Archive of SID

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 10:21 +0430 on Sunday April 30th 2017

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان
مقاله پژوهشی
دوره ۲۳، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۵

مقایسه اثرات درمانی سیلیمارین و نانوسیلیمارین بر مسمومیت کبدی القاء شده با نانوذرات دی اکسید تیتانیوم

اکبر حاجی زاده مقدم [۱،*]، الهام احمدی اوندی [۲]، رضا صیرفی [۳]، محبوبه زارع [۴]

[۱] دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
[۲] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
[۳] استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران
[۴] استادیار، گروه گروه علوم پایه، دانشکده گیاهان دارویی، دانشگاه تخصصی فناوریهای نوین آمل، آمل، ایران

***نویسنده مسئول:** اکبر حاجی زاده مقدم، دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران. ایمیل: a.hajizadeh@umz.ac.ir

DOI: 10.21859/hums-23048

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۹/۰۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۱۱/۱۱

واژگان کلیدی:
نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم
سیلیمارین
نانوکریستال سیلیمارین
آنزیم‌های کبدی

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

چکیده

مقدمه: مطالعات اخیر نشان داده‌اند که نانوذرات دی اکسید تیتانیوم برای انسان سمی هستند. سیلیمارین به عنوان داروی محافظ کبدی شناخته شده است. در این مطالعه از روش ته‌نشینی نانو برای تولید نانوکریستال به منظور بهبود حلالیت سیلیمارین استفاده شد. هدف این مطالعه تعیین نقش حفاظتی سیلیمارین و نانوکریستال آن در درمان آسیب کبدی ناشی از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در موش است.

روش کار: در این مطالعه تجربی، موش‌های صحرایی به پنج گروه کنترل، شم، مسموم شده (تجویز خوراکی نانو دی اکسید تیتانیوم با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت سه هفته) وگروه‌های مسموم درمان شده با سیلیمارین و نانو سیلیمارین (تجویز خوراکی با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت سه هفته پس از تجویز نانو نانوذرات دی اکسید تیتانیوم) تقسیم شدند. در پایان، فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) وآلکالین فسفاتاز (ALP) سرمی و تغییرات هیستولوژیکی کبدی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: مصرف خوراکی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های AST، ALT و ALP ($P < ۰/۰۱$) و ($P < ۰/۰۰۱$) سرمی و قطر هسته هپاتوسیت‌ها گردید ($P < ۰/۰۵$). سیلیمارین و نانوکریستال آن سطوح افزایش یافته آنزیم‌های کبدی ناشی از مصرف نانوذرات دی اکسید تیتانیوم را کاهش داده و همچنین قطر هسته هپاتوسیت‌های موش‌های مسموم شده را کاهش دادند ($P < ۰/۰۰۱$).

نتیجه گیری: یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که سیلیمارین و نانوکریستال آن احتمالاً به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی، سبب حفاظت کبدی در برابر آسیب ناشی از مصرف نانو ذره اکسید تیتانیوم می‌گردد.

مقدمه

امروزه با گسترش فناوری نانو استفاده از نانوذرات در افزودنی‌های مواد غذایی، مواد دارویی، رنگ و لوازم آرایشی توسعه فراوانی یافته است[۱-۳]. اخیراً نانوذرات دی اکسید تیتانیوم به دلیل ثبات بالا به وفور در صنایع مختلف دارویی، آرایشی بهداشتی و پزشکی نیز استفاده می‌شوند[۳]. از طرفی اثرات سمی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بواسطه القا استرس اکسیداتیو و در نتیجه اختلال در عملکرد سیستم‌های مختلف بدن از جمله کبد نیز گزارش شده است[۲, ۴, ۵]. کبد ارگان مهمی برای سم‌زدایی می‌باشد و نانوذرات دی اکسید تیتانیوم توانایی نفوذ به سلول‌های کبدی را دارند. این ترکیبات می‌توانند منجر به شکل‌گیری رادیکال‌های آزاد، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و شروع پراکسیداسیون لیپیدی و درنتیجه آسیب به سلول‌های کبدی شود[۶, ۷]. همچنین نانوذرات دی اکسید تیتانیوم می‌توانند فعالیت آنزیم‌های کبدی ازجمله AST، ALT و ALP را افزایش داده و منجر به ایجاد التهاب و تغییرات بافتی در آن شوند[۴, ۵]. ترکیبات گیاهی در طیف وسیعی از بیماری‌های حاد و مزمن کبدی مورد استفاده قرار می‌گیرند[۸]. سیلیمارین عصاره استاندارد دانه و میوه گیاه خارمریم است[۹-۱۳]. که

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 10:21 +0430 on Sunday April 30th 2017

