

Comparison of the Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Silymarin and Nano-Silymarin in Hyperlipidemic Rats

R. Mohebbati (PhD)¹ , M. A. Momeni-Moghaddam (PhD)² , S. Mehrabi (MD)³ ,
A. Abbasnezhad (PhD)^{*1} , M. Shokrgozar (MD)¹ , M. Alishahi (MD)¹ ,
D. Salarbashi (PhD)² , S. H. Abtahi (PhD)² , Z. Heydarnia (MSc)¹ 

1.Nursing Research Center, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, I.R.Iran.

2.Department of Nutrition, Clinical Biochemistry and Food Sciences, Faculty of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, I.R.Iran.

3.Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, I.R.Iran.

*Corresponding Author: A. Abbasnezhad (PhD)

Address: Department of Physiology, Faculty of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, I.R.Iran.

Tel: +98 (51) 57225027. E-mail: abbasnezhad.abbasali@gmail.com

Article Type ABSTRACT

Research Paper

Background and Objective: For centuries, medicinal plants have been used in the treatment of many diseases and hyperlipidemia. The present study was conducted to compare the antioxidant and anti-inflammatory effects of silymarin and nano-silymarin in hyperlipidemic rats receiving a high-fat diet (HFD).

Methods: In this experimental study, 35 male rats were divided into 5 groups of 7, including control, negative control (HFD), HFD and atorvastatin (20 mg/kg) (positive control), HFD and silymarin (100 mg/kg), and HFD and nano-silymarin (100 mg/kg). Receiving a high-fat diet for 12 weeks induced oxidative stress. Drugs were administered through gavage feeding for 12 weeks. Finally, blood samples were taken to measure lipid profile, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 17, malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD).

Findings: Nano-silymarin was able to significantly reduce triglyceride levels by 2.93 units compared to the negative control ($p<0.001$), but the reduction of cholesterol and LDL-C by nano-silymarin was not significant. TNF- α in the negative control group was significantly higher by 31 units compared to the control ($p=0.006$). TNF- α and interleukin 17 levels were not significantly reduced in the groups receiving atorvastatin, silymarin and nano-silymarin compared to the negative control group. MDA levels in the negative control group increased by 0.8 units compared to the control group ($p=0.001$), but in the silymarin, nano-silymarin and atorvastatin groups, they showed a significant decrease by 0.8, 1 and 0.9 units compared to the negative control group, respectively ($p<0.001$).

Conclusion: According to the results of this study, the use of nano-silymarin compared to silymarin in rats receiving a high-fat diet led to a relative reduction in lipid profiles, but there was no difference in terms of antioxidant and anti-inflammatory properties.

Keywords: Silymarin, Nanoparticles, Oxidative Stress, Inflammation, Hyperlipidemia.

Received:

Aug 18th 2024

Revised:

Sep 25th 2024

Accepted:

Oct 12nd 2024

Cite this article: Mohebbati R, Momeni-Moghaddam MA, Mehrabi S, Abbasnezhad A, Shokrgozar M, Alishahi M, et al. Comparison of the Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Silymarin and Nano-Silymarin in Hyperlipidemic Rats. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2025; 27: e58.

مقایسه اثرات آنتی اکسیدانی و ضد التهابی سلیمارین و نانوسلیمارین در موش‌های صحرایی هایپر لیپیدمیک

رضا محبتی (PhD)^۱، محمد امین مومنی مقدم (PhD)^۲، سعید محرابی (MD)^۳،
عباسعلی عباس نژاد (PhD)^{۱*}، مطهره شکرگزار (MD)^۱، مریم علیشاهی (MD)^۱،
داود سالارباشی (PhD)^۲، سید حسین ابطحی (PhD)^۲، زینت حیدرنیا (MSc)^۱

۱. مرکز تحقیقات پرستاری، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران

۲. گروه تغذیه، بیوشیمی بالینی و علوم غذایی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران

۳. گروه پزشکی داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران

نوع مقاله چکیده

مقاله پژوهشی

سابقه و هدف: گیاهان دارویی قرن‌هاست که در درمان بسیاری از بیماری‌ها و چربی خون استفاده می‌شوند. این مطالعه با هدف مقایسه اثرات آنتی اکسیدانی و ضد التهابی سلیمارین و نانوسلیمارین در موش‌های هایپر لیپیدمیک تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب (HFD) انجام شد. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی ۳۵ موش صحرایی نر به ۵ گروه ۷ تایی شامل شاهد، کنترل منفی (HFD)، HFD و آتورواستاتین (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) (کنترل مثبت)، HFD و سلیمارین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و HFD و نانوسلیمارین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تقسیم شدند. تغذیه با رژیم غذایی پرچرب به مدت ۱۲ هفته سبب القاء استرس اکسیداتیو شد. داروها نیز به مدت ۱۲ هفته گاوژ شدند. در پایان، نمونه خون برای اندازه گیری پروفایل لیپیدی، فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF-α)، اینترلوکین ۱۷، مالون دی آلدئید (MDA) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) گرفته شد.

یافته‌ها: نانوسلیمارین توانست سطح تری گلیسرید را به طور معنی‌داری نسبت به کنترل منفی به میزان ۹۳/۲ واحد کاهش دهد ($p < 0.001$)، اما کاهش کلسترول و LDL-C توسط نانوسلیمارین معنی‌دار نبود. TNF-α در گروه کنترل منفی به طور معنی‌داری به میزان ۳۱ واحد بالاتر از شاهد بود ($p = 0.006$). گروه‌های دریافت‌کننده آتورواستاتین، سلیمارین و نانوسلیمارین سطح TNF-α و اینترلوکین ۱۷ را نسبت به گروه کنترل منفی به طور غیر معنی‌داری کاهش دادند. سطح MDA در گروه کنترل منفی نسبت به گروه شاهد به میزان ۰/۸ واحد افزایش یافت ($p = 0.001$) ولی در گروه‌های سلیمارین، نانوسلیمارین و آتورواستاتین نسبت به گروه کنترل منفی کاهش معنی‌داری به ترتیب به میزان ۰/۸، ۱ و ۰/۹ واحد را نشان داد ($p < 0.001$).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این مطالعه، استفاده از نانوسلیمارین در مقایسه با سلیمارین در موش‌های تحت تیمار با رژیم غذایی پرچرب منجر به کاهش نسبی پروفایل لیپیدی شده در حالی که از نظر خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی تفاوتی با هم نداشتند.

