مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی، دوره ۲۱، شماره ۱، بهار ۱۴۰۵
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

DOI: 10.22100/jkh.v21i1.3616

مقاله پژوهشی

بررسی اثر محافظت کبدی نانوذرات فیتوزوم سیلیمارین بر سمیت کبدی ناشی از اتانول در موش صحرایی

آرزو گوهری محمودآباد[۱،۲]، فاطمه غیبی[۳]، محسن محرابی[۲]، علیرضا مسعودی[۴]، زینب مبشر[۵]، حمید واحدی[۶،۷]، آنه محمد غراوی*[۸،۹]، فاطمه سادات بیطرف[۱۰]، سیدمهدی رضایت سرخ آبادی[۵]

۱- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.
۲- گروه نانو فناوری پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.
۳- گروه بیوتکنولوژی و نانوفناوری پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۴- گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.
۵- گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۶- واحد توسعه تحقیقات بالینی، بیمارستان امام حسین، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.
۷- گروه گوارش، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.
۸- دانشکده پرستاری گنبد، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گنبد، ایران.
۹- گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.
۱۰- گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۱۸، **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۵/۰۱/۱۴

چکیده

مقدمه: *سیلیمارین، ترکیبی گیاهی با خواص محافظت‌کننده کبد، به دلیل فراهمی زیستی پایین و جذب محدود، دارای اثربخشی درمانی محدودی است. هدف از مطالعه حاضر، تهیه و ارزیابی نانوذرات فیتوزومی سیلیمارین به‌منظور افزایش فراهمی زیستی و تقویت اثرات هپاتوپروتکتیو آن بود.*

مواد و روش‌ها: *نانوذرات فیتوزوم سیلیمارین با استفاده از روش هیدراتاسیون لایه نازک سنتز شد. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی شامل اندازه ذرات، پتانسیل زتا، مورفولوژی، پایداری، برهم‌کنش‌های مولکولی، راندمان به‌دام‌اندازی و ظرفیت بارگذاری مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، زیست‌سازگاری نانوذرات با استفاده از آزمون MTT بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ارزیابی شد. در مطالعه درون‌تنی، ۲۴ سر موش صحرایی نر بالغ به‌طور تصادفی در چهار گروه شامل کنترل، اتانول، سیلیمارین + اتانول و فیتوزوم سیلیمارین + اتانول (۶ سر در هر گروه) تقسیم شدند و اثرات محافظت‌کننده کبدی فرمولاسیون مورد ارزیابی قرار گرفت.*

نتایج: *نانوذرات فیتوزومی حامل سیلیمارین با میانگین اندازه ۳۰۳/۷ ±۱۶/۱ نانومتر با موفقیت سنتز شدند و زیست‌سازگاری مطلوبی در آزمون‌های سلولی نشان دادند. تجویز فیتوزوم سیلیمارین به‌طور معنی‌داری افزایش ناشی از اتانول در شاخص‌های آسیب کبدی شامل ALT، AST، ALP، GGT و MDA را کاهش داد و هم‌زمان موجب افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی GPx شد (P< ۰/۰۵). علاوه بر این، بررسی‌های هیستوپاتولوژیک نشان داد که این فرمولاسیون آسیب‌های بافتی و تغییرات ساختمانی کبد ناشی از اتانول را به‌طور قابل‌توجهی بهبود می‌بخشد.*

نتیجه‌گیری: *نانوذرات فیتوزومی سیلیمارین با افزایش فراهمی زیستی و تقویت خواص آنتی‌اکسیدانی و محافظت‌کننده کبدی سیلیمارین، توانستند آسیب کبدی القاشده توسط اتانول را به‌طور مؤثری کاهش دهند. این فرمولاسیون می‌تواند به‌عنوان یک راهبرد درمانی نوین و امیدوارکننده برای پیشگیری و درمان بیماری کبد الکلی مورد توجه قرار گیرد.*

واژه‌های کلیدی: فیتوزوم، سیلیمارین، سمیت کبدی، اتانول.

***نویسنده مسئول:** گنبد، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، دانشکده پرستاری گنبد، **تلفن:** ۰۱۷۳۱۹۳۲۲۰۱-۰۶، **Email:** annehgh@yahoo.com

ارجاع: گوهری محمودآباد آرزو، غیبی فاطمه، محرابی محسن، مسعودی علیرضا، مبشر زینب، واحدی حمید، غراوی آنه محمد، بیطرف فاطمه سادات، رضایت سرخ آبادی سیدمهدی. بررسی اثر محافظت کبدی نانوذرات فیتوزوم سیلیمارین بر سمیت کبدی ناشی از اتانول در موش صحرایی. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۵؛۲۱(۱):۳۹-۲۹.

CC BY NC

مقدمه

بیماری کبد الکلی (Alcoholic Liver Disease; ALD) یکی از مهم‌ترین چالش‌های سلامت در سراسر جهان به شمار می‌رود و با وجود پیشرفت‌های قابل‌توجه در شناخت این بیماری، هنوز درمان مؤثر و اختصاصی برای آن در دسترس نیست. با وجود پژوهش‌های گسترده‌ای مکانیسم‌های مولکولی دخیل در بروز و پیشرفت این بیماری هنوز به‌طور کامل شناخته نشده‌اند. گرچه استرس اکسیداتیو و التهاب از مهم‌ترین عوامل مؤثر در آسیب کبدی ناشی از مصرف مزمن الکل هستند (۱ و ۲). بر همین اساس، اغلب راهبردهای درمانی کنونی بر مهار استرس اکسیداتیو و پاسخ‌های التهابی متمرکز شده‌اند (۳ و ۴). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که متابولیسم اتانول با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد همراه است و در نتیجه موجب آسیب اکسیداتیو سلول‌های کبدی می‌شود (۷-۵). طی متابولیسم اتانول، رادیکال‌های هیدروکسی‌اتیل که عمدتاً از طریق سیستم مونواکسیژناز میکروزومی و آنزیم CYP2E1 تولید می‌شوند، پراکسیداسیون لیپیدها را القا کرده و از طریق فعال‌سازی مسیرهای ایمنی و تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی، استرس اکسیداتیو و آسیب سلولی را تشدید می‌کنند (۹-۶). در مدل‌های حیوانی، آسیب کبدی ناشی از اتانول معمولاً از طریق اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی شامل آلکالین فسفاتاز (ALP)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، گاماگلوتامیل ترانسفراز (GGT)، فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز (GPx)، میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی و نیز بررسی‌های هیستوپاتولوژیک ارزیابی می‌شود (۱۰ و ۱۱). در شرایط استرس اکسیداتیو، فعالیت آنزیم‌های کبدی و سطح MDA به‌طور قابل‌توجهی افزایش می‌یابد، در حالی که فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی GPx کاهش پیدا می‌کند؛ تغییراتی که بیانگر آسیب عملکردی و ساختاری کبد هستند.

در حال حاضر، تنها تعداد محدودی از داروهای سنتزی از جمله بیسیکلول، تیوپرونین و بیفندات برای درمان ALD مورد استفاده قرار می‌گیرند که عمدتاً موجب بهبود موقت علایم شده و اثربخشی محدودی دارند. ازاین‌رو، توسعه راهکارهای درمانی جدید و مؤثر برای کنترل این بیماری ضروری به نظر می‌رسد. در سال‌های اخیر، توجه پژوهشگران به استفاده از ترکیبات طبیعی با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی در درمان بیماری‌های کبدی افزایش یافته است. در این میان، سیلیمارین به‌عنوان یکی از شناخته‌شده‌ترین ترکیبات گیاهی محافظت‌کننده کبد، جایگاه ویژه‌ای یافته است.

سیلیمارین مجموعه‌ای از فلاونولیگنان‌های استخراج شده از گیاه خار مریم (Silybum marianum) است که دارای طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی از جمله اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدفیبروتیک، ضدسرطانی، ضدآلرژیک، آنتی‌ترومبوتیک و مهارکننده پراکسیداسیون لیپیدی است (۱۲ و ۱۳). این ترکیب سال‌هاست برای درمان بیماری‌های مختلف کبدی، مسمومیت ناشی از قارچ‌های سمی و آسیب‌های کبدی مرتبط با مصرف الکل مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۶-۱۴).

