

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

Yasaman Safian Isfahani¹, Abolfazl Aslani², Mohammad Reza Memarzadeh³, **Mohammad Hosein Aarabi⁴**

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 CCl₄ 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: ۴۴۰۸-۲۵۶۳-۰۰۰۳-۰۰۰۰

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

۶۸۰۶-۳۲۹۰-۰۰۰۲-۰۰۰۰

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

۴. دانشیار گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران (نویسنده مسئول)، پست الکترونیک:

amh.aarabi@pharm.mui.ac.ir تلفن ثابت: ۰۳۱-۳۷۹۲۷۲۵۲، کد ارکید: ۱۷۸X-۵۳۷۷-۰۰۰۱-۰۰۰۰

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 CCL₄ با عصاره سیلیمارین و نانومیسل سیلیمارین تیمار گردیدند. در پایان مطالعه، نمونه‌های خون جهت تعیین سطح سرمی آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات 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 ($P < 0/05$). همچنین فعالیت بافت کبدی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیددیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) در گروه تیمار شده با نانومیسل سیلیمارین نسبت به عصاره سیلیمارین افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$). میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) بافت کبدی در گروه تیمار شده با نانومیسل نسبت به عصاره سیلیمارین کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج در این مطالعه نشان داد، نانومیسل سیلیمارین دارای اثرات حفاظت کبدی بهتری نسبت به عصاره سیلیمارین در تعدیل اثرات سمیت القاشده با CCL₄ 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 سم‌زدایی و دفع زنبوتیک‌های 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 از جمله استفاده‌ی مداوم از الکل، هپاتیت‌های ویروسی، بیماری‌های متابولیک ارثی، سموم محیطی، استفاده‌ی نادرست دارویی و... ایجاد می‌گردد که نهایتاً منجر به بیماری‌های کبدی متفاوتی از جمله هپاتیت، فیروز، 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 مورد توجه بیشتری قرار گرفته است (۳). از جمله 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 پاتوژن‌های 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 مورد توجه و بررسی قرار گرفته است و به خوبی می‌تواند به عنوان یک مهارکننده‌ی رادیکال آزاد و متعاقب آن مهار پراکسیداسیون لیپیدها عمل کند. علاوه بر این، سیلیمارین ورود مواد سمی مانند آفت‌کش‌ها، فلزات سنگین و CCl₄ به سلول‌های کبدی را متوقف می‌کند؛ بنابراین از آن‌ها در برابر آسیب‌های بعدی محافظت می‌کند (۶).

با این حال، سیلیمارین به علت ساختار به شدت 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، نانوامولسیون و نانومیسل‌ها اشاره کرد (۸, ۷, ۳). اما تقریباً 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 می‌باشد. علاوه بر این اثرات این فرم جدید نسبت به عصاره سیلیمارین بر خاصیت حفاظتی سلول‌های کبدی در برابر سمیت CCl₄، مورد بررسی و مقایسه قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، عصاره سیلیمارین از شرکت سیگما آلدریج (Sigma Aldrich) و مواد دیگر مثل پلی‌اتیلن گلیکول ۴۰۰، پلی‌پروپیلن گلیکول، توئین ۸۰ (TWEEN80) و گلیسرین از شرکت Merck آلمان تهیه شد. به منظور 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 (NFSM) New Form of Sylimarین با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول ۴۰۰ به عنوان حلال و توئین ۸۰ به عنوان 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

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 شست‌شو داده و سپس هموژنایز شد و مایع رویی جهت اندازه‌گیری پارامترهای آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسید دیس موتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوکوتیون پراکسیداز (GPx) و میزان نیتریک اکساید (NO) در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید. اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدید (MDA) با استفاده از تیوباربتوریک اسید (TBA) و اندازه‌گیری جذب کمپلکس TBA-MDA با اسپکتروفتومتر در طول موج 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 دوه‌دوی گروه‌ها از پس‌آزمون Tukey استفاده گردید. سطح معنی‌دار جهت تفسیر نتایج $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