واژه‌های کلیدی: سلیمارین، نانوذره، استرس اکسیداتیو، التهاب، هایپر لیپیدمی.

استناد: رضا محبتی، محمد امین مومنی مقدم، سعید محرابی، عباسعلی عباس نژاد، مطهره شکرگزار، مریم علیشاهی و همکاران. مقایسه اثرات آنتی اکسیدانی و ضد التهابی سلیمارین و نانوسلیمارین در موش‌های صحرایی هایپر لیپیدمیک. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل. ۱۴۰۴؛ ۲۷: ۲۷-۳۵.

این مقاله مستخرج از پایان نامه مطهره شکرگزار دانشجوی رشته پزشکی عمومی و طرح تحقیقاتی به شماره پ.ع/۹۴/۱۲۸ دانشگاه علوم پزشکی گناباد می‌باشد.

* مسئول مقاله: دکتر عباسعلی عباس نژاد

رایانامه: abbasnezhad.abbasali@gmail.com

آدرس: گناباد، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی. تلفن: ۰۵۱-۵۷۲۲۵۰۲۷

مقدمه

هایپرلیپیدمی ناشی از افزایش چربی یا لیپوپروتئین در خون است. بر اساس نوع افزایش چربی، هایپرلیپیدمی به هایپرتری گلیسیریدمی، هایپرکلسترولمی یا ترکیبی از هر دو تقسیم می‌شود (۱). اختلالات غذایی، چاقی، بیماری‌های ژنتیکی یا سایر بیماری‌ها مانند دیابت، همگی می‌توانند منجر به افزایش چربی خون شوند (۲). احتمال بروز بیماری‌های قلبی عروقی در بیماران مبتلا به هایپرلیپیدمی دو برابر بیشتر است. بر اساس مطالعات بالینی، خطر نارسایی قلبی غیر ایسکمیک در هایپرلیپیدمی افزایش می‌یابد، در حالی که کاهش لیپیدهای سرم می‌تواند اختلال عملکرد قلب را معکوس کند. علاوه بر این که عملکرد قلب به طور غیرمستقیم تحت تأثیر هایپرلیپیدمی از طریق آترواسکلروز است، اما تأثیر مستقیمی بر عملکرد سیستمیک و پاسخ الکتروفیزیولوژیک قلب نیز دارد. قلب مستقیماً تحت تأثیر هایپرلیپیدمی قرار می‌گیرد، اما مکانیسم اصلی آن به طور کامل شناخته نشده است (۳).

التهاب نقش مهمی در شکل‌گیری و پیشرفت تصلب شرایین و در نتیجه بیماری‌های قلبی عروقی دارد. امروزه نقش موثر سیستم ایمنی و متعاقب آن التهاب سیستمیک به خوبی مشخص شده است. سطوح متعدد شواهد از مدل‌های تجربی و ارزیابی هیستوپاتولوژیک بافت‌ها تا نشانگرهای زیستی سیستمیک و انجمن‌های اپیدمیولوژیک یا بالینی نشان داده‌اند که التهاب یکی از مکانیسم‌های اساسی در بی‌ثباتی پلاک آتروژنیک است که منجر به رویدادهای بالینی می‌شود. چندین نشانگر التهابی با سطوح لیپید و روند آترواسکلروز مرتبط هستند. شناخته شده‌ترین آن‌ها IL-6 (اینترلوکین ۶) و اینترلوکین ۱β، پروتئین واکنشی C، TNF-α (فاکتور نکروز تومور آلفا)، پنتراکسین-۳، آمیلوئید سرم A، پروتئین جذب‌کننده شیمیایی مونوسیت-۱، کموکاین ۱۶ می‌باشد (۴).

هایپرلیپیدمی نه تنها به طور مستقیم بلکه به طور غیرمستقیم از طریق تحریک رادیکال‌های آزاد اکسیژن در تسریع روند تشکیل پلاک‌های آترواسکلروتیک در ایجاد بیماری عروقی کرونر قلب موثر است (۵).

استرس اکسیداتیو یک آسیب بافتی است که در اثر تولید بیش از حد ترکیبات اکسیدکننده یا ناکارآمدی مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی در حذف آن‌ها ایجاد می‌شود. ترکیبات اکسیداتیو می‌توانند به طور طبیعی در بدن تولید شوند، اما فعال شدن نامناسب استرس اکسیداتیو می‌تواند باعث آسیب عروقی و تصلب شرایین شود. در حضور استرس اکسیداتیو، مولکول‌ها به راحتی اکسید می‌شوند و LDL-C (لیپوپروتئین با چگالی کم) و مولکول‌های اکسید شده باعث شروع و تشدید التهاب عروقی، تشکیل پلاک‌های آترواسکلروتیک و تصلب شرایین می‌شوند (۶). پیشرفت بیماری قلبی عروقی آترواسکلروتیک اغلب تحت تأثیر التهاب، استرس اکسیداتیو و دیس لیپیدمی است (۷).

