آن، افزایش بیشتری در سطح آنزیم‌های SOD و CAT نشان داد؛ که این افزایش با $P<0/05$ معنی‌دار محسوب می‌شود. نتایج به دست آمده از این آنزیم‌ها همسو با مطالعات قبلی می‌باشد(۱۸, ۹). Nahas و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای نشان دادند که تیمار موش‌ها به مدت ۵ روز با نانوذره‌ی تهیه‌شده از سیلیمارین موجب افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌صورت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل سمی گردید(۱۸). Wang و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه‌ای، به بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی پرولیپوزومی از سیلیمارین، بر تیمار موش‌ها در شش روز قبل از تجویز CCl_4 پرداختند. بررسی آنزیم‌های SOD و GPx در گروه درمانی با پرولیپوزوم سیلیمارین در مقایسه با گروه کنترل سمی، افزایش معنی‌داری را با $P<0/01$ نشان داد(۹). همچنین نتایج مطالعه ما نشان داد که دو گروه درمانی در میزان فعالیت آنزیم GPx تفاوت معنی‌داری ندارند که شاید این عدم تغییر فعالیت این آنزیم در دو گروه درمانی می‌تواند به علت کوتاه بودن دوره درمان و یا عدم دوز مناسب برای بیان ژن GPx باشد.

یکی دیگر از اثرات سمیت کبدی ناشی از CCl_4، تولید بیش‌ازحد نیتریک اکسید سنتاز (iNOS) است که منجر به تولید نیتریک اکسید در کبد و افزایش استرس نیتروزاتیو و آسیب بافتی می‌شود(۱۹). در این راستا، یافته‌های مطالعه حاضرنشان داد که نانومیسل سیلیمارین (NFSM) موجب کاهش معنی‌داری در میزان NO گردید($P<0/001$)؛که این امر می‌تواند به دلیل افزایش حلالیت و نفوذپذیری نانومیسل باشد. با این وجود نانومیسل سیلیمارین تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه درمان شده با عصاره سیلیمارین ایجاد نکرد($P>0/05$). Sokar و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای اثر سیلیمارین و ترکیبی از آن بر محتوای NOx روی فیبروزکبدی پس از تیمار موش‌ها به مدت ۷ هفته، نشان داد که میزان NO در گروه کنترل سمی نسبت به گروه کنترل نرمال ۲۷۱ درصد افزایش داشته است و درمان با سیلیمارین و ترکیب آن باعث کاهش قابل‌توجه در مقدار محتوای NO (به ترتیب ۵۲ و ۶۷ درصد) می‌گردد(۱).

تجویز CCl_4 باعث افزایش سطح MDA، محصول پر اکسیداسیون لیپیدی در کبد موش‌ها می‌گردد(۱۷). در مطالعه حاضر تجویز تک‌دوز CCl_4 به موش‌ها، با ایجاد رادیکال‌های آزاد و شروع پراکسیداسیون لیپیدی باعث افزایش قابل‌توجهی در سطح بافت کبدی MDA در مقایسه با گروه کنترل نرمال گردید. تیمار با عصاره سیلیمارین و

NFSM، سطح MDA را در مقایسه با گروه CCl_4 به‌طور معنی‌داری کاهش داد. نانومیسل سیلیمارین به‌طور مؤثرتری موجب کاهش سطح MDA نسبت به گروه عصاره سیلیمارین گردید که با توجه به افزایش حلالیت و نفوذپذیری نانومیسل قابل توجیه است. این یافته‌ها در راستای مطالعات قبلی می‌باشد(۲۰-۱۷). در مطالعه‌ای که توسط Nahas و همکاران (۲۰۱۷) انجام گرفت نشان داده‌شده است که درمان با نانوذره‌ای از سیلیمارین به مدت سه روز، موجب کاهش معنی‌دار در میزان MDA با $P<$ ۰/۰۱ می‌گردد(۱۸). در مطالعه‌ای دیگر، درمان با لیپوزوم حاوی سیلیمارین به مدت ۶ روز قبل از تزریق CCl_4 باعث کاهش معنی‌دار در میزان MDA در مقایسه با قرص‌های تجاری سیلیمارین نسبت به گروه کنترل سمی گردید(۲۰). برخی مطالعات نشان داده‌اند که سیلیمارین می‌تواند به دلیل داشتن ترکیبات فلاونوئیدی دارای خاصیت روبندگی رادیکال‌های آزاد ایجادشده توسط CCl_4 می‌باشد. این عوامل باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب به سلول‌ها می‌گردد(۲۰, ۱۷).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه شکل جدیدی از محلول سیلیمارین (NFSM) به شکل نانومیسل تهیه شد و برخی از خواص دارویی آن مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی کلی این نتایج نشان می‌دهد تجویز این شکل جدید و ارزان قیمت از سیلیمارین در طی چهارده روز نسبت به عصاره آن اثربخشی بیشتری بر حفاظت سلول‌های کبدی در سمیت با CCl_4 دارد که احتمالاً می‌توان علت آن را افزایش محلولیت و جذب روده‌ای نانومیسل برشمرد. بااین‌حال این میزان اثربخشی در برخی پارامترها ازجمله ALP، ALB، GPx و NO در مقایسه با عصاره سیلیمارین تفاوت معنی‌داری را نشان نداد، که شاید می‌تواند به دلیل کوتاه بودن دوره درمان و یا عدم دوز مناسب سیلیمارین در گروه‌های درمانی باشد؛ بنابراین برای درک بهتر نتایج، به مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز است.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی طرح پژوهش ۳۹۶۶۷۳ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان- دانشکده داروسازی می‌باشد. از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان جهت تأمین قسمتی از هزینه‌های این طرح قدردانی می‌شود.