شامل حدود ۶۵ تا ۸۰ درصد فلاونولیگنان‌های سیلیبین A، سیلیبین B ، ایزوسیلیبینA، ایزوسیلیبینB ، سیلی‌کریستینA، سیلی‌کریستینB و سیلی‌دیانین با مقادیر کمی فلاونوئیدهای تاکسیفولین و در حدود ۲۰ تا ۳۵ درصد از اسیدهای چرب و ترکیبات پلی‌فنولیک می‌باشد. عصاره گیاه خارمریم برای درمان اختلالات کبد و طحال و کیسه صفرا مورد استفاده قرارمی گیرد [۱۳-۱۵]. این کمپلکس آنتی‌اکسیدانی دارای طیف گسترده‌ای از خواص بیولوژیکی ازجمله خواص ضد التهابی و ضد سرطانی، تعدیل کننده سیستم ایمنی، محافظ کبدی، ضد حساسیت، آنتی موتاژنیک، ضد ترومبوز و گشاد کننده عروق می‌باشد[۱۰, ۱۱, ۱۳-۱۵].

یکی از چالش‌های مهم در گسترش فرمولاسیون سیلیمارین حلالیت آبی ضعیف آن است. سیلیمارین دارای خواص بیولوژیکی فراوانی است اما فراهمی زیستی و بهره‌وری درمانی آن توسط حلالیت آبی ضعیف محدود شده است[۹, ۱۴, ۱۶]. تاکنون چندین روش به منظور افزایش حلالیت و فراهمی زیستی داروهای کم‌محلول در آب استفاده شده است. نانومولوسیون، نانوکریستال و نانوذرات پلیمری می‌توانند برای افزایش حلالیت و هدف قراردادن سلول‌های دلخواه با حداقل آسیب به سلول‌های طبیعی استفاده شوند[۹]. نانوکریستال‌ها ذراتی با اندازه‌ای نانومتری هستند. ویژگی مهم داروهای نانوکریستالی افزایش توانایی انتقال آن‌ها از غشای سلول است که سبب استفاده این ترکیبات در مسیرهای مختلفی از جمله تزریقی، دهانی، پوستی، چشمی و ریوی می‌گردد. نانوکریستال‌ها علاوه بر این‌که صد در صد متشکل از دارو هستند، دارای مزایای دیگری ازقبیل افزایش حلالیت اشباع و سرعت انحلال و چسبندگی عالی به سطوح بیولوژیکی می‌باشند[۱۷, ۱۸]. بنابراین، در این مطالعه، اثرات سلیمارین و نانوکریستال آن بر فعالیت آنزیم‌های کبدی و آسیب بافتی کبد ناشی از مصرف نانوذرات دی اکسید تیتانیوم مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

ساخت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم

نانوذرات دی اکسید تیتانیوم با استفاده از روش سل-ژل ساخته شدند. در این روش ۵ میلی‌لیتر محلول $TiCl_4$ در دمای صفر درجه سانتیگراد به آرامی به ۵۰ میلی‌لیتر محلول اتانول اضافه شد. در ادامه برای تکمیل فرآیند آبکافت، محلول به مدت دوساعت در دمای محیط روی همزن مغناطیسی قرارگرفته تا به محلول ژلاتینی زرد روشن تبدیل شد. پس از اتمام زمان ژلاتینه شدن، دما به ۸۷ درجه سانتی‌گراد رسانده شد که طی مدت ۳ روز محلول ژلاتینی زرد رنگ به پودر سفید رنگ تبدیل شد. با ساییده شده پودر سفید رنگ حاصل از فرآیند کلسینه کردن، پودری یکنواخت و ریزتر حاصل گردید[۱۹].

ساخت نانوکریستال سیلیمارین

تهیه نانوکریستال سیلیمارین با استفاده از روش رسوب‌گذاری تبخیری نانوسوسپانسیون انجام شد[۱۸]. بطور خلاصه ابتدا ۱۰ میلی گرم پودرسیلیمارین (شرکت سیگما) در ۱ میلی‌لیتر استون حل شد. سپس به ازای هر میلی لیتر استون ۲۰ میلی‌لیتر هگزان به محلول اضافه گردید. در نهایت نانوکریستال سیلیمارین بوسیله پراندن حلال با روتاری بدست آمد. سایز نانوذرات و خواص فیزیکی و شیمیایی آن‌ها به کمک دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی و دستگاه پراش پرتو X (XRD) تعیین شد.

حیوانات

در این مطالعه تجربی از ۳۵ سر موش نر صحرایی نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم استفاده شد. حیوانات از پژوهشکده انستیتو پاستور شمال خریداری و به منظور سازگاری با محیط به مدت یک هفته در اتاق حیوانات در قفس‌های مخصوص در دمای مناسب (۲ ± ۲۳ درجه سانتی‌گراد) و نور کافی (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری شدند. حیوانات آزمایشگاهی به پنج گروه هفت‌تایی: کنترل، شم، مسموم شده وگروه‌های مسموم تیمار شده با سلیمارین و نانوسیلیمارین تقسیم شدند. گروه شم حلال نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و سیلیمارین، گروه مسموم شده، نانوذرات دی اکسید تیتانیوم را با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۲۱ روز به صورت گاواژ دریافت کردند. همچنین گروه‌های مسموم تیمار شده، سیلیمارین و نانوسیلیمارین را نیز ۲۴ ساعت پس از آخرین گاواژ نانوذرات دی اکسید تیتانیوم، با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۲۱ روز به صورت تک دوز و از طریق گاواژ دریافت کردند.