گیاه مریم گلی با نام علمی *Salvia officinalis* گیاهی است که نقش عمده‌ای در بهبود اختلالات متابولیک ایفا می‌کند (۸). عصاره این گیاه حاوی فلاونوئیدهایی است که مجموعه این فلاونوئیدها که سلیمارین نامیده می‌شود، عمده اسانس این گیاه را تشکیل می‌دهد (۹). سلیمارین دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی است و رادیکال‌های آزاد را کاهش می‌دهد و پراکسیداسیون لیپیدی را مهار می‌کند و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) را افزایش می‌دهد (۱۰). علاوه بر این، اثرات ضد التهابی دارد و هنگامی که پارانشیم کبد آسیب می‌بیند، سنتز پروتئین توسط سلول‌های کبدی را افزایش می‌دهد (۱۱). اثرات قابل توجهی نیز بر روی آسیب کلیوی دارد (۱۲). حلالیت ضعیف در آب یک چالش بزرگ در توسعه فرمولاسیون سلیمارین است (۱۳). سلیمارین دارای خواص بیولوژیکی متعددی است، اما حلالیت آبی ضعیف آن مانع فراهمی زیستی و کارایی درمانی آن می‌شود (۱۴-۱۶). لیپوزوم‌ها، نانوامولسیون‌ها، میسل‌ها، نانوکریستال‌ها و نانوذرات پلیمری می‌توانند برای افزایش حلالیت و هدف قرار دادن سلول‌های مورد نظر با حداقل آسیب به سلول‌های طبیعی استفاده شوند.

در مطالعه دیگر که توسط Nouri و همکاران صورت گرفت، اثر آنتی‌اکسیدانی سلیمارین در برابر آسیب کلیوی ناشی از دیکلوفناک بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گروه دریافت‌کننده سلیمارین نسبت به گروه آسیب‌افزایش‌دهنده معنی‌داری داشت و میزان مالون دی‌آلدئید، اوره، کراتینین و بیان ژن فاکتور التهاب کاهش بسزایی داشته است (۱۷). همچنین در مطالعات آزمایشگاهی مشخص شده است که سلیمارین جذب کلسترول را به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد و در نتیجه باعث کاهش کلسترول خون و سطح LDL-C و افزایش سطح HDL-C خون می‌شود (۱۸). با توجه به ارتباط استرس اکسیداتیو و عوامل التهابی با افزایش چربی خون، این مطالعه با هدف تعیین و مقایسه اثرات نانوسلیمارین، سلیمارین و اتورواستاتین بر پروفایل لیپیدی، استرس اکسیداتیو و التهاب در موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی پس از تایید در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی گناباد با کد IR.GMU.REC.1400.070 بر روی ۳۵ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار که در مرکز آزمایشگاهی حیوانات دانشگاه علوم پزشکی گناباد با وزن ۲۷۰ تا ۳۳۰ گرم نگهداری می‌شدند، انجام شد. حیوانات با نگهداری به

مدت دو هفته در دمای متوسط 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد با محیط سازگار شدند. اصول اخلاقی کار با حیوانات در طول چرخه ۱۲ ساعته نور- تاریکی و دسترسی رایگان به غذا و آب، رعایت شد. در این مطالعه نمونه‌گیری به روش در دسترس و تخصیص حیوان در گروه‌های مختلف به صورت تصادفی انجام شد. جهت محاسبه حجم نمونه از روش برابرسازی منابع استفاده شد (۱۹). در این روش، مقدار E که درجه آزادی استفاده شده در آزمون اثر "متغیر" در آنالیز واریانس (ANOVA) است از این فرمول زیر محاسبه شد:

تعداد کل گروه‌ها - تعداد کل واحدهای آزمون = E

$$E = (6 \times 5) - 5 = 25$$

ابتدا تعداد نمونه در هر گروه را ۶ در نظر گرفتیم. تعداد گروه‌ها هم ۵ گروه بود و مقدار E محاسبه شد:

برای محاسبه تلفات احتمالی، درصد مرگ و میر احتمالی ضرب در تعداد حیوانات محاسبه شده برای هر گروه شد و در فرمول زیر تعداد حیوان مورد نیاز برای هر گروه مشخص شد:

تعداد حیوانات مورد نیاز برای هر گروه = تعداد حیوانات محاسبه شده + (درصد مرگ و میر احتمالی $\times$ تعداد حیوانات محاسبه شده)

بر این اساس تعداد حیوانات مورد نیاز با لحاظ مرگ و میر احتمالی برای هر گروه، ۷ سر موش صحرایی تعیین شد و چون ۵ گروه داشتیم تعداد کل حیوانات مورد نیاز برای این مطالعه ۳۵ سر موش صحرایی تعیین گردید.

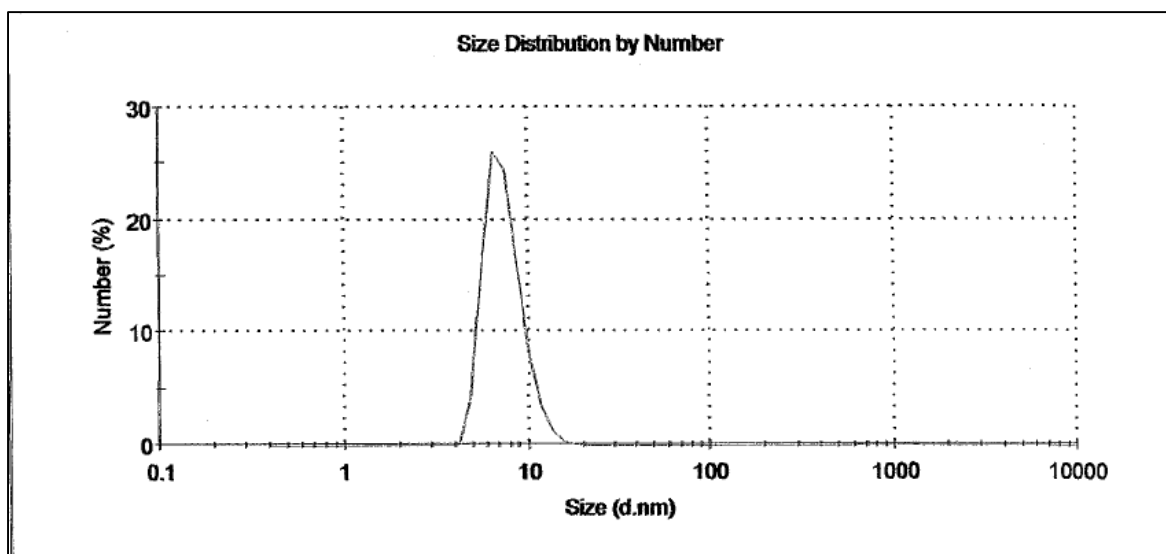
موش‌های صحرایی به طور تصادفی به ۵ گروه ۷ تایی: گروه ۱ (گروه شاهد) (C): تغذیه با جیره استاندارد + ۱ میلی‌لیتر نرمال سالین روزانه با گاوآبه مدت ۱۲ هفته، گروه ۲ (گروه کنترل منفی) (C-): تغذیه با رژیم غذایی پرچرب بدون درمان + ۱ میلی‌لیتر نرمال سالین روزانه با گاوآبه مدت ۱۲ هفته، گروه ۳ (گروه کنترل مثبت) (C+): تغذیه با رژیم غذایی پرچرب + ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آتورواستاتین روزانه از طریق گاوآبه مدت ۱۲ هفته (۲۰)، گروه ۴ (گروه سیلیمارین) (S): تغذیه با رژیم غذایی پرچرب + ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سیلیمارین روزانه از طریق گاوآبه مدت ۱۲ هفته (۲۱)، گروه ۵ (گروه نانو سیلیمارین) (NS): تغذیه با رژیم غذایی پرچرب + ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو سیلیمارین روزانه به صورت گاوآبه مدت ۱۲ هفته (۲۱) تقسیم شدند.