با وجود خواص درمانی ارزشمند سیلیمارین، کاربرد بالینی آن به دلیل فراهمی زیستی پایین محدود شده است. اگرچه مطالعات آزمایشگاهی (in vitro) اثرات مطلوب این ترکیب را نشان داده‌اند، نتایج حاصل از مطالعات درون‌تنی (in vivo) بیانگر اثربخشی محدود آن است که عمدتاً به جذب ضعیف و فراهمی زیستی پایین نسبت داده می‌شود (۱۷). این محدودیت ناشی از عواملی نظیر متابولیسم گسترده فاز II، نفوذپذیری اندک از اپیتلیوم روده، حلالیت پایین در آب و دفع سریع از طریق صفرا و ادرار است (۱۸).

در سال‌های اخیر، سامانه‌های دارورسانی مبتنی بر فناوری نانو به‌عنوان راهکاری مؤثر برای افزایش فراهمی زیستی داروها، بهبود جذب، کاهش دوز مصرفی، کاهش عوارض جانبی و افزایش اثربخشی درمانی مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۹). در این میان، فیتوزوم‌ها یکی از موفق‌ترین سامانه‌های انتقال ترکیبات گیاهی محسوب می‌شوند. فیتوزوم سیلیمارین کمپلکسی از سیلیمارین و فسفاتیدیل‌کولین است که ابتدا از طریق روش تبخیر حلال تهیه شده و سپس با استفاده از روش هیدراتاسیون لایه نازک به نانووزیکول‌های فیتوزومی تبدیل می‌شود. این سامانه با افزایش حلالیت، بهبود نفوذپذیری غشایی، افزایش پایداری شیمیایی و ارتقای جذب روده‌ای، فراهمی زیستی سیلیمارین را به‌طور چشمگیری افزایش می‌دهد (۲۵-۲۰).

با وجود مطالعات متعدد درباره خواص محافظت‌کننده سیلیمارین، اطلاعات محدودی در خصوص اثربخشی نانوفیتوزوم سیلیمارین در درمان آسیب کبدی ناشی از اتانول وجود دارد. ازاین‌رو، هدف از مطالعه حاضر سنتز، مشخصه‌یابی و ارزیابی اثرات محافظت‌کننده کبدی نانوذرات فیتوزوم سیلیمارین در مدل موش صحرایی مبتلا به آسیب کبدی القاشده توسط اتانول بود.

مواد و روش‌ها

تمامی مواد شیمیایی، معرف‌ها و اجزای محیط کشت سلولی از شرکت سیگما-آلدریچ تهیه شدند.

کمپلکس سیلیمارین- فسفاتیدیل‌کولین (SPC) بر اساس روش گزارش شده در مطالعات پیشین با اندکی اصلاح تهیه شد. به‌طور خلاصه، سیلیمارین و فسفاتیدیل‌کولین سویا؛ لسیتین با نسبت وزنی متناظر با نسبت مولی ۱:۲٫۵ (۱ گرم سیلیمارین و ۴ گرم

CC BY NC

فسفاتیدیل‌کولین) با یکدیگر مخلوط شدند. سپس مخلوط در ۱۰۰ میلی‌لیتر استون (≤۹۹/۵٪) حل شده و به مدت یک شب روی همزن مغناطیسی با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد هم زده شد. پس از آن، حلال با استفاده از دستگاه تبخیرکننده در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه به مدت ۱ ساعت حذف شد. نمونه حاصل به مدت ۲۴ ساعت در خشک‌کن انجمادی قرار گرفت تا باقیمانده حلال به‌طور کامل حذف شود. در نهایت، کمپلکس‌های SPC تهیه‌شده در ظروف مناسب جمع‌آوری و تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

به‌منظور تعیین میزان سیلیمارین محصورشده، ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون فیتوزومی به مدت ۱ ساعت و با نیروی g×15000 سانتریفیوژ شد. پس از جداسازی، محلول رویی با دقت جمع‌آوری و در متانول حل شد تا ساختار وزیکول‌های فیتوزومی تخریب و سیلیمارین آزاد شود. سپس رقت مناسب از نمونه تهیه و جذب نوری آن در طول موج ۲۸۸ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر UV–Vis اندازه‌گیری شد. غلظت سیلیمارین بر اساس قانون بیر–لامبرت محاسبه گردید. در نهایت، راندمان به‌دام‌اندازی (Entrapment Efficiency; EE٪) و ظرفیت بارگذاری (Loading Capacity; LC٪) با استفاده از روابط مربوطه محاسبه شدند.

به‌منظور بررسی برهم‌کنش‌های مولکولی بین سیلیمارین و فسفاتیدیل‌کولین و تأیید تشکیل کمپلکس فیتوزومی، طیف‌های مادون قرمز سیلیمارین خالص، فسفاتیدیل‌کولین و کمپلکس سیلیمارین–فسفاتیدیل‌کولین با استفاده از دستگاه FTIR-Rayleigh، چین ثبت شدند. برای این منظور، حدود ۲ میلی‌گرم از هر نمونه به‌طور یکنواخت با حدود ۲۰۰ میلی‌گرم پتاسیم بروماید (KBr) مخلوط و تحت فشار ۱۰ تن بر سانتی‌متر مربع به‌صورت قرص‌های شفاف فشرده شدند. طیف‌ها در محدوده عدد موجی ۴۰۰۰ تا ۴۰۰ cm^{-1} با وضوح ۴ cm^{-1} و در ۴۵ اسکن ثبت شدند. در نهایت، داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار اختصاصی متصل به دستگاه FTIR تجزیه و تحلیل شدند.

نانوذرات فیتوزوم سیلیمارین (SPCs-NPs) با استفاده از روش هیدراتاسیون تهیه شدند. به‌طور خلاصه، کمپلکس سیلیمارین–فسفاتیدیل‌کولین (SPCs) در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر پراکنده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از همزن با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه همگن شد. سپس سوسپانسیون حاصل به مدت ۴ دقیقه تحت فراصوت با استفاده از سونیکاتور پروبی، با دامنه ۶۰٪ و در چرخه‌های متناوب ۵ ثانیه روشن و ۵ ثانیه خاموش قرار گرفت. پس از تهیه نانوذرات، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی شامل اندازه ذرات، شاخص پراکندگی (Polydispersity Index; PDI)، پتانسیل زتا، مورفولوژی و برهم‌کنش‌های مولکولی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌منظور افزایش پایداری در فرآیند خشک‌کردن انجمادی، به سوسپانسیون فیتوزومی ۱٪ (w/v) ترهالوز به‌عنوان عامل محافظ انجمادی (Cryoprotectant) افزوده شد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۰- درجه سانتی‌گراد پیش‌انجماد شده و سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۵۷- درجه سانتی‌گراد با استفاده از خشک‌کن انجمادی لیوفیلیزه شدند. در نهایت، پودرهای خشک حاصل تا زمان انجام مطالعات مشخصه‌یابی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

اندازه ذرات، شاخص پراکندگی (PDI) و پتانسیل زتای نانوذرات SPCs-NPs با استفاده از روش پراکندگی نور دینامیکی (Dynamic Light Scattering; DLS) و دستگاه HORIBA SZ-100 اندازه‌گیری شدند.

مورفولوژی نانوذرات خشک‌شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی Field Emission Scanning Electron Microscopy; FESEM، مدل Sigma 300-HV، شرکت Zeiss، آلمان بررسی شد. بدین منظور، نمونه‌ها ابتدا به‌وسیله دستگاه یون‌پاش با لایه نازکی از طلا پوشش داده شدند. سپس مقدار کمی از نمونه روی پایه مخصوص قرار گرفته و پس از تصویربرداری، مورفولوژی سطح و شکل ذرات مورد ارزیابی قرار گرفت.

پایداری نانوذرات فیتوزومی بهینه‌شده حاوی ترهالوز به‌عنوان محافظ انجمادی، با استفاده از آزمون چرخه‌های انجماد–ذوب مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها در سه چرخه متوالی انجماد–ذوب، شامل انجماد در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد و ذوب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، قرار داده شدند. پس از پایان هر چرخه، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی شامل مورفولوژی، اندازه وزیکول، توزیع اندازه ذرات (PDI)، پتانسیل زتا و ساختار فیتوزومی ارزیابی شدند تا پایداری نانوذرات تعیین شود.