آنالیز بیوشیمیایی سرم

حیوانات با تزریق مخلوط داروهای کتامین و زایلازین بیهوش شدند و خون‌گیری از قلب آن‌ها انجام شد. خون جمع آوری شده به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد تا سرم از لخته جدا شود[۲۰]. سنجش فعالیت آنزیم کبدی AST با استفاده از کیت آنزیمی CO بیوشیمی (شرکت پارس آزمون Lot no ۹۲۰۰۳)، ALT با استفاده از کیت آنزیمی CO بیوشیمی (شرکت پارس آزمون Lot no ۹۲۰۰۵)، ALP با استفاده از کیت آنزیمی CO بیوشیمی (شرکت پارس آزمون

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 10:21 +0430 on Sunday April 30th 2017

Lot no ۹۲۰۰۳.) و توسط روش پیشنهادی فدراسیون بین المللی شیمی بالینی (IFCC) با کمک دستگاه اتوآنالایزر Cobas Mira انجام شد و سمیت کبدی با تغییر در سطوح AST، ALT و ALP سرم موش تعیین شد.

بررسی بافت شناسی

به منظور تهیه اسلایدهای بافت شناسی، پس از نمونه برداری از بافت کبد، این بافت جهت تثبیت به محلول ثبوتی فرمالین ۱۰ درصد بافری منتقل شد. پس از طی مراحل تثبیت، آماده سازی و قالب‌گیری در پارافین، نمونه‌ها با استفاده ازمیکروتوم با ضخامت ۵ میکرون برش داده شده و با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند. سپس با استفاده ازمیکروسکوپ نوری فاکتور قطر هپاتوسیت ها، قطر هسته هپاتوسیت ها، قطر سینوزوئیدها اندازه گیری و تعداد هپاتوسیت‌ها شمارش گردید.

محاسبات آماری

محاسبات به روش آنالیز واریانس یک طرفه به کمک نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۰ صورت گرفت و به کمک Post Hoc Tukey ادامه یافت. از لحاظ آماری P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شده و برای رسم نمودارها از نرم افزار Sigmaplat ۱۲ استفاده شد.

یافته‌ها

مورفولوژی و سایز ذرات نانو دی اکسید تیتانیوم و نانوکریستال سیلیمارین بوسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت. میانگین سایز ذرات به ترتیب در حدود ۳۰ و ۶۳ نانومتر تعیین شد. نانو دی اکسید تیتانیوم سنتز شده پودری سفید رنگ است که بلورهای آن در فاز آناتاز می‌باشد و به وسیله XRD پایداری حرارتی بالا و خاصیت فوق آب دوستی آن تأیید شده است. در مطالعه حاضر سمیت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر کبد موش نژاد ویستار مورد ارزیابی قرار گرفت. مقایسه نتایج آزمون آماری مربوط به میزان فعالیت آنزیم AST در گروه مسموم شده، در مقایسه با گروه کنترل، افزایش معنی‌دار (P < ۰/۰۱) را نشان می‌دهد. همچنین گروه مسموم تیمار شده با سیلیمارین در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌دار (P < ۰/۰۱) در سطح AST نشان می‌دهد درحالی که گروه مسموم تیمار شده با نانوسیلیمارین افزایش معنی‌داری با گروه کنترل نداشت. سطح AST در گروه مسموم تیمار شده با سیلیمارین در مقایسه با گروه مسموم شده، کاهش داشته اما این کاهش معنی‌دار نبوده در حالی‌که در گروه مسموم تیمار شده با نانو سیلیمارین کاهش معنی‌دار (P < ۰/۰۱) مشاهده شد. مقایسه نتایج آزمون آماری مربوط به میزان فعالیت آنزیم ALT، در گروه مسموم شده در مقایسه با گروه کنترل، افزایش معنی‌دار (P < ۰/۰۱) را نشان می‌دهد. در گروه مسموم تیمار شده با سیلیمارین و نانوسیلیمارین در مقایسه با گروه کنترل کاهش مشاهده شده معنی‌دارنبود. همچنین در سطح ALT سرم گروه مسموم تیمار شده با سیلیمارین و نانوسیلیمارین در مقایسه با گروه مسموم شده، کاهش معنی‌دار (P < ۰/۰۱) مشاهده شد. مقایسه نتایج آزمون آماری مربوط به میزان فعالیت آنزیم ALP، افزایش معنی‌داری (P < ۰/۰۰۱) را در گروه مسموم شده در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد. درحالی که در گروه مسموم تیمار شده با سیلیمارین و نانوسیلیمارین در مقایسه با گروه کنترل، افزایش معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. فعالیت آنزیم ALP در گروه مسموم تیمار شده با سیلیمارین و نانو کریستال آن به ترتیب با P < ۰/۰۱ و P < ۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه مسموم شده بطور معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۱).