به منظور ایجاد یک رژیم غذایی پرچرب جهت القا هایپرلیپیدمی و استرس اکسیداتیو و التهاب، به مدت ۱۲ هفته از غذای استاندارد جوندگان به میزان ۴۵٪ به همراه ۴۹/۵٪ چربی دم گوسفند، ۰/۲٪ پودر کلسترول و ۰/۵٪ آرد گندم استفاده شد و به صورت نامحدود در دسترس حیوانات قرار گرفت (۲۳ و ۲۲). روش تهیه غذا بدین صورت بود که ابتدا مواد لازم را با توجه به درصد موجود در فرمول، وزن کرده و پلیت‌های استاندارد غذا را پودر و سپس روغن دنبه گوسفند ذوب شده (دارای ۸۷/۸٪ چربی)، کلسترول و آرد گندم به این پودر اضافه شد. پس از همگن شدن این ترکیب، خمیر به دست آمده مجدداً به صورت گلوله تهیه شد و تا زمان خشک شدن در دمای اتاق نگهداری شد. آتورواستاتین از شرکت اکتور تهیه گردید.

تهیه نانوسیلیمارین به صورت محلول کلوتیدی در شیشه کهربایی توسط شرکت Exirnano Sina انجام شد. گزارش پراکندگی دینامیک نور (DLS) در شکل ۱ نشان داده شده است. با استفاده از DLS می‌توان قطر هیدرودینامیکی نانوذرات در محلول را اندازه‌گیری کرد و وضعیت تجمع آن‌ها را تعیین نمود. محلول نانوسیلیمارین در دمای اتاق و دور از نور نگهداری شد. از غلظت ۱۰٪ محلول استفاده شد به این صورت که با سرم دکستروز ۵٪ به نسبت ۱:۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم برای استفاده روزانه از طریق گاوآبه برای هر حیوان رقیق گردید. موش‌های صحرایی پس از ۱۲ هفته مجدداً وزن شده و پس از ۱۲ ساعت ناشتایی با داروهای کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به روش تزریق داخل صفاقی (IP) بیهوش شدند و پس از برش شکم، نمونه خون از اپیکس قلب گرفته شد.

برای تهیه سرم، نمونه‌های خون با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. پس از آن، نمونه‌های سرم در فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان تجزیه و تحلیل نگهداری شدند. اندازه‌گیری پروفایل لیپیدی (کلسترول، تری‌گلیسرید، HDL-C)، نشانگرهای استرس اکسیداتیو (MDA (مالون دی‌آلدهید)، SOD) سرم با استفاده از کیت‌های استاندارد (پارس آزمون، IR) انجام شد. همچنین از معادله فریدوالد برای تعیین میزان LDL-C در سرم استفاده شد (۲۴).

برای اندازه‌گیری سایتوکاین‌ها از روش الایزا (ELISA) استفاده شد (Carmania Parsgen Co.). اصول ELISA همان اصول پایه ایمنولوژی یعنی اتصال اختصاصی آنتی‌ژن آنتی‌بادی است. در روش Sandwich ELISA برای شناسایی آنتی‌ژن اختصاصی (TNF- α و IL-17)، در ته ظرف آنتی‌بادی اختصاصی متصل بوده و برای جلوگیری از اتصال غیر اختصاصی بقیه ظرف با آلبومین سرم گاوی پوشانده شده و با اضافه شدن مایع حاوی آنتی‌ژن مورد سنجش، آنتی‌ژن به آنتی‌بادی ته ظرف متصل می‌شود، پس از شستشو آنتی‌بادی اولیه اضافه شده که اپی‌توپ دیگری از آنتی‌ژن را شناسایی کرده و به همراه آنتی‌بادی ته ظرف آنتی‌ژن را در میان خود می‌گیرند (Sandwich)، پس از شستشو آنتی‌بادی ثانویه اضافه می‌شود که آنزیم اختصاصی HRP به آن متصل است و این آنتی‌بادی ثانویه به آنتی‌بادی اولیه متصل می‌شود، پس از شستشو سوبسترای آنزیم اضافه شده که به وسیله آنزیم به محصولی تبدیل شده که رنگی متفاوت از سوبسترا ایجاد می‌کند. بر اساس همین تغییر رنگ سنجش کمی انجام شد.