پروفایل رهایش سیلیمارین از نانوذرات فیتوزومی با استفاده از روش کیسه دیالیز مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، سوسپانسیون فیتوزومی درون کیسه‌های دیالیز سلولزی قرار داده شد و کیسه‌ها در دو بشر حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات (PBS) و مایع روده‌ای شبیه‌سازی‌شده (Simulated Intestinal Fluid; SIF)، pH=7.4 آویزان شدند. نمونه‌ها در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۳۷ ± ۰/۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در فواصل زمانی از پیش تعیین‌شده، ۲ میلی‌لیتر از محیط رهایش برداشت و بلافاصله با حجم مساوی از محیط تازه جایگزین شد تا شرایط سینک حفظ گردد. نمونه‌های برداشت‌شده پس از فیلتراسیون و رقیق‌سازی با متانول، با استفاده از اسپکتروفتومتر UV–Vis در طول موج ۲۸۸ نانومتر مورد آنالیز

CC BY NC

قرار گرفتند و درصد تجمعی سیلیمارین رهایش‌یافته بر اساس منحنی استاندارد محاسبه شد.

سلول‌های بنیادی از انستیتو پاستور تهیه شدند. سلول‌ها در محیط کشت کامل DMEM حاوی ۱۰٪ FBS و ۱٪ محلول آنتی‌بیوتیک–ضدقارچ کشت داده شدند. سلول‌ها در فلاسک‌های کشت T25 و در انکوباتور مرطوب با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت اشباع و ۵٪ CO_2 نگهداری شدند. تمامی آزمایش‌های سلولی در پلیت‌های ۹۶ خانه انجام گرفت.

سلول‌ها ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت کامل انکوبه شدند. سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف سیلیمارین (۱۵/۶۲۵ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و نانوفیتوزوم سیلیمارین (۳۱/۲۵ تا ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، محیط کشت خارج شده و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت نهایی ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند تا کریستال‌های فورمازان تشکیل شوند. سپس محلول MTT حذف و ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) به هر چاهک افزوده شد تا کریستال‌های فورمازان حل شوند. در نهایت، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌ریدر اندازه‌گیری شد. میزان جذب نوری (Optical Density; OD) متناسب با مقدار فورمازان تولیدشده و بیانگر فعالیت متابولیکی و تعداد سلول‌های زنده بود.

در این مطالعه، ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۰۰ ±۲۰ گرم از مرکز حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شاهرود تهیه شدند. حیوانات به مدت یک هفته پیش از شروع آزمایش، در شرایط استاندارد شامل دمای ۲ ±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۵ ±۵۵٪ و چرخه ۱۲ ساعت روشنایی/۱۲ ساعت تاریکی، با دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد نگهداری شدند.

سپس حیوانات به‌صورت تصادفی به چهار گروه (n=۶) تقسیم شدند:

۱. گروه کنترل سالم (بدون دریافت اتانول)
۲. گروه دریافت‌کننده اتانول ۴۰٪ خوراکی
۳. گروه اتانول + سیلیمارین (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)
۴. گروه اتانول + نانوفیتوزوم سیلیمارین (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)

فرمولاسیون‌های سیلیمارین و نانوفیتوزوم سیلیمارین به مدت ۲۱ روز و از طریق گاواژ خوراکی، دو ساعت پیش از تجویز اتانول، به حیوانات گروه‌های درمانی تجویز شدند.

بیست‌وچهار ساعت پس از آخرین تیمار، حیوانات با تزریق داخل صفاقی کتامین (۷۵–۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، محلول ۱۰٪) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، محلول ۲٪) بیهوش شدند. سپس نمونه‌های خون جمع‌آوری و پس از تشکیل لخته، به مدت ۸ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سرم‌های حاصل تا زمان انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

در ادامه، کبد حیوانات خارج شده، با سرم فیزیولوژی سرد شستشو داده شد و برای انجام مطالعات هیستوپاتولوژیک و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین–ائوزین و تری‌کروم ماسون تثبیت و نگهداری شد.

سطوح سرمی آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلکالین فسفاتاز (ALP)، گاماگلوتامیل ترانسفراز (GGT)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) و مالون‌دی‌آلدئید (MDA) با استفاده از کیت‌های تجاری و مطابق دستورالعمل سازنده اندازه‌گیری شدند.

نمونه‌های بافت کبد در محلول فرمالین بافره ۱۰٪ به مدت ۲۴ ساعت تثبیت شدند. سپس پس از طی مراحل آب‌گیری، شفاف‌سازی و قالب‌گیری در پارافین، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شدند. مقاطع بافتی با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین–ائوزین و تری‌کروم ماسون رنگ‌آمیزی شده و تغییرات هیستوپاتولوژیک توسط میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفت.

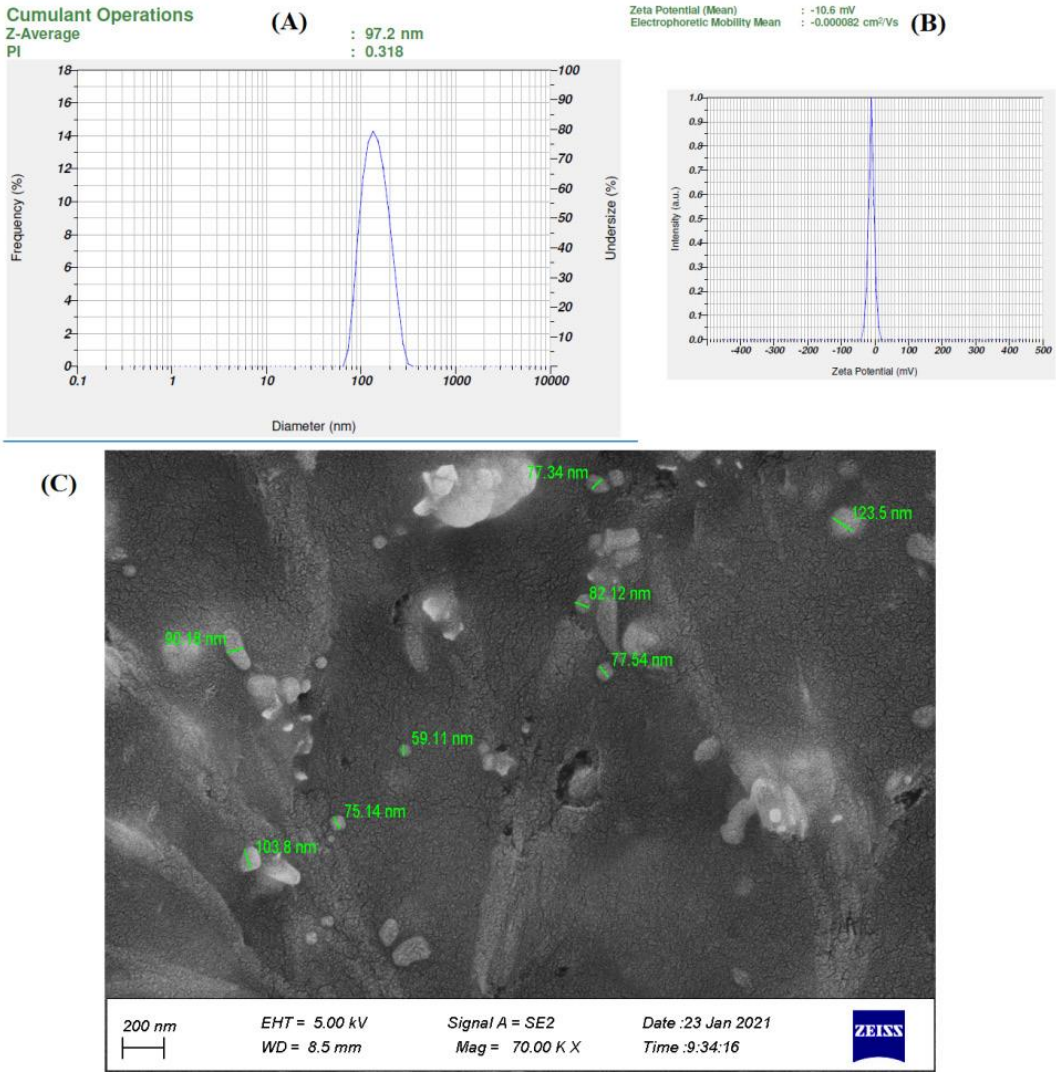
تمامی داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (Mean ± SD) گزارش شدند. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۹ انجام شد. مقایسه بین گروه‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه انجام گرفت. در موارد مقایسه دو گروه، از آزمون t مستقل استفاده شد. مقدار $P<0/05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. همچنین، تمامی نمودارها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 9 ترسیم شدند.