منابع

1.Sokar SS, El-Sayad ME-S, Ghoneim ME-S, Shebl AM. Combination of Sitagliptin and Silymarin ameliorates liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. Biomed Pharmacother. 2017;89:98-107.
2.Setty SR, Quereshi AA, Swamy AV, Patil T, Prakash T, Prabhu K, et al. Hepatoprotective activity of Calotropis procera flowers against paracetamol-induced hepatic injury in rats. Fitoterapia. 2007;78(7-8):451-4.
3.Di Costanzo A, Angelico R. Formulation strategies for enhancing the bioavailability of silymarin: the state of the art. Molecules. 2019;24(11):2155.
4.D'Archivio M, Filesi C, Varì R, Scazzocchio B, Masella R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. Int J Mol Sci. 2010;11(4):1321-42.
5.Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxid Med Cell Longev. 2009;2(5):270-8.
6.Feng B, Meng R, Huang B, Shen S, Bi Y, Zhu D. Silymarin alleviates hepatic oxidative stress and protects against metabolic disorders in high-fat diet-fed mice. Free Radic Res. 2016;50(3):314-27.

7.Esposito T, Sansone F, Russo P, Picerno P, Aquino RP, Gasparri F, et al. A water-soluble microencapsulated milk thistle extract as active ingredient for dermal formulations. Molecules. 2019;24(8):1547.
8.Passerini N, Perissutti B, Albertini B, Franceschinis E, Lenaz D, Hasa D, et al. A new approach to enhance oral bioavailability of Silybum Marianum dry extract: Association of mechanochemical activation and spray congealing. Phytomedicine. 2012;19(2):160-8.
9.Abdel-Moneim AM, Al-Kahtani MA, El-Kersh MA, Al-Omair MA. Free radical-scavenging, anti-inflammatory/anti-fibrotic and hepatoprotective actions of taurine and silymarin against CCl4 induced rat liver damage. PLoS One. 2015;10(12):e0144509.
10.Guhagarkar SA, Shah D, Patel MD, Sathaye SS, Devarajan PV. Polyethylene sebacate-silymarin nanoparticles with enhanced hepatoprotective activity. J Nanosci Nanotechnol. 2015;15(6):4090-3.
11.Mahmoodzadeh Y, Mazani M, Rezagholizadeh L. Hepatoprotective effect of methanolic Tanacetum parthenium extract on CCl4-induced liver damage in rats. Toxicol Rep. 2017;4:455-62.
12.Parveen R, Baboota S, Ali J, Ahuja A, Vasudev SS, Ahmad S. Oil based nanocarrier for improved oral delivery of silymarin: in vitro and in vivo studies. Int J Pharm. 2011;413(1-2):245-53.
13.Dufour C, Loonis M, Dangles O. Inhibition of the peroxidation of linoleic acid by the flavonoid quercetin within their complex with human serum albumin. Free Radic Biol Med. 2007;43(2):241-52.
14.Fernandez ML, West KL. Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. J Nutr. 2005;135(9):2075-8.
15.Krečman V, Škottová N, Walterová D, Ulrichová J, Šimánek V. Silymarin inhibits the development of diet-induced hypercholesterolemia in rats. Planta Medica. 1998;64(02):138-42.
16.Liu W, Baker SS, D Baker R, Zhu L. Antioxidant mechanisms in nonalcoholic fatty liver disease. Curr Drug Targets. 2015;16(12):1301-14.
17.Nencini C, Giorgi G, Micheli L. Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain. Phytomedicine. 2007;14(2-3):129-35.
18.El-Nahas AE, Allam AN, Abdelmonsif DA, El-Kamel AH. Silymarin-loaded eudragit nanoparticles: formulation, characterization, and hepatoprotective and toxicity evaluation. Aaps Pharmscitech. 2017;18(8):3076-86.
19.Singh H, Sidhu S, Chopra K, Khan M. The novel role of β-aescin in attenuating CCl4-induced hepatotoxicity in rats. Pharm Biol. 2017;55(1):749-57.
20.Wang M, Xie T, Chang Z, Wang L, Xie X, Kou Y, et al. A new type of liquid silymarin proliposome containing bile salts: its preparation and improved hepatoprotective effects. PLoS One. 2015;10(12):e0143625.