شکل ۱. گزارش DLS برای نمونه نانوسیلیمارین

برای مقایسه متغیرها بین گروه‌های مختلف پس از تایید نرمال بودن با آزمون کولموگروف اسمیرنوف، از آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه و برای مقایسه زوجی برای گروه‌ها از تست تعقیبی توکی استفاده شد. برای توصیف متغیرهای کمی از شاخص‌های مرکزی (میانگین) و پراکندگی (انحراف استاندارد) استفاده شد و $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

گروه کنترل منفی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری در سطح کلاسترول سرم نشان داد ($p < 0.001$). کاهش قابل توجهی در سطح کلاسترول در گروه کنترل مثبت در مقایسه با گروه شاهد وجود داشت ($p = 0.025$). سطح کلاسترول سرم در گروه‌های دریافت کننده سیلیمارین و نانوسیلیمارین در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری بالاتر بود ($p < 0.001$). گروه‌هایی که سیلیمارین و نانوسیلیمارین دریافت کردند، کاهش سطح کلاسترول را نسبت به گروه کنترل منفی نشان دادند، اما معنی‌دار نبود (جدول ۱).

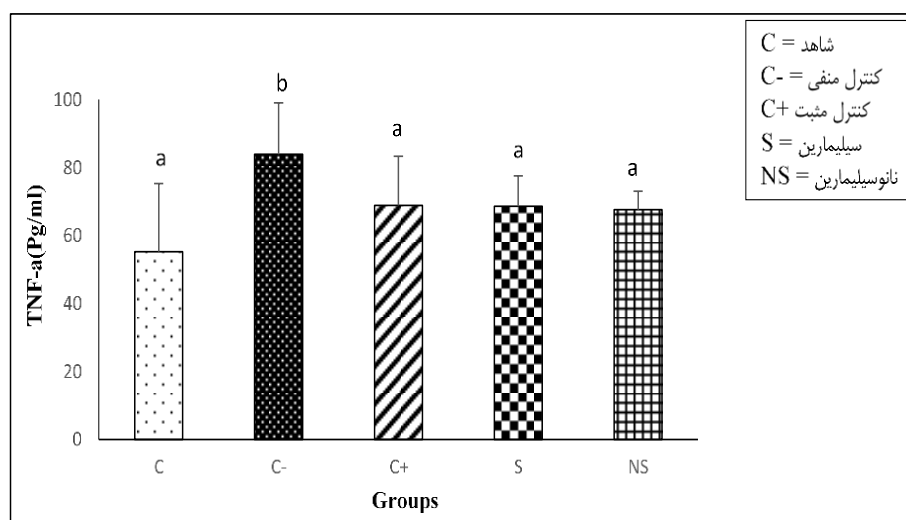
جدول ۱. سطح سرمی پروفایل لیپیدی در گروه‌های مورد مطالعه ($n=7$)

گروه	پروفایل لیپیدی	کلاسترول	تری گلیسیرید	HDL-C	LDL-C
		Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD
شاهد		۶۲/۲۸±۷/۰۴ ^a	۶۱/۸۷±۳۰/۳۴ ^a	۳۵±۳۴/۵ ^a	۱۴/۹±۹۴/۶ ^a
کنترل منفی		۱۲۲/۱۴±۸۹/۲۰ ^b	۲۲۶/۷۱±۶۳/۴۸ ^b	۲۸/۷۱±۴۲/۳ ^a	۴۸/۰۸±۹۲/۱۹ ^b
کنترل مثبت		۹۴±۷۳/۹ ^c	۹۸/۶۶±۴۵/۰۳ ^c	۳۳/۸۳±۹۹/۶ ^a	۴۰/۴۳±۴۸/۵ ^a
سیلیمارین		۱۱۵/۴۵±۵۷/۲۳ ^a	۱۶۹/۱۶±۳۷/۴۱ ^d	۲۸/۳۳±۵۶/۶ ^a	۵۳/۲۸±۶۶/۱۸ ^a
نانو سیلیمارین		۱۱۳/۱۶±۲۳/۲۱ ^a	۱۳۳/۵۵±۴۴/۴۱ ^c	۳۴/۳۸±۵۸/۸ ^a	۵۲/۰۸±۹۱/۱۵ ^a
	p-value	<0.05	<0.05	>0.05	<0.05

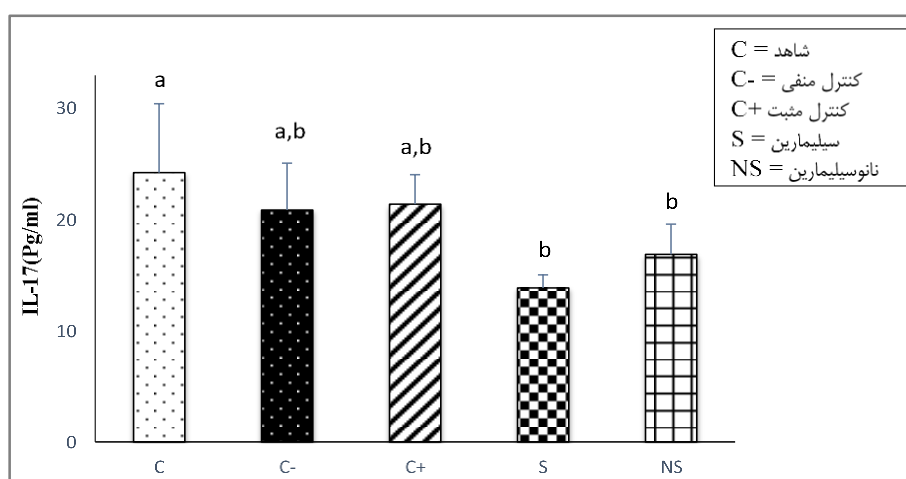
a: عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها، b: تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد، c: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل منفی و d: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل مثبت.