نتایج

اندازه ذرات، شاخص پراکندگی (PDI) ، پتانسیل زتا و مورفولوژی

اندازه متوسط ذرات، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی (PDI) نانوذرات فیتوزوم سیلیمارین بهینه‌شده (SPCs-NPs) به‌ترتیب ۱۶/۱ ±۳۰۳/۷ نانومتر، ۶/۱ ±۱۰/۶۸ میلی‌ولت و ۰/۰۷ ±۰/۳۷۴ بودند.

بررسی مورفولوژی نانوذرات نشان داد که اندازه مشاهده‌شده در تصاویر میکروسکوپی از مقدار اندازه‌گیری‌شده توسط روش پراکندگی دینامیکی نور (DLS) کوچک‌تر است. این اختلاف را می‌توان به اندازه‌گیری قطر هیدرودینامیکی ذرات در روش DLS نسبت داد (شکل ۱).

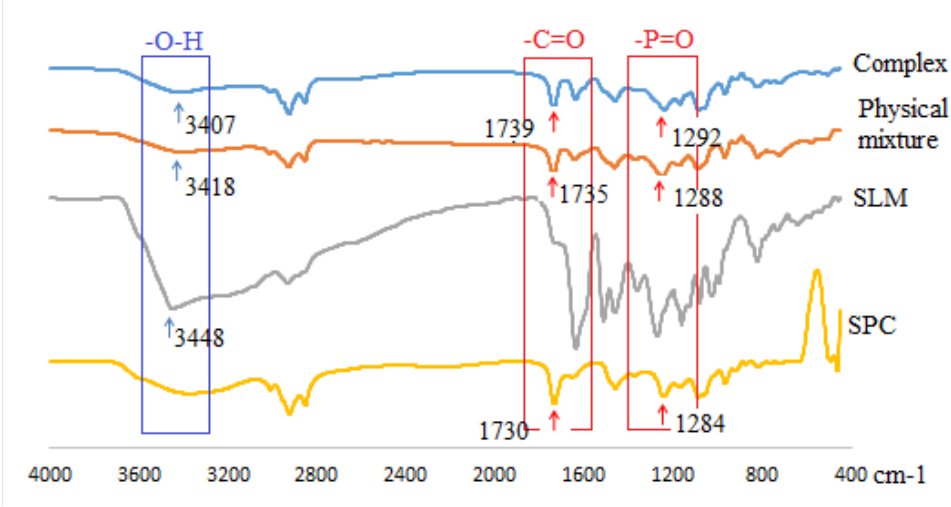


شکل ۱- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوذرات SPC شامل اندازه، شاخص پراکندگی (PDI) و پتانسیل زتا با استفاده از روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) بزرگ‌نمایی در تصویر آمده است.

در طیف‌های FTIR و مقایسه با مخلوط فیزیکی، هیچ پیک جدیدی در طیف SPCها مشاهده نشد؛ با این حال، جابه‌جایی جزیی در پیک‌های ارتعاش کششی گروه‌های P=O از ۱۲۸۴ به ۱۲۹۲ (cm^{-1}) و C=O ۱۷۳۰ به ۱۷۳۹ cm^{-1} مربوط‌به مولکول‌های فسفولیپیدی مشاهده شد. این تغییرات بیانگر وجود برهم‌کنش بین سیلیمارین و فسفاتیدیل‌کولین است.

علاوه بر این، پیک ارتعاش کششی گروه هیدروکسیل آزاد (O–H) سیلیمارین در 3448 cm^{-1} در طیف SPC ها پهن‌تر شده و جابه‌جا شد که نشان‌دهنده تشکیل پیوند هیدروژنی است. این پیوند هیدروژنی بین گروه‌های هیدروکسیل سیلیمارین و گروه‌های فسفوریل (P=O) و کربونیل (C=O) فسفاتیدیل‌کولین برقرار می‌شود.

CC BY NC



شکل ۲- طیف‌های FTIR مربوط به فسفاتیدیل‌کولین سویا (SPC)، سیلیمارین (SLM)
مخلوط فیزیکی آنها و کمپلکس SPCs نشان داده شده استبازده به‌دام‌اندازی و ظرفیت بارگذاری

نتایج طیف‌سنجی UV–Vis و محاسبات مبتنی بر قانون بیر–لامبرت نشان داد که مقدار ۱/۹۲ میلی‌گرم سیلیمارین در هر بچ ۱۰ میلی‌گرمی (حاوی ۸ میلی‌گرم فسفاتیدیل‌کولین و ۲ میلی‌گرم سیلیمارین) در نانو ذرات به دام افتاده است.

بر این اساس، بازده به‌دام‌اندازی (Entrapment Efficiency) برابر با ۹۶٪ و ظرفیت بارگذاری (Loading Capacity) برابر با ۲۴٪ محاسبه شد.

حدود ۸۳٪ از سیلیمارین طی ۲۴۰ دقیقه از کمپلکس فیتوزومی در محیط بافر فسفات سالین (PBS) آزاد شد. در مقابل، میزان رهایش در مایع شبیه‌سازی‌شده روده (SIF) حدود ۲۰٪ بود که به‌طور قابل‌توجهی کمتر از PBS است.

نانو ذرات طی سه چرخه انجماد- ذوب از نظر تمایل به ادغام، تجمع ذرات و تخریب وزیکول‌ها پایدار باقی ماندند. پس از انجام آزمون، اندازه ذرات از ۱۰۰/۱ به ۱۰۵/۶ نانومتر، مقدار PDI از ۰/۳۱۳ به ۰/۳۵۹ و پتانسیل زتا از ۳۳/۴- به ۳۵/۰- میلی‌ولت تغییر یافت؛ بااین‌حال، این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار نبودند.

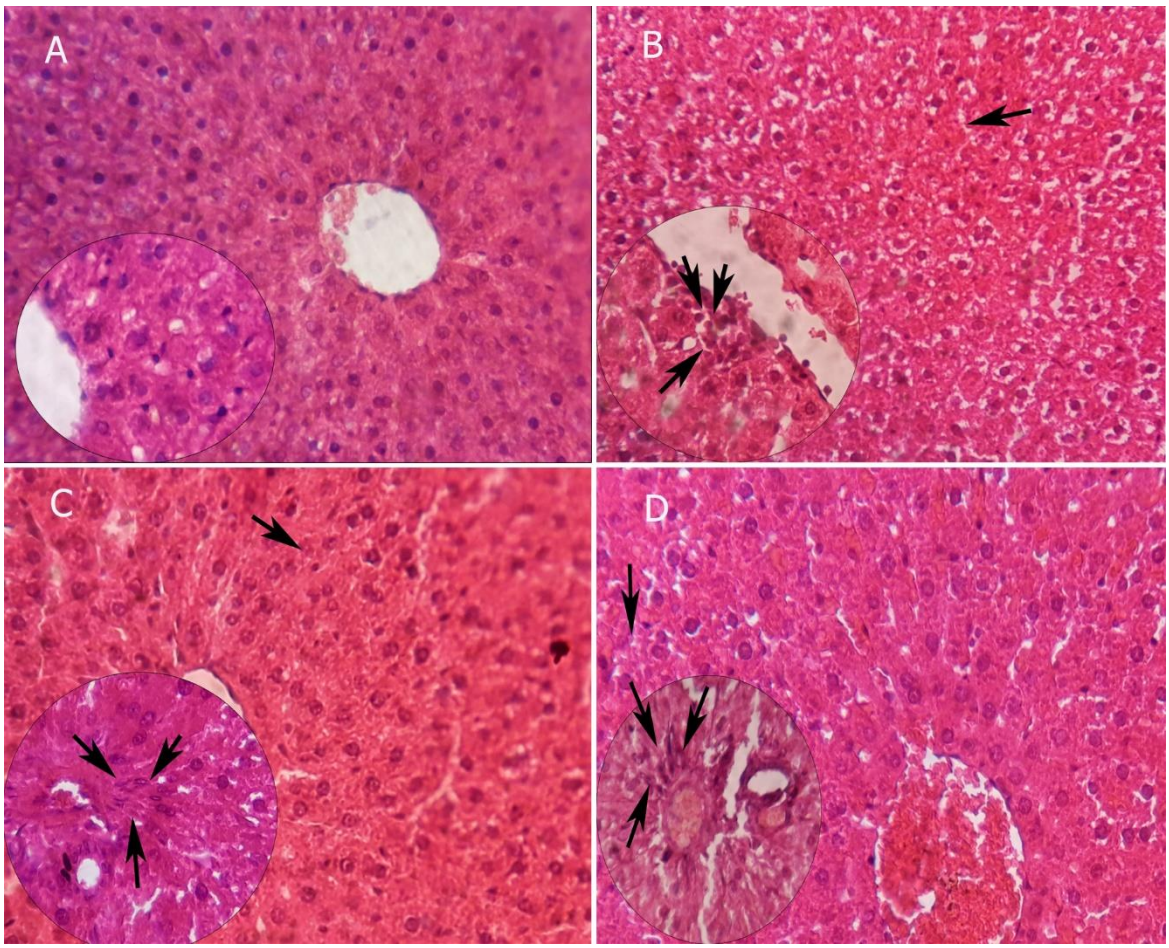
سطوح آنزیم‌های ALT، AST، ALP، GGT و شاخص MDA در گروه دریافت‌کننده اتانول در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۰۱). درمان با سیلیمارین و فیتوزوم سیلیمارین موجب کاهش این شاخص‌ها شد، به‌طوری‌که اثر فیتوزوم سیلیمارین قوی‌تر بود (P<۰/۰۵).