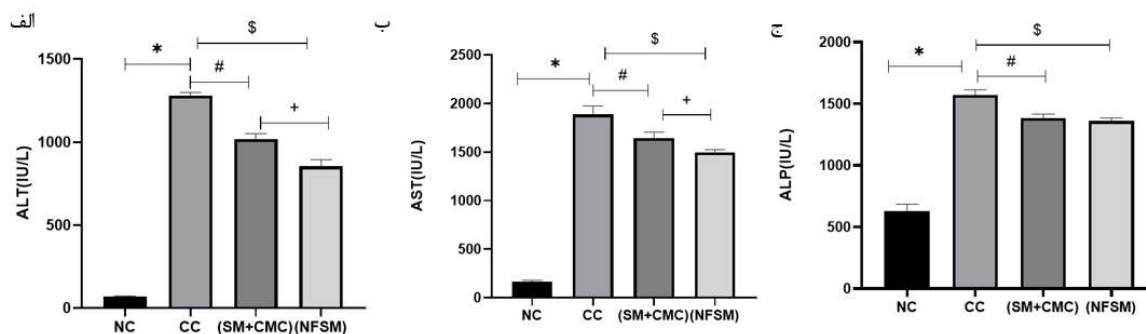
یافته‌ها

۱- تهیه و ارزیابی نانومیسل:

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از تکنیک DLS، محلول نانومیسل، با مشخصات: اندازه ذرات تقریباً ۲۲۷/۵ nm، توزیع اندازه ذرات $PDI < 0.1$ 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.

آزادسازی سیلیمارین (In Vitro Release) در نانومیسل، مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. پس از تهیه و تأیید 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 (NFMSM) تقسیم شدند. گروه کنترل نرمال: آب و غذای معمول دریافت کردند. گروه کنترل سمی: روزانه به مدت ۱۴ روز یک میلی‌لیتر، محلول ۰/۵٪ کریوکسی متیل سلولز (CMC) دریافت کردند، به دو گروه درمانی: روزانه به مدت ۱۴ روز، یک میلی‌لیتر محلول ۱۰۰ mg/kg سیلیمارین (SM) حل شده در ۰/۵٪ کریوکسی متیل سلولز (CMC) و یک میلی‌لیتر نانومیسل (NFMSM)، به صورت خوراکی داده شد. بر اساس مطالعات قبلی دوز مناسب برای سیلیمارین انتخاب شد (۹، ۱). در روز پانزدهم به جز گروه کنترل نرمال، به بقیه موش‌ها ۱/۵ ml/kg محلول CCl_4 حل شده به نسبت مساوی با روغن زیتون، به صورت داخل صفاقی تزریق شد و به گروه کنترل نرمال، ۱/۵ میلی‌لیتر روغن زیتون به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. بیست و چهار ساعت پس از تزریق CCl_4 ، موش‌ها با تزریق داخل صفاقی کتامین-زیلازین (به ترتیب ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) 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)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)، آلکالن فسفاتاز (ALP)، کلاسترول تام (TC)،

گروه درمانی (عصاره سیلیمارین و نانومیسل) نسبت به گروه کنترل سمی کاهش قابل توجهی داشت که این کاهش با $P < 0/05$ معنی دار تلقی می شود. همان طور که در نمودار ۱ مشخص است، نانومیسل سیلیمارین اثر بهبودی بیشتری را نسبت به عصاره سیلیمارین در فعالیت سرمی آنزیم ALT و AST نشان می دهد که به ترتیب با $P < 0/001$ و $P < 0/001$ معنی دار محسوب می شود. یافته دیگر در این نمودار این بود که فعالیت سرمی آنزیم ALP در نانومیسل نسبت به عصاره سیلیمارین با $P > 0/05$ تفاوت معنی داری ندارد (نمودار ۱، ج).



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

گردید ($P < 0/05$). با این وجود دو گروه درمانی در افزایش میزان آلبومین تفاوت معنی دار باهم نشان ندادند ($P > 0/05$). با توجه به نمودار ۲_ (ب)، ایجاد سمیت، موجب افزایش معنی داری در میزان کلسترول توتال در گروه کنترل سمی نسبت به کنترل نرمال با ($P < 0/001$) گردید. چهارده روز پیش درمانی با NFSM و عصاره سیلیمارین باعث کاهش کلسترول نسبت به گروه کنترل سمی گردید که با ($P < 0/001$) در گروه عصاره سیلیمارین و با ($P < 0/001$) در گروه NFSM معنی دار تلقی می شود. طبق نمودار ۲_ (ب)، پیش درمانی با نانومیسل نسبت به عصاره سیلیمارین به طور مؤثرتری موجب کاهش کلسترول گردید ($P < 0/01$) در نمودار ۲_ (ج) میزان سطح تری گلیسیرید سرمی در گروه کنترل سمی نسبت به گروه کنترل نرمال افزایش معنی داری را نشان داد ($P < 0/001$). چهارده روز تیمار با