بر اساس نتایج، گروه کنترل منفی در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری در سطح تری گلیسرید خود نشان داد ($p < 0.001$). کاهش معنی‌داری در سطح تری گلیسرید در گروه کنترل مثبت در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد ($p < 0.001$). گروه دریافت کننده نانوسیلیمارین کاهش معنی‌داری در میانگین تری گلیسرید داشتند که در مقایسه گروه کنترل منفی با گروه دریافت کننده نانوسیلیمارین مشهود بود ($p = 0.004$). گروه کنترل مثبت در مقایسه با گروه سیلیمارین کاهش قابل توجهی در میانگین تری گلیسرید نشان دادند ($p = 0.049$) (جدول ۱). هیچ تفاوتی در سطح HDL-C بین گروه‌ها وجود ندارد. همانطور که نتایج نشان داد، گروه کنترل منفی افزایش معنی‌داری در سطوح LDL-C سرم نسبت به گروه شاهد داشت ($p = 0.002$). گروه کنترل مثبت کاهش جزئی در LDL-C را در نتیجه مقایسه مشاهده کردند که معنی‌دار نبود (جدول ۱).

در بین گروه‌های مختلف، تنها میانگین $TNF-\alpha$ در گروه کنترل منفی به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود ($p = 0.006$). گروه‌های دریافت کننده آتورواستاتین، سیلیمارین و نانوسیلیمارین سطح $TNF-\alpha$ را نسبت به گروه کنترل منفی کاهش دادند، اما معنی‌دار نبود (شکل ۲). تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل منفی و گروه شاهد از نظر IL-17 وجود نداشت. از نظر سطح سرمی IL-17 بین گروه‌های درمانی و گروه کنترل منفی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. میانگین IL-17 در گروه‌های دریافت کننده سیلیمارین ($p = 0.001$) و نانوسیلیمارین ($p = 0.018$) به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود. کاهش معنی‌داری در سطح سرمی IL-17 بین گروه سیلیمارین و کنترل منفی مشاهده شد ($p = 0.020$). همچنین استفاده از سیلیمارین باعث کاهش معنی‌دار سطح سرمی IL-17 نسبت به آتورواستاتین شد ($p = 0.020$) (شکل ۳).

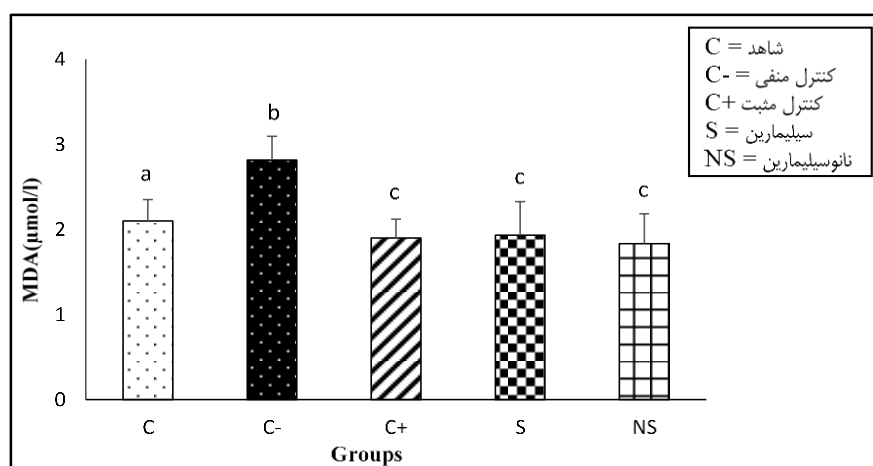


شکل ۲. مقایسه میانگین سطوح سرمی $TNF-\alpha$ در گروه‌های مورد مطالعه ($n=7$)

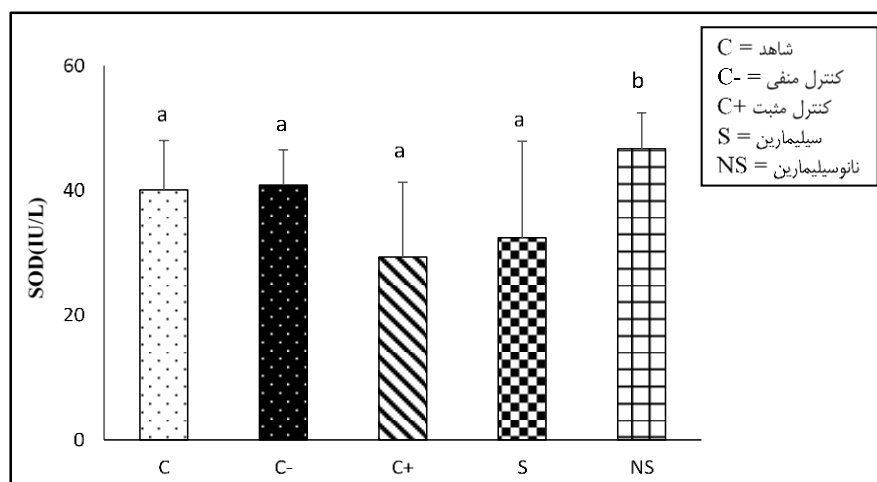


شکل ۳. مقایسه میانگین سطوح سرمی IL-17 در گروه‌های مورد مطالعه ($n=7$)

سطح MDA در گروه کنترل منفی نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($p=0/001$). مقایسه سطح فاکتور MDA در گروه‌های سلیمارین، نانوسیلیمارین و آتورواستاتین نسبت به گروه کنترل منفی کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p<0/001$). با این حال، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های دریافت‌کننده سلیمارین، نانوسیلیمارین و آتورواستاتین از نظر تغییرات سطح فاکتور MDA مشاهده نشد (شکل ۴). در نتیجه آزمون تعقیبی توکی، تفاوت معنی‌داری بین سطح SOD در گروه شاهد و کنترل منفی مشاهده نشد. گروه‌های دریافت‌کننده آتورواستاتین و سلیمارین سطح SOD را نسبت به گروه کنترل منفی کاهش دادند، اما معنی‌دار نبود. مقایسه سطوح SOD در گروه نانوسیلیمارین افزایش معنی‌داری را در سطح نسبت به گروه کنترل مثبت نشان داد ($p=0/039$). تفاوت معنی‌داری بین سایر گروه‌ها وجود نداشت (شکل ۵).