در مقابل، فعالیت GPx در گروه اتانول کاهش یافت (P<۰/۰۰۱) و پس از درمان با سیلیمارین و فیتوزوم افزایش یافت؛ این افزایش در گروه فیتوزوم به‌طور معنی‌داری بیشتر از سیلیمارین آزاد بود.

بررسی بافت کبد در گروه کنترل نشان داد که ساختار لوبولی و طناب‌های هپاتوسیتی طبیعی بودند. در گروه اتانول، تخریب ساختاری لوبولی، بی‌نظمی طناب‌ها و نفوذ سلول‌های التهابی مشاهده شد. درمان با سیلیمارین تا حدی این آسیب‌ها را کاهش داد، در حالی که فیتوزوم سیلیمارین اثر محافظتی بیشتری نشان داد و موجب بهبود واضح ساختار بافتی و کاهش التهاب شد. با رنگ‌آمیزی تری‌کروم ماسون در گروه اتانول، رسوب قابل‌توجه الیاف کلاژن در نواحی تریاد پورتال و اطراف ورید مرکزی مشاهده شد. در مقابل، در گروه سیلیمارین و به‌ویژه فیتوزوم، میزان رسوب کلاژن به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافت.

در گروه کنترل، ساختار طبیعی ناحیه تریاد پورتال با الیاف کلاژن کم و سازمان‌یافته مشاهده شد. در گروه فیتوزوم، الگوی بافتی مشابه گروه کنترل حفظ شده بود، در حالی که در گروه اتانول افزایش واضح فیبروز و رسوب کلاژن دیده شد (شکل ۳).

نتایج آزمون MTT نشان داد که در غلظت‌های پایین، سیلیمارین و فیتوزوم سیلیمارین موجب افزایش تکثیر سلولی شدند. در مقابل، در غلظت‌های بالاتر ۱۲۵ µg/mL سیلیمارین و ۲۵۰ µg/mL فیتوزوم کاهش معنی‌دار زنده‌مانی سلولی مشاهده شد. با افزایش دوز، اثرات سمی بیشتر شد و کمترین زنده‌مانی در ۱۰۰۰ µg/mL سیلیمارین و ۴۰۰۰ µg/mL فیتوزوم مشاهده گردید. به‌طور کلی، فیتوزوم سیلیمارین سمیت کمتری نسبت به سیلیمارین آزاد نشان داد و اثرات آن وابسته به دوز اما مستقل از زمان (۴۸ و ۷۲ ساعت) بود.



شکل ۳- بررسی اثرات محافظتی سیلیمارین و فیتوزوم سیلیمارین بر تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد در مدل آسیب کبدی ناشی از اتانول

گروه کنترل (A) ساختار طبیعی لوبولار و طناب‌های کبدی منظم را نشان داد. در گروه دریافت‌کننده اتانول (B)، تغییرات پاتولوژیک قابل‌توجهی از جمله نفوذ سلول‌های التهابی، ساختار غیرطبیعی لوبولار کبدی و بی‌نظمی طناب‌های کبدی مشاهده شد (با فلش مشخص شده است). گروه تیمار شده با سیلیمارین (C) بهبود نسبی در مقایسه با گروه اتانول نشان داد، در حالی که گروه دریافت‌کننده فیتوزوم سیلیمارین (D) نزدیک‌ترین الگوی بافتی به گروه کنترل را دارا بود که حاکی از محافظت مؤثرتر فیتوزوم در برابر آسیب کبدی ناشی از اتانول است.

بحث

در این مطالعه، اثرات محافظتی کبدی سیلیمارین و فیتوزوم سیلیمارین در برابر آسیب کبدی ناشی از اتانول در مدل تجربی ALD در موش صحرایی نر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بیوشیمیایی، هیستوپاتولوژیک و درون تنی نشان داد که مواجهه با اتانول موجب آسیب قابل‌توجه کبدی، افزایش شاخص‌های استرس اکسیداتیو و اختلال در ساختاری بافتی کبد شد. این تغییرات در هر دو گروه درمان‌شده با سیلیمارین و فیتوزوم به‌طور معنی‌داری معکوس گردید، با این تفاوت که اثرات درمانی فیتوزوم سیلیمارین به‌طور قابل‌توجهی قوی‌تر بود. یافته‌های هیستوپاتولوژیک نشان دادند که درمان با هر دو ترکیب موجب کاهش نفوذ سلول‌های التهابی و بهبود سازمان‌یافتگی طناب‌های هپاتوسیتی شد، در حالی که فیتوزوم سیلیمارین اثر محافظتی بیشتری بر حفظ ساختار طبیعی لوبولی کبد داشت. همچنین، بهبود شاخص‌های عملکرد کبدی و کاهش MDA همراه با افزایش فعالیت GPx بیانگر نقش مهم این ترکیبات در تعدیل استرس اکسیداتیو ناشی از اتانول است. مطابق با نتایج این مطالعه، مطالعات پیشین نیز اثرات محافظتی سیلیمارین در برابر آسیب کبدی ناشی از اتانول را در مدل‌های حیوانی ALD گزارش کرده‌اند (۲۶)

از نظر مکانیسمی، پاتوژنز ALD به‌طور عمده با فعال‌سازی سلول‌های کوپفر و ماکروفاژهای مقیم کبد مرتبط است. این سلول‌ها در پاسخ به اندوتوکسین/لیپوپلی‌ساکارید (LPS) مشتق از روده و سایر محرک‌ها مانند گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF-

CC BY NC

α) و اینترلوکین‌های پیش‌التهابی فعال می‌شوند. فعال‌سازی سلول‌های کوپفر (KCs) منجر به آزادسازی واسطه‌های سیتوتوکسیک می‌شود که به آسیب سلول‌های مجاور و تشدید التهاب کبدی منجر می‌گردد (۳۰–۲۷)

مصرف مزمن اتانول با افزایش نفوذپذیری روده، انتقال LPS به کبد را تسهیل کرده و از این طریق موجب فعال‌سازی KCs و افزایش تولید ROS و سیتوکین‌های پیش‌التهابی می‌شود. این فرآیند در نهایت به جذب سلول‌های التهابی بیشتر و تشدید آسیب بافتی منجر می‌گردد (۳۷–۳۱) علاوه بر این، اتانول با افزایش بیان گیرنده‌های TNF-α و تشکیل ترکیبات پروتئینی پیش‌التهابی مانند MAA (محصول واکنش مالون‌دی‌آلدئید با پروتئین‌ها و استالدهید) نقش مهمی در تشدید استرس اکسیداتیو ایفا می‌کند (۳۸)

همچنین، سیتوکروم P450 2E1 (CYP2E1) به‌عنوان یکی از منابع اصلی تولید ROS در ALD، در سلول‌های کوپفر و اپیتلیوم روده کوچک بیان می‌شود. القای این آنزیم توسط اتانول نه‌تنها تولید ROS را افزایش می‌دهد، بلکه موجب افزایش نفوذپذیری روده و تشدید پاسخ التهابی ناشی از LPS نیز می‌شود (۳۹)

در این زمینه، اثرات محافظتی سیلیمارین عمدتاً به توانایی آن در مهار ROS، کاهش تولید TNF-α و محدود کردن اثرات LPS نسبت داده شده است (۴۰ و ۴۱). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که فیتوزوم سیلیمارین، احتمالاً به دلیل بهبود زیست‌دسترسی و پایداری دارویی ناشی از کمپلکس فسفولیپیدی، اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی قوی‌تری نسبت به سیلیمارین آزاد ایجاد می‌کند.