جدول ۱: تأثیر سیلیمارین و نانوکریستال آن بر میزان فعالیت آنزیمهای AST، ALT و ALP سرم موش‌های صحرایی مسموم شده با نانودی اکسید تیتانیوم [a]

	ALP سرم، U/L	ALT سرم، U/L	AST سرم، U/L
کنترل	۲۰۹/۲۸ ± ۳۴/۲۸	۶۲/۱۴ ± ۷/۲۸	۱۳۶/۲۸ ± ۹/۸۶
شم	۱۹۶/۵۷ ± ۳۰/۹۸	۵۵/۴۲ ± ۶/۸۰	۱۶۲/۷۱ ± ۳۴/۵۲
نانودی اکسید تیتانیوم	[c] ۲۹۵/۷۱ ± ۵۱/۹۷	[b] ۷۵/۷۱ ± ۷/۴۷	[b] ۱۸۶/۵۷ ± ۳۶/۰۱
سیلیمارین	[d] ۲۴۱/۵۷ ± ۳۱/۶۰	[d] ۶۰/۸۵ ± ۱۰/۹۷	[b] ۱۷۵/۴۲ ± ۲۷/۸۴
نانوکریستال سیلیمارین	[e] ۲۱۵/۰۰ ± ۳۹/۹۹	[d] ۵۹/۴۲ ± ۸/۹۲	[d] ۱۵۳/۰۰ ± ۲۲/۹۶

[a] همه مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشند.
[b] مقادیر معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل P < ۰/۰۱
[c] مقادیر معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل P < ۰/۰۰۱
[d] مقادیر معنی‌دار در مقایسه با گروه مسموم شده P < ۰/۰۱
[e] مقادیر معنی‌داردر مقایسه با گروه مسموم شده P < ۰/۰۰۱

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: تأثیر سیلیمارین و نانوکریستال سیلیمارین بر تغییرات ایجاد شده در فاکتورهای کبدی بافت کبد موش‌های صحرایی مسموم شده با نانودی اکسید تیتانیوم [a]

	تعداد هپاتوسیت/mm^2	قطر هپاتوسیت µm	قطر سینوزوئید µm	قطر هسته هپاتوسیت µm
کنترل	۵۳۶/۸۰ ± ۴۹/۹۲	۱۳/۵۸ ± ۰/۶	۴/۹۱ ± ۰/۵۵	۶/۹۳ ± ۰/۱۶
شم	۵۶۹/۴۴ ± ۱۹	۱۴/۷۰ ± ۰/۴	۴/۷۱ ± ۰/۳۷	۷/۲۰ ± ۰/۰۶
نانودی اکسید تیتانیوم	۵۱۰/۹۶ ± ۱۰۵/۲۴	۱۵/۴۸ ± ۲/۷۵	۴/۷۴ ± ۰/۹۶	۶[b]/۳۲ ± ۰/۴۸
سیلیمارین	۴۵۷/۴۴ ± ۷۸/۸۱	۱۳/۵۵ ± ۴	۵/۳۰ ± ۰/۸۹	۷[c]/۰۷ ± ۰/۳۱
نانوکریستال سیلیمارین	۴۹۴/۴۰ ± ۲۲/۴۹	۱۵/۴۷ ± ۰/۶۲	۵/۶۶ ± ۱/۰۱	۷[c]/۲۸ ± ۰/۱۱

[a] همه مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشند.

[b] مقادیر معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل $P < ۰/۰۱$

[c] مقادیر معنی‌دار در مقایسه با گروه مسموم شده $P < ۰/۰۰۱$

مطالعات بافتی

با توجه به داده‌های بافتی بدست آمده از مطالعه حاضر، در اندازه قطر هسته هپاتوسیت کاهش معنی‌دار ($P < ۰/۰۱$) در گروه مسموم شده نسبت به گروه کنترل، مشاهده می‌شود. در گروه‌های مسموم تیمار شده با سیلیمارین و نانوسیلیمارین در مقایسه با گروه کنترل، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد و در این گروه‌ها در مقایسه با گروه مسموم شده، افزایش معنی‌دار ($P < ۰/۰۰۱$) مشاهده می‌شود. در گروه مسموم تیمار شده با نانوسیلیمارین در مقایسه با گروه مسموم تیمار شده با سیلیمارین افزایش قطر هسته هپاتوسیت مشاهده شد اما این افزایش معنی‌دار نبود. در ارزیابی تعداد هپاتوسیت، قطر هپاتوسیت و قطر سینوزوئید در گروه مسموم شده نسبت به گروه کنترل، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین در گروه مسموم تیمار شده با سیلیمارین و نانوسیلیمارین در مقایسه با گروه کنترل و گروه مسموم شده، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در گروه مسموم تیمار شده با نانوسیلیمارین در مقایسه با گروه مسموم تیمار شده با سیلیمارین اگرچه افزایش تعداد هپاتوسیت، قطر هپاتوسیت و قطر سینوزوئید مشاهده شد اما این افزایش معنی‌دار نبود (جدول ۲).