شکل ۴. مقایسه میانگین سطوح سرمی MDA در گروه‌های مورد مطالعه (n=۷)



شکل ۵. مقایسه میانگین سطوح سرمی SOD در گروه‌های مورد مطالعه (n=۷)

بحث و نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که نانوسیلیمارین سبب کاهش معنی‌دار سطح تری گلیسرید خون نسبت به گروه کنترل منفی گردید، در حالی که میزان کاهش کلسترول تام و LDL-C نسبت به گروه کنترل منفی معنی‌دار نبود. میزان MDA در گروه کنترل منفی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت و در گروه‌های درمان این مارکر نسبت به گروه کنترل منفی کاهش معنی‌داری نشان داد. در رابطه با سایتوکاین‌های التهابی، تنها $TNF-\alpha$ افزایش معنی‌داری در گروه کنترل منفی نسبت به گروه شاهد داشت.

رژیم غذایی پرچرب باعث استرس اکسیداتیو و التهاب می‌شود. هایپرلیپیدمی به عنوان یک عامل خطر آشکار برای بیماری‌های قلبی عروقی در نظر گرفته می‌شود (۲۵). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مصرف رژیم پرچرب توانسته باعث افزایش معنی‌داری TG، کلسترول و LDL-C سرمی و همچنین کاهش HDL-C گردد. مصرف سیلیمارین به همراه رژیم غذایی پرچرب باعث کاهش کلسترول و TG شد ولی این کاهش معنی‌دار نبود. مصرف نانوسیلیمارین باعث کاهش معنی‌دار TG نسبت به گروه کنترل منفی گردید ولی کاهش کلسترول در این گروه معنی‌دار نبود. اثر کاهنده کلسترول و TG نانوسیلیمارین نسبت به سیلیمارین بیشتر بوده است. این مطالعه نشان می‌دهد که فناوری نانو ذرات توانسته است اثرات درمانی سیلیمارین را بهبود بخشد. مطالعه Mohebbati و همکاران، اثرات افزایشدهنده ویتامین ث بر میزان کلسترول در رت‌های هایپرلیپیدمیک ناشی از آدریامایسین را نشان داد. بنابراین عوامل آنتی اکسیدان می‌توانند اثرات معکوس نیز بر میزان کلسترول داشته باشند (۲۶). در تایید نتایج مطالعه ما، El-Kot و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که تفاوت معنی‌داری بین موش‌های تیمار شده با سیلیمارین نسبت به گروه کنترل در رابطه با میزان تری گلیسرید وجود نداشت. با این حال، میزان LDL-C در موش‌های تیمار شده با سیلیمارین نسبت به گروه کنترل بیشتر بود (۲۷). در مطالعه Mohammadi و همکاران مشخص گردید که بین سطح پروفایل لیپیدی و گلوکز خون در دو گروه قبل از شروع در مقایسه با پایان مطالعه تفاوت معنی‌داری وجود نداشت و بنابراین یافته‌های این پژوهش هم‌مسو با یافته‌های مطالعه ما بود (۲۸). در مطالعه دیگری که توسط Isfahani و همکاران انجام شد، مشخص گردید که پارامترهای پروفایل لیپیدی در گروه تیمار شده با نانومیسل نسبت به گروه تیمار شده با عصاره سیلیمارین به طور معنی‌داری کاهش یافت (۲۹). در مطالعه ما نیز نانوسیلیمارین توانسته منجر به کاهش بیشتر TG و کلسترول نسبت به سیلیمارین گردد.

آتورواستاتین و سیلیمارین برای افزایش اثر هایپولیپیدمیک، کاهش تجمع چربی نابجا و بهبود متابولیسم گلوکز و همچنین افزایش اثرات آنتی اکسیدانی و ضد التهابی استفاده شدند (۳۰). مطالعه حاضر نشان داد که در گروه کنترل منفی افزایش معنی‌داری در فاکتور التهابی $TNF-\alpha$ نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. میزان اثربخشی نانوسیلیمارین، سیلیمارین و آتورواستاتین بر $TNF-\alpha$ در موش‌های صحرایی تغذیه شده با رژیم پرچرب متفاوت است. با وجود اینکه میانگین فاکتور التهابی $TNF-\alpha$ در سه گروه موش‌های دریافت‌کننده سیلیمارین، نانوسیلیمارین و آتورواستاتین کمتر از گروه کنترل منفی بود؛ اما تفاوت معنی‌داری بین این گروه‌ها با گروه کنترل منفی وجود نداشت. بین سه گروه نانوسیلیمارین، سیلیمارین و آتورواستاتین نیز از نظر تغییرات سطح فاکتور التهابی $TNF-\alpha$ تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد.

در مطالعه حاضر، بین تجویز سیلیمارین (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه) و $TNF-\alpha$ ارتباط معنی‌دار مشاهده نشد که احتمالاً علت مغایرت نتایج می‌تواند ناشی از تفاوت در رژیم غذایی مورد استفاده و نیز دوز سیلیمارین تجویز شده باشد. در مطالعه انجام شده توسط Nouri و همکاران برای تعیین تأثیر نفروپروتکتیو سیلیمارین در برابر آسیب کلیوی ناشی از دیکلوفناک و استرس اکسیداتیو، نشان داده شد که سیلیمارین باعث کاهش معنی‌دار $TNF-\alpha$ در مقایسه با بقیه گروه‌ها شد (۱۷). در مطالعه انجام شده توسط Amin و همکاران برای بررسی اثرات ضد التهابی، ضد هایپرلیپیدمی سیلیمارین در موش و موش آلبینو، سطح سرمی $TNF-\alpha$ دو ساعت بعد از استفاده از سیلیمارین به شدت کاهش یافت (۳۱). در مطالعه حاضر، تأثیر سیلیمارین بر سطح $TNF-\alpha$ موش‌های هایپرلیپیدمی بررسی شد و دوز روزانه سیلیمارین به جای ۱۵۰ میلی گرم، ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم بود. مصرف سیلیمارین باعث کاهش سطح $TNF-\alpha$ نسبت به گروه کنترل منفی شده بود، اما معنی‌دار نبود، که دلیل این تفاوت می‌تواند اختلاف در آخرین زمان تیمار موش‌ها در مطالعه حاضر (یک روز قبل) و مطالعه ذکر شده (۲ ساعت قبل) و دوز دارو مورد استفاده باشد.