یافته‌های بالینی نیز از اثرات مفید سیلیمارین در بیماری‌های کبدی حمایت می‌کنند. به‌عنوان مثال، گزارش شده است که سیلیمارین می‌تواند مرگ‌ومیر بیماران مبتلا به سیروز کبدی را کاهش دهد (۴۲) همچنین در یک کارآزمایی بالینی تصادفی، اثر مثبت سیلیمارین در کاهش افزایش آنزیم‌های کبدی ALT و AST ناشی از ایزوترتینوئین گزارش شده است (۴۲) مطالعات متعددی خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدآپوپتوزی و محافظت‌کننده کبدی سیلیمارین را نشان داده‌اند. به‌ویژه سیلیبین (Silibinin)، به‌عنوان ترکیب اصلی فلاونولیگنان فعال سیلیمارین، به‌عنوان یک جمع‌کننده قوی رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدان مؤثر شناخته شده است (۴۷–۴۳) در مطالعه حاضر، این اثرات مفید از طریق فرمولاسیون فیتوزومی تقویت شده‌اند.

شواهد پیشین نشان می‌دهد که فسفاتیدیل‌کولین، به‌عنوان جزء اصلی فیتوزوم، نه‌تنها نقش حامل برای ترکیبات فلاونوئیدی فعال دارد، بلکه خود نیز دارای فعالیت زیستی در اختلالات کبدی از جمله استئاتوز کبدی الکلی است (۴۸ و ۴۹) علاوه بر این، سامانه‌های فیتوزومی با ایجاد کمپلکس‌های لیپیدی پایدار، از ترکیبات گیاهی در برابر تخریب ناشی از ترشحات گوارشی و میکروبیوتای روده محافظت می‌کنند (۵۰).

در این راستا، یک مطالعه فارماکوکینتیکی در ۲۳ فرد سالم نشان داد که فراهمی زیستی کمپلکس سیلیبین–فسفاتیدیل‌کولین در مقایسه با فرمولاسیون‌های معمول سیلیمارین به‌طور قابل‌توجهی بالاتر است. این یافته‌ها در مدل‌های حیوانی نیز تأیید شده است، به‌طوری‌که تجویز خوراکی کمپلکس‌های فیتوزومی نسبت به سیلیمارین آزاد، جذب سیستمیک بیشتری ایجاد کرده است (۵۱–۵۳)

اگرچه مطالعه حاضر نخستین شواهد از اثرات محافظتی فیتوزوم سیلیمارین در برابر ALD را ارائه می‌دهد، مطالعات مشابه نیز افزایش اثربخشی سایر فرمولاسیون‌های لیپیدی را گزارش کرده‌اند. به‌عنوان مثال، کومار و همکاران نشان دادند که سیلیمارین لیپوزومی در مقایسه با سیلیمارین آزاد، موجب افزایش زنده‌مانی سلولی، بهبود شاخص‌های عملکرد کبد و تقویت اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی در مدل‌های درون‌کشتگاهی و درون‌تنی سمیت کبدی ناشی از الکل می‌شود (۵۴).

در مجموع، یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که بهبود فراهمی زیستی سیلیمارین از طریق سیستم‌های مبتنی بر فسفولیپید، مانند فیتوزوم، می‌تواند راهبردی مؤثر برای افزایش کارایی درمانی آن در بیماری‌های کبدی باشد.

اثر سیلیمارین بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) پیش‌تر توسط احمدی آشتیانی و همکاران مورد بررسی قرار گرفته است. در آن مطالعه نشان داده شد که سیلیمارین در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر موجب افزایش تکثیر MSCها تا روز هفتم می‌شود، در حالی که با افزایش مدت مواجهه، روند تکثیر سلولی کاهش می‌یابد (۵۵). این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی دارد و نشان می‌دهد که سیلیمارین اثرات دو فازی بر تکثیر MSCها دارد؛ به‌طوری‌که در مراحل اولیه موجب تحریک تکثیر و در مواجهه طولانی‌مدت منجر به کاهش آن می‌شود.

به‌طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که فیتوزوم‌های حاوی سیلیمارین با افزایش اثرات آنتی‌اکسیدانی این ترکیب، می‌توانند استرس اکسیداتیو کبدی را به‌طور مؤثرتری کاهش دهند. بر این اساس، این فرمولاسیون می‌تواند به‌عنوان یک گزینه درمانی بالقوه برای بیماری کبد الکلی (ALD) مطرح شود.

در این مطالعه، نانوذرات فیتوزومی پایدار سیلیمارین با اندازه متوسط حدود ۱۰۰ نانومتر تهیه و مشخصه‌یابی شدند. نتایج نشان داد که فیتوزوم سیلیمارین در مقایسه با سیلیمارین آزاد، اثرات محافظتی بیشتری در برابر آسیب کبدی ناشی از الکل دارد. این اثرات از طریق کاهش استرس اکسیداتیو، مهار التهاب و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی اعمال شده و در

نهایت موجب بهبود شاخص‌های عملکرد کبد در مدل موش صحرایی مبتلا به ALD گردید. با این حال، انجام مطالعات بیشتر برای ارزیابی اثربخشی بالینی این فرمولاسیون در بیماران مبتلا به ALD و سایر بیماری‌های کبدی ضروری است.

تشکر و قدردانی

این طرح با کد ۹۸۷۱در دانشگاه علوم پزشکی شاهرود تصویب شد. بدین وسیله از معاونت پژوهشی تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ تضاد منافعی را اعلام نمی‌کنند.

حمایت مالی

حمایت مالی ندارد.

ملاحظات اخلاقی

این آزمایش طبق دستورالعمل‌های مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شده و توسط کمیته مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی در دانشگاه علوم پزشکی شاهرود تأیید شده است.

مشارکت نویسندگان

انجام ازمایش: محسن محرابی، فاطمه غیبی، علیرضا مسعودی.
اعتبارسنجی: آرزو گوهری محمودآباد، فاطمه‌السادات بی‌طرف.
تحلیل اماری: آرزو گوهری محمودآباد، زینب مباشر.
گردآوری اطلاعات: آرزو گوهری محمودآباد، علیرضا مسعودی.
مدیریت پروژه: محسن محرابی، سیدمهدی رضایت‌سرخ‌آبادی.
تأمین مالی: محسن محرابی.
نگارش – تهیه پیش‌نویس اصلی: آرزو گوهری محمودآباد.
نگارش – نقد و تصحیح: زینب مبشر، آنه محمد غراوی، حمید واحدی.