بحث

ذرات دی اکسید تیتانیوم مورد استفاده در صنعت دارای امنیت بالا برای مصرف کننده می‌باشند و قرارگرفتن در معرض این مواد نسبتاً بی ضرر است[۱]. با این حال مطالعات اخیر نشان داده است که نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بدلیل ایجاد استرس اکسیداتیو برای انسان و حیوانات سمی هستند[۲, ۳]. نیمه‌عمر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم برای ذرات زیر ۲۵۰ نانومتر حدوداً ۵۴۱ روز می‌باشد که مشاهده شده که قرار گرفتن در معرض این نانوذرات می‌تواند باعث آسیب‌های اکسیداتیو و اختلال در عملکرد کبد می‌شود[۴, ۱۲]. مطالعات انجام شده در رابطه با سمیت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در موش بالغ نشان می‌دهد که نانوذرات دی اکسید تیتانیوم می‌تواند آسیب کبدی را ایجاد و حمله اکسیداتیو را در کبد موش القا کند[۲۱]. براساس نتایج بیوشیمیایی این مطالعه، مواجهه موش‌ها با نانوذرات دی اکسید تیتانیوم موجب افزایش معنی‌دار مقادیر آنزیم‌های سرمی AST، ALT و ALP شد و این نشان دهنده سمیت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر کبد موش صحرایی است. در راستای این پژوهش، مطالعه لئو و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داد که نانوذرات دی اکسید تیتانیوم با تزریق داخل صفاقی می‌توانند فعالیت AST، ALT و ALP را افزایش دهند و باعث ایجاد آسیب در عملکرد کبد شوند که با نتایج ما همخوانی دارد[۷]. ALT و AST جزء آنزیم‌های غیرعملکردی پلاسما هستندکه به طور طبیعی در سلول‌های برخی از اندام‌ها از جمله کبد قرارگرفته‌اند. مطالعات روی آسیب کبدی ناشی از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم افزایش سطح سرمی آنزیم‌های ALT و AST را نشان می‌دهد که ممکن است این افزایش بدلیل تغییر در نفوذپذیری غشای پلاسمایی سلول‌های کبدی و یا صدمات سلولی حاصل از قرار گرفتن درمعرض نانوذرات دی اکسید تیتانیوم باشد[۲۲, ۲۳]. پیشنهاد شده است که نانوذرات دی اکسید تیتانیوم می‌توانند با پروتئین‌ها و آنزیم‌های بافت بینابینی کبد واکنش داده و منجر به التهاب ،افزایش شاخص‌های التهابی در این بافت شوند[۶]. اثرات حفاظتی عصاره خارمریم توسط وایت و همکارانش گزارش شده است. در مطالعات پیشین مشاهده شده که عصاره خارمریم نه‌تنها با رادیکال‌های آزاد مضر کونژوگه می‌شود بلکه پاسخ‌های پیش‌التهابی ناشی از

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 10:21 +0430 on Sunday April 30th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 10:21 +0430 on Sunday April 30th 2017