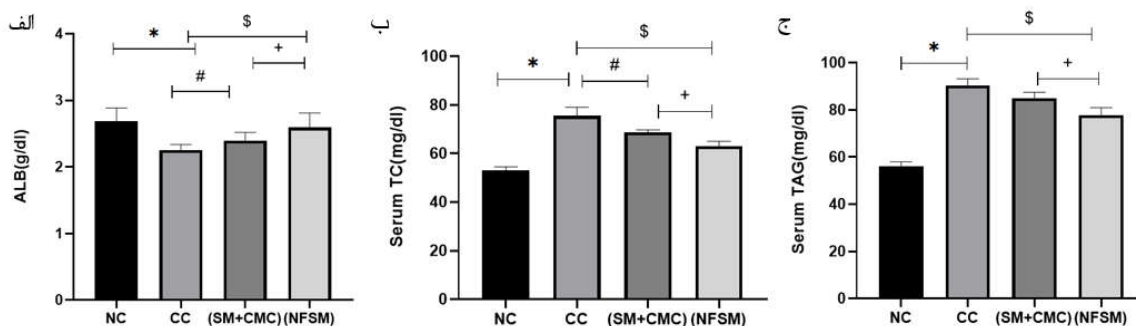
۲- اثر محلول خوراکی جدید و عصاره سیلیمارین بر پارامترهای بیوشیمیایی سرم: نتایج حاصل از این مطالعه در مورد آنزیم های کبدی نشان داد که تزریق CCl_4 می تواند سطح سرمی آنزیم های ALT, AST, ALP را در مقایسه با گروه نرمال به صورت قابل ملاحظه ای افزایش دهد ($P < 0/001$)؛ بنابراین تزریق داخل صفاقی CCl_4 به صورت تک دوز توانست به طور موفقیت آمیزی سمیت مورد نظر را در سلول های کبدی حیوانات مورد آزمایش القا کند (نمودار ۱- الف، ب، ج). با توجه به نمودار ۱، سطح سرمی سه آنزیم کبدی، در هر دو

نتایج بر اساس Mean±SD نمایش داده شده اند. (*) نشان دهنده تفاوت معنی دار بین گروه کنترل سمی با گروه کنترل نرمال، (#) نشان دهنده 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.

همان طور که در نمودار ۲ (الف) ملاحظه می گردد، تزریق CCl_4 باعث کاهش معنی داری در مقدار سنتز آلبومین گردید ($P < 0/001$)؛ اما در گروه درمانی با عصاره سیلیمارین، میزان افزایش آلبومین نسبت به گروه کنترل سمی تغییر محسوسی مشاهده نشد ($P > 0/05$). یافته مهم دیگر این بود که تجویز نانومیسل سیلیمارین (NFSM) به طور معنی داری موجب افزایش آلبومین سرم نسبت به گروه کنترل سمی

کنترل سمی گردید ($P < 0.001$). علاوه بر این NFSM نسبت به عصاره سیلیمارین به طور مؤثرتری تری گلیسیرید را با $P < 0.05$ کاهش داد.

عصاره سیلیمارین تغییر محسوسی در کاهش میزان تری گلیسیرید ایجاد نکرد ($P > 0.05$)؛ اما تیمار با NFSM باعث کاهش معنی‌دار در میزان تری گلیسیرید نسبت به گروه



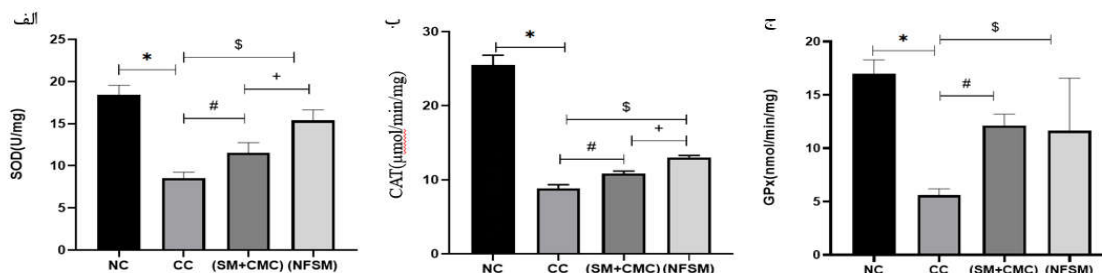
نمودار ۲. اثر نانومیسل خوراکی در مقایسه با عصاره سیلیمارین بر پارامترهای بیوشیمیایی (الف) آلبومین، (ب) کلسترول توتال، (ج) تری گلیسیرید.