کد اخلاق

IR.SHMU.REC.1398.122

References

1. Seitz HK, Bataller R, Cortez-Pinto H, Gao B, Gual A, Lackner C, et al. Alcoholic liver disease. Nat Rev Dis Primers 2018;4:1-22. doi: 10.1038/s41572-018-0021-8
2. Lamas-Paz A, Hao F, Nelson LJ, Vázquez MT, Canals S, Del Moral MG, et al. Alcoholic liver disease: Utility of animal models. World J Gastroenterol 2018;24:5063. doi: 10.3748/wjg.v24. i45.5063
3. Bellentani S. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. Liver Int 2017;37:81-4. doi: 10.3748/wjg.v24.i45.5063
4. Walsh K, Alexander G. Alcoholic liver disease. Postgrad Med J 2000;76:280-6. doi: 10.1136/pmj.76.895.280
5. Teschke R. Alcoholic liver disease: alcohol metabolism, cascade of molecular mechanisms, cellular targets, and clinical aspects. Biomedicines 2018;6:106. doi: 10.3390/ biomedicines6040106
6. Jiang Y, Zhang T, Kusumanchi P, Han S, Yang Z, Liangpunsakul S. Alcohol metabolizing enzymes, microsomal ethanol oxidizing system, cytochrome P450 2E1, catalase, and aldehyde dehydrogenase in alcohol-associated liver disease. Biomedicines 2020;8:50. doi: 10.3390/biomedicines8030050
7. Dupont I, Lucas D, Clot P, Ménez C, Albano E. Cytochrome P4502E1 inducibility and hydroxyethyl radical formation among alcoholics. J. Hepatol 1998;28:564-71. doi: 10.1016/ S0168-8278(98)80279-1
8. Cho YE, Mezey E, Hardwick JP, Salem Jr N, Clemens DL, Song BJ. Increased ethanol-inducible cytochrome P450-2E1 and cytochrome P450 isoforms in exosomes of alcohol-exposed rodents and patients with alcoholism through oxidative and endoplasmic reticulum stress. Hepatol. Commun 2017;1:675-90. doi: 10.1002/hep4.1066
9. Ullah U, Badshah H, Malik Z, Uddin Z, Alam M, Sarwar S, et al. Hepatoprotective effects of melatonin and celecoxib against ethanol-induced hepatotoxicity in rats. Immunopharmacol. Immunotoxicol 2020;42:255-63. doi: 10.1080/0892397 3.2020.1746802
10. Elnaggar AS, El-Said EA, Ali R. Physiological and immunological responses of ducks (Cairina moschata domestica) to silymarin supplementation. Egypt Poult Sci J 2021;40:895-913. doi: 10.21608/epsj.2021.177227
11. El Rabey HA, Rezk SM, Sakran MI, Mohammed GM, Bahattab O, Balgoon MJ, et al. Green coffee methanolic extract and silymarin protect against CCl4-induced hepatotoxicity in albino male rats. BMC Complement Med Ther 2021; 21: 1-11. doi: 10.1186/s12906-020-03186-x
12. Zalat Z, Kohaf N, Alm El-Din M, Elewa H, Abdel-Latif MMM. Silymarin: A promising cardioprotective agent. Azhar Int J Pharm Med Sci 2021; 1: 13-21. doi: 10.21608/ aijpms.2021.52962.1014
13. Sandhu N, Au J. Herbal Medicines for the Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. Curr Hepatol Rep 2021; 20: 1-11. doi: 10.1007/s11901-020-00558-2
14. Gillessen A, Schmidt HH-J. Silymarin as supportive treatment in liver diseases: A narrative review. Adv Ther 2020; 37: 1279-301. doi: 10.1007/s12325-020-01251-y
15. Mengesha T, Sekaran NG, Mehare T. Hepatoprotective effect of silymarin on fructose induced nonalcoholic fatty liver disease in male albino Wistar rats. BMC Complement Med Ther 2021; 21: 1-13. doi: 10.1186/s12906-021-03275-5
16. Hashem A, Shastri Y, Al Otaibi M, Buchel E, Saleh H, Ahmad R, et al. Expert Opinion on the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in the Middle East with a Focus on the Use of Silymarin. Gastroenterol Insights 2021; 12: 155-65. doi: 10.3390/gastroent12020014
17. Marceddu R, Dinolfo L, Carrubba A, Sarno M, Di Miceli G. Milk Thistle (Silybum marianum L.) as a Novel Multipurpose Crop for Agriculture in Marginal Environments: A Review. Agronomy 2022; 12: 729. doi: 10.3390/agronomy12030729
18. Theodosiou E, Purchartová K, Stamatis H, Kolisis F, Křen V. Bioavailability of silymarin flavonolignans: drug formulations and biotransformation. Phytochem Rev 2014; 13: 1-18. doi: 10.1007/s11101-013-9285-5
19. Xie Y, Zhang D, Zhang J, Yuan J. Metabolism, transport and drug–drug interactions of silymarin. Molecules 2019;24:3693. doi: 10.3390/molecules24203693
20. Deng M, Chen H, Xie L, Liu K, Zhang X, Li X. Tea saponins as natural emulsifiers and cryoprotectants to prepare silymarin nanoemulsion. LWT-Food Sci Technol 2022;156:113042. doi: 10.1016/j.lwt.2021.113042
21. Di Costanzo A, Angelico R. Formulation strategies for enhancing the bioavailability of silymarin: the state of the art. Molecules 2019;24: 2155. doi: 10.3390/molecules24112155
22. Vaishnavi A, Arvapalli S, Rishika P, Jabeen S, Karunakar B, Sharma J. A Review on Phytosomes: Promising Approach for Drug Delivery of Herbal Phytochemicals. J Pharm Innov 2021. doi: 10.35629/7781-0601289296
23. Zhu H-J, Brinda BJ, Chavin KD, Bernstein HJ, Patrick KS, Markowitz JS. An assessment of pharmacokinetics and antioxidant activity of free silymarin flavonolignans in healthy volunteers: a dose escalation study. Drug Metab Dispos 2013;41:1679-85. doi: 10.1124/dmd.113.052423

24. Sallam N, Sanad R, KHAFAGY E-S, Ahmed M, Ghourab M, Gad S. Colloidal delivery of drugs: present strategies and conditions. Rec Pharma Biomed Sci 2021;5:40-51. doi: 10.21608/ rpbs.2020.30372.1070

25. Nanavati B. Phytosome: a novel approach to enhance the bioavailability of phytoconstituent. Asian J Pharm 2017;11. doi: 10.22377/ajp.v11i03.1445

26. Chi C, Zhang C, Liu Y, Nie H, Zhou J, Ding Y. Phytosome-nanosuspensions for silybin-phospholipid complex with increased bioavailability and hepatoprotection efficacy. Eur J Pharm Sci 2020; 144:105212. doi: 10.1016/j.ejps.2020.105212

27. Maryana W, Rahma A, Mudhakir D, Rachmawati H, editors. Phytosome containing silymarin for oral administration: Formulation and physical evaluation. J Biomim Biomater Biomed Eng 2015: Trans Tech Publ. doi: 10.4028/www.scientific. net/JBBBE.25.54

28. Maryana W, Rachmawati H, Mudhakir D. Formation of phytosome containing silymarin using thin layer-hydration technique aimed for oral delivery. Mater Today Proc 2016;3:855-66. doi: 10.1016/j.matpr.2016.02.019

29. Hua Z-Z, Li B-G, Liu Z-J, Sun D-W. Freeze-drying of liposomes with cryoprotectants and its effect on retention rate of encapsulated ftorafur and vitamin A. Drying Technol 2003;21:1491-505. doi: 10.1081/DRT-120024489

30. Samad A, Devarajan PV. Freeze thaw: a simple approach for prediction of optimal cryoprotectant for freeze drying. AAPS PharmSciTech 2010;11:304-13. doi: 10.1208/s12249- 010-9382-3

31. El-Batal AI, Elmenshawi SF, Ali AMA, Goodha E. Preparation and characterization of silymarin nanocrystals and phytosomes with investigation of their stability using gamma irradiation. Indian J Pharm Educ Res 2018;52:S174-S83. doi: 10.5530/ ijper.52.4s.96

32. Molaveisi M, Shahidi-Noghabi M, Naji-Tabasi S. Vitamin D3-loaded nanophytosomes for enrichment purposes: Formulation, structure optimization, and controlled release. J Food Process Eng 2020;43:e13560. doi: 10.1111/jfpe.13560

33. Joseph S, Abdul Vahab A, Harindran J, Iyer RS. Evaluation of hepatoprotective activity of polyherbal (HEPIN) against alcohol induced hepatotoxicity in Wistar albino rats. World J Pharm Res 2018; 7:146-55. doi: 10.20959/wjpr201817-13195

34. Dixon L, Barnes M, Tang H, Pritchard M, Nagy L. Kupffer cells in the liver. Compr Physiol 2013;3:785-97. doi: 10.1002/ cphy.c120026

35. Smith K. Kupffer cells regulate the progression of ALD and NAFLD. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2013;10:503-13. doi: 10.1038/nrgastro.2013.140

36. Saberi B, Dadabhai AS, Jang Y-Y, Gurakar A, Mezey E. Current management of alcoholic hepatitis and future therapies. J Clin Transl Hepatol 2016;4:113-22. doi: 10.14218/ JCTH.2016.00006

37. Parlesak A, Schäfer C, Schütz T, Bode JC, Bode C. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. J Hepatol 2000;32:742-7. doi: 10.1016/S0168-8278(00)80242-1

38. Zeng T, Zhang C-L, Xiao M, Yang R, Xie K-Q. Critical roles of Kupffer cells in the pathogenesis of alcoholic liver disease: from basic science to clinical trials. Front Immunol 2016;7:538. doi: 10.3389/fimmu.2016.00538