افزایش سطوح $TGF\ B_1$ و TNF-a را سرکوب می‌کند[۲۴]. در پژوهش انجام شده افزایش سطح AST، ALT و ALP سرم در موش‌های مسموم شده با نانوذرات دی اکسید تیتانیوم پس از درمان با سیلیمارین و نانوسیلیمارین به طور معنی‌داری کاهش یافت. این یافته نشان می‌دهد که سیلیمارین و نانوکریستال آن با حفظ یکپارچگی غشای پلاسمایی، تمایل به جلوگیری از آسیب کبد داشته و در نتیجه موجب سرکوب نشت آنزیم از میان غشاء شده و به این صورت فعالیت محافظت کبدی را به نمایش می‌گذارد. این مورد ممکن است دلیلی برای تصحیح سطح سرمی آنزیم‌های نشانگر در طول استفاده از سیلیمارین و نانوکریستال آن باشد[۲۴]. همچنین نتایج نشان می‌دهد که نانوسیلیمارین افزایش رخ داده در سطح AST، ALT و ALP سرم در موش‌های مسموم شده با نانوذرات دی اکسید تیتانیوم را بیشتر از سیلیمارین کاهش می‌دهد. این نتایج را می‌توان بوسیله بالاتر بودن فراهمی زیستی[۹] و بیشتر بودن خواص آنتی‌اکسیدانی[۱۴] نانوسیلیمارین نسبت به سلیمارین توجیه کرد. علاوه بر این در این پژوهش تغییرات فاکتورهای بافتی بافت کبد از جمله تعداد هپاتوسیت، قطر هپاتوسیت، قطر هسته هپاتوسیت و قطر سینوزوئید در کبد بررسی شد. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، اندازه قطر هسته هپاتوسیت‌ها در گروه مسموم شده کاهش یافته است. همچنین در ارزیابی تعداد هپاتوسیت‌ها، قطر هپاتوسیت‌ها و قطر سینوزوئیدها در گروه مسموم شده نسبت به گروه کنترل، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشده است. تغییرات در سلول‌های کبدی می‌تواند به وسیله متابولیسم مواد سمی در کبد ایجاد شود. مطالعات متعددی وجود دارد که تغییرات بافتی مشابه ناشی از قرار گرفتن در معرض مواد شیمیایی سمی متفاوت را نشان می‌دهد. برانبک و همکارانش در سال ۱۹۹۰ نشان دادند که هرگونه تغییر در اندازه و شکل هسته سلول‌های کبدی می‌تواند به عنوان نشانه‌ای از افزایش فعالیت متابولیک سلول‌ها باشد اما ممکن است منشأ پاتولوژیکی نیز داشته باشد[۲۵]. در مطالعه منفرد و همکارانش در سال ۲۰۱۲، آسیب کبدی ماهی قزل آلای رنگین‌کمان ناشی از غلظت‌های مختلف فنل مورد ارزیابی قرار گرفت. در پایان دوره مورد مطالعه در گروه مسموم شده با فنل کاهش قابل توجهی درقطر هسته هپاتوسیت ها مشاهده گردید که با نتایج ما همخوانی دارد . در این پژوهش کاهش در قطرسلول‌های هپاتوسیت و افزایش در حجم سینوزوئید نیز مشاهده گردید[۲۶].

در پژوهش حاضر در گروه مسموم تیمار شده با سیلیمارین و نانوسیلیمارین، قطر هسته هپاتوسیت‌ها افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه مسموم شده نشان داد. در گروه مسموم تیمار شده با نانوسیلیمارین در مقایسه با گروه مسموم تیمار شده با سیلیمارین این افزایش بیشتر بود، هرچند که این افزایش معنی‌دار نبود. پروین و همکارانش در سال ۲۰۱۱، درحیوانات مسموم شده با CCl_4 تحت درمان با سیلیمارین (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) اتساع سینوزوئیدهای اطراف ورید مرکزی را مشاهده نمودند و در درمان با نانوسیلیمارین پارانشیم نرمال کبدی مشاهده گردید[۲۷]. تغییرات ساختاری دیده شده در بررسی حاضر احتمالاً نتیجه تشکیل رادیکال‌های آزاد توسط نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و همچنین توانایی این ترکیبات در تخریب غشای پلاسمایی هپاتوسیت‌ها می‌باشد. نانوذرات دی اکسید تیتانیوم پس از ورود به سلول دیگر توزیع آزادانه در سیتوپلاسم را ندارند اما ترجیحاً در میتوکندری تجمع می‌یابند. هنگامی‌که میتوکندری توسط نانوذرات دی اکسید تیتانیوم مورد حمله قرار می‌گیرد، توانایی دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌تواند تغییر کند[۵، ۲۸]. عملکرد آنتی‌اکسیدانی سیلیمارین و نانوکریستال آن، جلوگیری از تشکیل رادیکال‌های آزاد با مهار ویژه آنزیم‌های تولید کننده گونه‌های فعال اکسیژن‌دار و بهبود انسجام میتوکندری در شرایط استرس می‌باشد[۱۳].

نتیجه گیری

تغییرات معنی‌دار در پارامترهای بیوشیمیایی سرم و بافتی کبد موش‌های سوری قرار گرفته در معرض نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بیانگر صدمات بافتی است. این یافته‌ها نشان می‌دهد نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در طول ۲۱ روز متوالی ممکن است باعث ایجاد هپاتوتوکسیسیتی در موش صحرایی شود. همچنین درمان با سیلیمارین و نانو ذرات آن احتمالاً از طریق خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود و جلوگیری از تشکیل رادیکال‌های آزاد موجب بهبود آسیب کبدی می‌گردد. علاوه بر این از آنجا که نانوذرات سیلیمارین قدرت بیشتری در مهار رادیکال‌های آزاد نسبت به سیلیمارین خام دارد. درنتیجه درمان موش‌های مسموم شده به وسیله نانوذرات دی اکسید تیتانیوم با نانوسیلیمارین موثرتر از سیلیمارین می‌باشد.