این اثر با $P < 0.0001$ در آنزیم SOD و CAT و 0.001 در آنزیم GPx نسبت به گروه نرمال قابل توجه است. همان‌طور که در نمودار ۳ ملاحظه می‌شود عصاره سیلیمارین و NFSM باعث افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAT و GPx نسبت به گروه CCl_4 گردید. نانومیسل سیلیمارین در مقایسه با عصاره آن باعث افزایش بیشتری در سطح آنزیم‌های SOD و CAT گردید که با $P < 0.05$ این افزایش معنی‌دار تلقی می‌گردد؛ ولی در دو گروه درمانی فعالیت آنزیم GPx تفاوت معنی‌داری یافت نشد ($P > 0.05$).

نتایج بر اساس $Mean \pm SD$ نمایش داده شده‌اند. (*) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل سمی با گروه کنترل نرمال، (#) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل سمی و گروه درمانی با عصاره سیلیمارین، (\$) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل سمی و گروه درمانی با نانومیسل و (+) تفاوت معنی‌دار بین دو گروه درمانی را نشان می‌دهد.

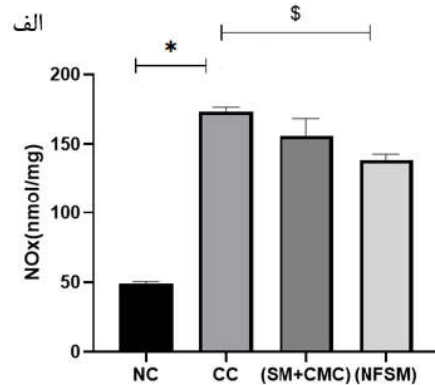
۳- اثر محلول خوراکی جدید و عصاره سیلیمارین بر پارامترهای استرس اکسیداتیو:

در این مطالعه کاهش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نشان‌دهنده آسیب شدید به سلول توسط CCl_4 است که



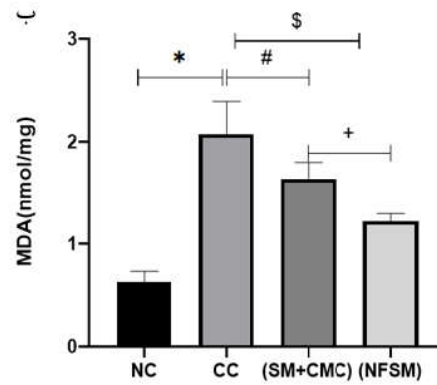
نمودار ۳. اثر نانومیسل خوراکی در مقایسه با عصاره سیلیمارین بر پارامترهای آنتی‌اکسیدانی (الف) SOD، (ب) CAT، (ج) GPx.

ایجادشده با CCl_4 را متعادل کند ($P < 0/001$)؛ ولی این کاهش در نانومیسل نسبت به عصاره سیلیمارین با $P > 0/05$ معنی دار نیست؛ بنابراین تفاوت قابل توجهی بین دو گروه درمانی وجود ندارد. تجویز تک دوز CCl_4 به موش ها، با ایجاد رادیکال های آزاد و شروع پراکسیداسیون لیپیدی باعث افزایش قابل توجهی در سطح MDA در مقایسه با گروه کنترل نرمال گردید ($P < 0/001$). با توجه به نمودار ۴- (ب) تجویز عصاره سیلیمارین و نانومیسل سیلیمارین به صورت پیش درمانی، سطح MDA را در مقایسه با گروه CCl_4 به طور معنی داری کاهش دادند (به ترتیب $P < 0/05$ و $P < 0/001$). نانومیسل سیلیمارین در مقایسه با عصاره سیلیمارین به طور مؤثرتری میزان MDA تولیدشده را کاهش داد که با $P < 0/05$ معنی دار محسوب می شود.



نتایج بر اساس $\text{Mean} \pm \text{SD}$ نمایش داده شده اند. (*) نشان دهنده تفاوت معنی دار بین گروه کنترل سمی با گروه کنترل نرمال، (#) نشان دهنده تفاوت معنی دار بین گروه کنترل سمی و گروه درمانی با عصاره سیلیمارین، (\$) نشان دهنده تفاوت معنی دار بین گروه کنترل سمی با گروه درمانی نانومیسل و (+) تفاوت معنی دار بین دو گروه درمانی را نشان می دهد.