39. Yang L, Wu D, Wang X, Cederbaum AI. Cytochrome P4502E1, oxidative stress, JNK, and autophagy in acute alcohol-induced fatty liver. Free Radic Biol Med 2012;53:1170-80. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.029

40. Feng R, Chen J-H, Liu C-H, Xia F-B, Xiao Z, Zhang X, et al. A combination of Pueraria lobata and Silybum marianum protects against alcoholic liver disease in mice. Phytomedicine 2019;58:152824. doi: 10.1016/j.phymed.2019.152824

41. Federico A, Dallio M, Loguercio C. Silymarin/silybin and chronic liver disease: a marriage of many years. Molecules 2017;22:191. doi: 10.3390/molecules22020191

42. 42. Saller R, Meier R, Brignoli R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. Drugs 2001;61:2035-63. doi: 10.2165/00003495-200161140-00003

43. Mirnezami M, Jafarimanesh H, Rezagholizamenjany M, Alimoradian A, Ranjbaran M. The effect of silymarin on liver enzymes in patients taking isotretinoin: A randomized clinical trial. Dermatol Ther 2020;33:e13236. doi: 10.1111/ dth.13236

44. Khazaei R, Seidavi A, Bouyeh M. A review on the mechanisms of the effect of silymarin in milk thistle (Silybum marianum) on some laboratory animals. J Vet Med 2022;8:289-301. doi: 10.1002/vms3.641

45. Ezhilarasan D, Lakshmi T. A Molecular Insight into the Role of Antioxidants in Nonalcoholic Fatty Liver Diseases. Oxid Med Cell Longev 2022;2022. doi: 10.1155/2022/9233650

46. Aghemo A, Alekseeva OP, Angelico F, Bakulin IG, Bakulina NV, Bordin D, et al. Role of silymarin as antioxidant in clinical management of chronic liver diseases: a narrative review. Ann Med 2022;54:1548-60. doi: 10.1080/07853890.2022.2069854

47. Adelina J-AM. Clinical studies of silymarin as a protective agent against liver damage caused by anti-TB drugs, methotrexate, and in cases of chronic hepatitis C and diabetes mellitus. Pharmacogn J 2022; 14. doi: 10.5530/pj.2022.14.46

48. Mahmoudabad GA, Shirshahi V, Mehrabi M, Gheybi F, Gharravi MA, Salehi M, et al. Phytosome: an effective transdermal drug delivery system for phytoconstituents. Lett Drug Des Discov 2022;20:1020-30. doi: 10.2174/1570180819666220615092854

49. Bharati R, Badola A. Phytosomes–a modernised and new technology: revolutionary progress in the field of pharmacy for enhanced bioavailability of cosmeceuticals and nutraceuticals. World J Pharm Res 2021. doi: 10.20959/wjpr202110- 21164

50. Marczylo TH, Verschoyle RD, Cooke DN, Morazzoni P, Steward WP, Gescher AJ. Comparison of systemic availability of curcumin with that of curcumin formulated with phosphatidylcholine. Cancer Chemother Pharmacol 2007;60:171-7. doi: 10.1007/s00280-006-0355-x

51. Méndez-Sánchez N, Dibildox-Martinez M, Sosa-Noguera J, Sánchez-Medal R, Flores-Murrieta FJ. Superior silybin bioavailability of silybin–phosphatidylcholine complex in oily-medium soft-gel capsules versus conventional silymarin tablets in healthy volunteers. BMC Pharmacol Toxicol 2019;20:1-6. doi: 10.1186/s40360-018-0280-8

52. 52. Pal P, Dave V, Paliwal S, Sharma M, Potdar MB, Tyagi A. Phytosomes—nanoarchitectures' promising clinical applications and therapeutics. Nanopharm Adv Deliv Syst 2021;187-216. doi: 10.1002/9781119711698.ch9

53. Filburn C, Kettenacker R, Griffin D. Bioavailability of a silybin–phosphatidylcholine complex in dogs. J Vet Pharmacol Ther 2007;30: 132-8. doi: 10.1111/j.1365-2885.2007.00834.x

54. Kumar N, Rai A, Reddy ND, Shenoy RR, Mudgal J, Bansal P, et al. Improved in vitro and in vivo hepatoprotective effects of liposomal silymarin in alcohol-induced hepatotoxicity in Wistar rats. Pharmacol Rep 2019;71:703-12. doi: 10.1016/j. pharep.2019.03.013

55. Ahmadi-Ashtiani H, Allameh A, Rastegar H, Soleimani M, Barkhordari E. Inhibition of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase by silymarin in proliferating mesenchymal stem cells: comparison with glutathione modifiers. J Nat Med 2012;66:85-94. doi: 10.1007/s11418-011-0554-6

Journal of Knowledge & Health
in Basic Medical Sciences 2026; Vol 21, No 1

DOI: 10.22100/jkh.v21i1.3616

Original Article

Evaluation of the Protective Effect of Silymarin Phytosome Nanoparticles on Ethanol-Induced Diseas e Toxicity in Rats

Arezoo Gohari Mahmoudabad (M.Sc.)[1,2], Fatemeh Gheybi (Ph.D.)[3], Mohsen Mehrabi (Ph.D.)[2], Alireza Masoudi (Ph.D.)[4], Zeinab Mobasher (Ph.D.)[5], Hamid Vahedi (M.D.)[6,7], Anneh Mohammad Gharravi (Ph.D.)[8,9*], Fatemeh Sadat Bitaraf (M.Sc.)[10], Seyed Mahdi Rezayat Sorkhabadi (Ph.D.)[5]

1- Student Research Committee, School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.
2- Department of Medical Nanotechnology, School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.
3- Department of Medical Biotechnology and Nanotechnology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
4- Department of Pharmacology, School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.
5- Department of Pharmacology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences (TUMS), Tehran, Iran.
6- Clinical Research Development Unit, Imam Hossein Hospital, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.
7- Department of Gastroenterology, School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.
8- Department of Nursing, Gonbad Kavous School of Nursing, Golestan University of Medical Sciences, Gonbad Kavous, Iran.
9- Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.
10- Department of Medical Biotechnology, School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

Received: 9 August 2025**, Accepted:** 3 April 2026

Abstract:

Introduction: *Silymarin, a plant-derived compound with well-established hepatoprotective properties, has demonstrated significant therapeutic potential in the prevention and treatment of various liver diseases, including alcoholic liver disease (ALD). However, its clinical application is limited by low bioavailability and poor absorption, resulting in reduced therapeutic efficacy. In the present study, silymarin phytosome nanoparticles were prepared and evaluated to enhance bioavailability and improve its hepatoprotective effects.*

Methods: *Silymarin phytosome nanoparticles were synthesized using the thin-film hydration method. Physicochemical properties, including particle size, zeta potential, morphology, stability, molecular interactions, entrapment efficiency, and loading capacity, were investigated. Biocompatibility was assessed via MTT assay on mesenchymal stem cells. For the in vivo study, 24 adult male rats were randomly divided into four groups (n=6): control, ethanol, silymarin + ethanol, and silymarin phytosome + ethanol, and the hepatoprotective effects of the formulation were evaluated.*

Results: *Silymarin-loaded phytosome nanoparticles with an average size of approximately 100 nm were successfully synthesized and exhibited favorable biocompatibility. Administration of silymarin phytosome significantly reduced ethanol-induced elevation of liver injury markers (ALT, AST, ALP, GGT, and MDA) while simultaneously increasing the activity of the antioxidant enzyme GPx ($P<0.05$). Histopathological examination further confirmed that the formulation markedly attenuated ethanol-induced tissue damage and structural alterations in the liver.*

Conclusion: *Silymarin phytosome nanoparticles effectively reduced ethanol-induced liver injury by enhancing bioavailability and potentiating antioxidant and hepatoprotective properties. This formulation represents a novel and promising therapeutic strategy for the prevention and treatment of alcoholic liver disease.*

Keywords: Phytosome, Silymarin, Hepatotoxicity, Ethanol.

Conflict of Interest: No

***Corresponding author**: A.M. Gharravi, **Email:** annehgh@yahoo.com*

Citation: Gohari Mahmoudabad A, Gheybi F, Mehrabi M, Masoudi A.R, Mobasher Z, Vahedi H, Gharravi A.M, Bitaraf F.S, Rezayat Sorkhabadi S.M. Evaluation of the protective effect of silymarin phytosome nanoparticles on ethanol-induced disease toxicity in rats. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2026;21(1):29-39.

CC BY NC