سپاسگزاری

از همکاری صمیمانه معاونت پژوهشی دانشگاه مازندران به سبب تأمین مالی این پژوهش و همچنین از سرکار خانم خانجانی به دلیل کمک بی دریغ ایشان تقدیر و قدردانی می‌شود. ضمناً نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان در تعارض نمی‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 10:21 +0430 on Sunday April 30th 2017

REFERENCES

1. Iavicoli I, Leso V, Fontana L, Bergamaschi A. Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vitro mammalian studies. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2011;15(5):481-508. PMID: 21744743
2. Younes NR, Amara S, Mrad I, Ben-Slama I, Jeljeli M, Omri K, et al. Subacute toxicity of titanium dioxide (TiO2) nanoparticles in male rats: emotional behavior and pathophysiological examination. Environ Sci Pollut Res Int. 2015;22(11):8728-37. DOI: 10.1007/s11356-014-4002-5 PMID: 25572266
3. Buettner GR. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. Anticancer Agents Med Chem. 2011;11(4):341-6. PMID: 21453242
4. Cui Y, Gong X, Duan Y, Li N, Hu R, Liu H, et al. Hepatocyte apoptosis and its molecular mechanisms in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. J Hazard Mater. 2010;183(1-3):874-80. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2010.07.109 PMID: 20724067
5. Cui Y, Liu H, Zhou M, Duan Y, Li N, Gong X, et al. Signaling pathway of inflammatory responses in the mouse liver caused by TiO2 nanoparticles. J Biomed Mater Res A. 2011;96(1):221-9. DOI: 10.1002/jbm.a.32976 PMID: 21105171
6. Abu-Dief EE, Khalil KM, Abdel-Aziz HO, Nor-Eldin EK, Ragab EE. Histological Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles in Adult Male Albino Rat Liver and Possible Prophylactic Effects of Milk Thistle Seeds. Life Sci J. 2015;12(2):1-9.
7. Liu H, Ma L, Zhao J, Liu J, Yan J, Ruan J, et al. Biochemical toxicity of nano-anatase TiO2 particles in mice. Biol Trace Elem Res. 2009;129(1-3):170-80. DOI: 10.1007/s12011-008-8285-6 PMID: 19066734
8. Hernandez I, Alegre L, Van Breusegem F, Munne-Bosch S. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? Trends Plant Sci. 2009;14(3):125-32. DOI: 10.1016/j.tplants.2008.12.003 PMID: 19230744
9. Ahmad U, Faiyazuddin M, Hussain MT, Ahmad S, M Alshammari T, Shakeel F. Silymarin: an insight to its formulation and analytical prospects. Acta Physiol Plant. 2015;37(11). DOI: 10.1007/s11738-015-2008-3
10. Chtourou Y, Garoui el M, Boudawara T, Zeghal N. Protective role of silymarin against manganese-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rat. Environ Toxicol. 2014;29(10):1147-54. DOI: 10.1002/tox.21845 PMID: 23339144
11. Kaur G, Athar M, Alam MS. Dietary supplementation of silymarin protects against chemically induced nephrotoxicity, inflammation and renal tumor promotion response. Invest New Drugs. 2010;28(5):703-13. DOI: 10.1007/s10637-009-9289-6 PMID: 19590824
12. Lee DY, Liu Y. Molecular structure and stereochemistry of silybin A, silybin B, isosilybin A, and isosilybin B, Isolated from Silybum marianum (milk thistle). J Nat Prod. 2003;66(9):1171-4. DOI: 10.1021/np030163b PMID: 14510591
13. Surai PF. Silymarin as a Natural Antioxidant: An Overview of the Current Evidence and Perspectives. Antioxidants (Basel). 2015;4(1):204-47. DOI: 10.3390/antiox4010204 PMID: 26785346
14. Hsu WC, Ng LT, Wu TH, Lin LT, Yen FL, Lin CC. Characteristics and antioxidant activities of silymarin nanoparticles. J Nanosci Nanotechnol. 2012;12(3):2022-7. PMID: 22755015
15. Shaker E, Mahmoud H, Mnaa S. Silymarin, the antioxidant component and Silybum marianum extracts prevent liver damage. Food Chem Toxicol. 2010;48(3):803-6. DOI: 10.1016/j.fct.2009.12.011 PMID: 20034535
16. Adhikari M, Arora R. Nano-silymarin provides protection against gamma-radiation-induced oxidative stress in cultured human embryonic kidney cells. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2015;792:1-11. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2015.08.006 PMID: 26433256
17. Junghanns JU, Muller RH. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. Int J Nanomedicine. 2008;3(3):295-309. PMID: 18990939
18. Sahoo G, Kakran M. Fabrication of Nanoparticles of Silymarin, Hesperetin and Glibenclamide by Evaporative Precipitation of Nanosuspension for Fast Dissolution. Pharm Anal Acta. 2014;06(01). DOI: 10.4172/2153-2435.1000326
19. Shahab Ansari A, Mohammad P, Azarmidokht H. Synthesis of TiO2–Ag nanocomposite with sol–gel method and investigation of its antibacterial activity against E. coli. Powder Technol. 2009;196(3):241-5. DOI: 10.1016/j.powtec.2009.07.021
20. Chen J, Dong X, Zhao J, Tang G. In vivoacute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitioneal injection. J Appl Toxicol. 2009;29(4):330-7. DOI: 10.1002/jat.1414
21. Ma L, Zhao J, Wang J, Liu J, Duan Y, Liu H, et al. The Acute Liver Injury in Mice Caused by Nano-Anatase TiO2. Nanoscale Res Lett. 2009;4(11):1275-85. DOI: 10.1007/s11671-009-9393-8
22. Choudhary N, Sharma M, Verma P, Joshi SC. Hepato and nephrotoxicity in rat exposed to endosulfan. J Environ Biol. 2003;24(3):305-8. PMID: 15259607
23. Post-White J, Ladas EJ, Kelly KM. Advances in the use of milk thistle (Silybum marianum). Integr Cancer Ther. 2007;6(2):104-9. DOI: 10.1177/1534735407301632 PMID: 17548789
24. Pradeep K, Mohan CV, Gobianand K, Karthikeyan S. Silymarin modulates the oxidant-antioxidant imbalance during diethylnitrosamine induced oxidative stress in rats. Eur J Pharmacol. 2007;560(2-3):110-6. DOI: 10.1016/j.ejphar.2006.12.023 PMID: 17300777
25. Braunbeck T, Storch V, Bresch H. Species-specific reaction of liver ultrastructure in zebrafish (Brachydanio rerio) and trout (Salmo gairdneri) after prolonged exposure to 4-chloroaniline. Archi Environ Contam Toxicol. 1990;19(3):405-18. DOI: 10.1007/bf01054986
26. Monfared AL, Salati AP. Histomorphometric and biochemical studies on the liver of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) after exposure to sublethal concentrations of phenol. Toxicol Ind Health. 2013;29(9):856-61. DOI: 10.1177/0748233712451765 PMID: 22740621
27. Parveen R, Baboota S, Ali J, Ahuja A, Vasudev SS, Ahmad S. Effects of silymarin nanoemulsion against carbon tetrachloride-induced hepatic damage. Arch Pharm Res. 2011;34(5):767-74. DOI: 10.1007/s12272-011-0510-8 PMID: 21656362
28. Chang X, Zhang Y, Tang M, Wang B. Health effects of exposure to nano-TiO2: a meta-analysis of experimental studies. Nanoscale Res Lett. 2013;8(1):51. DOI: 10.1186/1556-276X-8-51 PMID: 23351429