همان طور که در نمودار ۴ (الف) ملاحظه می گردد، محتوای NOx سلول های کبدی در گروه CCl_4 در مقایسه با گروه نرمال افزایش یافته است ($P < 0/0001$). پیش درمانی با عصاره سیلیمارین تغییر محسوسی در میزان محتوای NO ایجاد نکرد ($P > 0/05$). نانومیسل سیلیمارین بعد از تزریق CCl_4 توانست محتوای NOx افزایش یافته در سمیت



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

سیلیمارین یک پلی فنول گیاهی است که به دلیل خواص آنتی اکسیدانی در درمان اختلالات کبدی استفاده می شود. با این حال، 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 می دهد. برای غلبه بر این مشکل، با تهیه فرمولاسیون های مختلف محلولیت و زیست فراهمی سیلیمارین را افزایش می دهند. در این مطالعه، فرم ساده، پایدار، کم هزینه و جدیدی از سیلیمارین (NFSM) به شکل نانومیسل با قابلیت انحلال

نتایج بر اساس $\text{Mean} \pm \text{SD}$ نمایش داده شده اند. (*) نشان دهنده تفاوت معنی دار بین گروه کنترل سمی با گروه کنترل نرمال، (#) نشان دهنده 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.

بحث

و جذب بیشتر تهیه شد. با توجه به نتایج به دست آمده 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 به طور 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 قابل توجهی داشتند که این کاهش با $P < 0.05$ معنی‌دار تلقی می‌شود که نشان می‌دهد تجویز خوراکی عصاره سیلیمارین و نانومیسل سیلیمارین باعث حفاظت هیپاتوسیت‌ها 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 امولسیون حاوی سیلیمارین انجام گرفت، پس از تیمار رت‌ها 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 امولسیون 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 به خصوص آلبومین است. در این مطالعه آلبومین به عنوان 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 ($P > 0.05$). عدم تغییر در میزان آلبومین در گروه تیمار با عصاره سیلیمارین می‌تواند به دلیل جذب روده‌ای ناکافی سیلیمارین و در نتیجه 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 در نتیجه تأثیر بیشتر بر سلول‌های کبدی از طریق استحکام بخشیدن به شبکه آندوپلاسمی و سنتز دوباره پروتئین و یا از طریق خنثی کردن ROS به وسیله این محلول باشد (۱۳). اگرچه مقدار افزایش سنتز آلبومین در دو گروه تیمار تفاوت قابل محسوسی را نشان نمی‌دهد ($P > 0.05$).

همان‌طور که در نمودار ۲- (ب) و (ج) ملاحظه می‌شود، تزریق CCl_4 باعث افزایش قابل توجه در TG و TC می‌شود. افزایش سطح کلسترول بعد از تزریق CCl_4 می‌تواند ناشی از افزایش استری شدن 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-هیدروکسی ۳-متیل گلو تاریل کو آنزیم آردو کتاز، 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 گلیسیرید با $P < 0.001$ گردید (۱۱). در مطالعه حاضر، چهارده روز تیمار با نانومیسل سیلیمارین باعث کاهش کلسترول و تری

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 بیش از حد نیتریک اکسید سنتتاز (iNOS) است که منجر به تولید نیتریک اکسید در کبد و افزایش استرس نیتروژاتیو و آسیب بافتی می‌شود (۱۹). در این راستا، یافته‌های مطالعه حاضر نشان 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 فیروز کبدي 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 قابل توجه در مقدار محتوای NO (به ترتیب ۵۲ و ۶۷ درصد) می‌گردد (۱).

تجویز CCl_4 باعث افزایش سطح MDA، محصول پراکسیداسیون 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 قابل توجهی در سطح بافت کبدي MDA در مقایسه با گروه کنترل نرمال گردید. تیمار با عصاره سیلیمارین و

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 به‌دست آمده از این پژوهش هم‌راستا با مطالعات قبلی می‌باشد (۱۶، ۱۵). این امر می‌تواند به علت افزایش محلولیت؛ و متعاقب آن، افزایش جذب روده‌ای نانومیسل نسبت به عصاره سیلیمارین باشد. بنابراین، تجویز نانومیسل سیلیمارین (NFSM) به‌صورت پیش‌درمانی 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 گلوکوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیس موتاز و کاتالاز دارد. این آنزیم‌ها تشکیل یک سیستم آنتی‌اکسیدانی مشترک را می‌دهند (۱۶). در آسیب القا شده به وسیله 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 تولید شده 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

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. با این حال این میزان اثربخشی در برخی پارامترها از جمله 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.

NFSM، سطح MDA را در مقایسه با گروه CCl_4 به طور معنی‌داری کاهش داد. نانومیسل سیلیمارین به طور 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 داده شده است که درمان با نانوذره‌ای از سیلیمارین به مدت سه روز، موجب کاهش معنی‌دار در میزان MDA با $0.01 < P$ 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 ایجاد شده توسط CCl_4 می‌باشد. این عوامل باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب به سلول‌ها می‌گردد (۲۰، ۱۷).

نتیجه‌گیری

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, Vari R, Scaccocchio 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.