www.SID.ir

Archive of SID

Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences Original Article

No 82, Volume 23, Issue 4

Comparison of the Therapeutic Effects of Silymarin and Nanosilymarin on Hepatotoxicity Induced by Titanium Dioxide Nanoparticles

Akbar Hajizadeh Moghaddam [1,*], Elham Ahmadi Avendi [2], Reza Sayrafi [3], Mahboobeh Zare [4]

[1] *Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran*
[2] *MSc Student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran*
[3] *Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran*
[4] *Assistant Professor, Faculty of Herb, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran*

** Corresponding author: Akbar Hajizadeh Moghaddam, Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran. E-mail: a.hajizadeh@umz.ac.ir*

DOI: 10.21859/hums-23048

Received: 22.11.2016

Accepted: 30.01.2017

Keywords:
Titanium Dioxide Nanoparticles
Silymarin
Nanocrystal
Liver Enzymes

How to Cite this Article:
Hajizadeh Moghaddam A, Ahmadi Avendi E, Sayrafi R, Zare M. Comparison of the Therapeutic Effects of Silymarin and Nanosilymarin on Hepatotoxicity Induced by Titanium Dioxide Nanoparticles. *Sci J Hamadan Univ Med Sci.* 2017;**23**(4):345-351. DOI: 10.21859/hums-23048

© 2017 Hamadan University of Medical Sciences.

Abstract

Introduction: Recent studies have indicated that titanium dioxide nanoparticles (TiO2 NPs) are toxic for human. Silymarin is a well-known hepatoprotective drug. In this study, the nanoprecipitation technique was used for nanocrystals to improve the solubility of silymarin. The aim of this study was to analyze the protective role of silymarin and its nanocrystal on liver damage due to TiO2 NPs in rat.

Methods: In this experimental study, rats were divided to five groups in separate cages: Control, vehicle, toxic group (150 mg/kg TiO2 NPs for three weeks orally) as well as silymarin and silymarin NPs groups (100 mg/kg for three weeks orally after TiO2 NPs administration). Then, the serum level of aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP) as well as the liver histological changes were investigated.

Results: Oral administration of Tio2 NPs resulted in significantly elevated levels of ALT, AST and ALP of serum and significantly increased the core diameter of hepatocytes ($P < 0.05$). Silymarin and its nanocrystal reduced the elevated liver enzyme levels and also decreased the core diameter of hepatocytes in toxic rats ($P < 0.001$).

Conclusion: The results from the present study indicated that silymarin and its nanocrystal probably due to antioxidant effects cause hepatoprotective against TiO2 NPs-induced liver injury.

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 10:21 +0430 on Sunday April 30th 2017

www.SID.ir