Talaei و همکاران طی مطالعه‌ای تأثیر آتورواستاتین را بر شاخص‌های التهابی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ بررسی نمودند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل، سطح $TNF-\alpha$ در گروه مداخله به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت. محققان اظهار داشتند که آتورواستاتین علاوه بر اثرات مفید درمانی بر روی پروفایل لیپیدی، می‌تواند بر مهار فرآیندهای التهابی نیز تأثیر داشته باشد (۳۲). در مطالعه حاضر نیز سطح فاکتور $TNF-\alpha$ در گروه دریافت‌کننده آتورواستاتین (کنترل مثبت) کمتر از گروه کنترل بود، اما به لحاظ آماری معنی‌دار نبود. ممکن است علت مغایرت نتایج ناشی از تفاوت در نمونه‌های پژوهش (مطالعه تجربی در مقابل کارآزمایی بالینی) یا حجم نمونه (۳۵ سر موش صحرایی در مقابل ۸۸ نفر انسان) و یا دوز آتورواستاتین مصرفی (۲۰ میلی گرم روزانه در مقابل ۴۰ میلی گرم روزانه) باشد. در مطالعه ما، $TNF-\alpha$ به طور قابل توجهی در گروه کنترل منفی افزایش یافت در حالی که IL-17 در این گروه تغییر نکرده است. احتمالاً هایپرلیپیدمی القایی نمی‌تواند بر روی Th 17 برای تولید IL-17 تأثیر بگذارد (۳۳). سیلیمارین همچنین می‌تواند $TNF-\alpha$ و IL-17 را به دلیل خواص ضد التهابی کاهش دهد. سیلیمارین خاصیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی دارد و باعث کاهش رادیکال‌های آزاد و مهار پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در گلبول‌های قرمز می‌شود. علاوه بر این، از طریق مهار فاکتور هسته‌ای kB (NF-kB) دارای اثرات ضد التهابی است. هنگامی که پارانشیم کبد آسیب می‌بیند، باعث مقاومت در برابر کاهش ذخایر گلوکوتایون می‌شود و سنتز پروتئین توسط سلول‌های کبدی را افزایش می‌دهد (۱۱). در مطالعات قبلی، مشاهده شده است که سیلیمارین نه تنها با رادیکال‌های آزاد مضر ترکیب می‌شود، بلکه پاسخ‌های پیش التهابی ناشی از افزایش سطح $TNF-\alpha$ را نیز سرکوب می‌کند (۳۴).

در مطالعه‌ای که Balouchi و همکاران بر سطوح سرمی سایتوکین‌های IL-10، IL-17 و IL-23 در بیماران بتا تالاسمی ماژور انجام دادند، کاهش قابل توجهی در سطح سرمی IL-10 در بیماران تحت درمان با سیلیمارین در مقایسه با مقادیر IL-10 در ابتدا مشاهده شد. با این حال، تفاوت معنی‌داری بین مقادیر پایه سایتوکاین در مقایسه با مقادیر نهایی در گروه دارونما مشاهده نشد. در مطالعه حاضر استفاده از سیلیمارین سبب کاهش سطح IL-17 شده که علت می‌تواند تفاوت در مقدار دوز روزانه سیلیمارین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز در مقایسه با ۴۲۰ میلی‌گرم در روز) و نیز تفاوت در جامعه منتخب (موش در برابر انسان) باشد (۳۵).

در این مطالعه میزان MDA در گروه کنترل منفی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت و در گروه‌های تیمار شده با سیلیمارین، نانوسیلیمارین و اتورواستاتین این مارکر نسبت به گروه کنترل منفی کاهش معنی‌داری نشان داد. هم‌راستا با این نتایج، در مطالعه انجام شده توسط Nouri و همکاران در موش‌های صحرایی تیمار شده با سیلیمارین مشخص گردید که سطح سرمی MDA کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشت (۱۷). با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، نانوسیلیمارین در کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو برتری نسبت به سیلیمارین نداشت. احتمالاً دلایل مختلفی برای این وضعیت وجود دارد. تغییرات pH و دما می‌تواند بر تجمع نانوذرات موثر باشد و منجر به بی‌اثری نسبی نانوسیلیمارین شود. در هاپرلیپیدمی به دلیل افزایش اسیدهای چرب در خون، اسیدیته خون افزایش می‌یابد و احتمالاً این تغییر pH خون می‌تواند بر تجمع نانوذرات تأثیر بگذارد.

بر اساس نتایج این مطالعه، استفاده از نانوسیلیمارین در مقایسه با سیلیمارین در موش‌های تحت درمان با رژیم غذایی پرچرب منجر به کاهش نسبی پروفایل لیپیدی شده است، در حالی که از نظر خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی تفاوتی با هم ندارند. تغییرات pH و دما می‌تواند بر روی تجمع نانوذرات موثر باشد و احتمالاً باعث ناکارآمدی نسبی نانوسیلیمارین می‌شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از زحمات معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گناباد به جهت حمایت از تحقیق قدردانی می‌گردد.

References

- 1.Steinberg D. Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part V: the discovery of the statins and the end of the controversy. *J Lipid Res.* 2006;47(7):1339-51.
- 2.Sudhakaran S, Bottiglieri T, Tecson KM, Kluger AY, McCullough PA. Alteration of lipid metabolism in chronic kidney disease, the role of novel antihyperlipidemic agents, and future directions. *Rev Cardiovasc Med.* 2018;19(3):77-88.
- 3.Yao YS, Li TD, Zeng ZH. Mechanisms underlying direct actions of hyperlipidemia on myocardium: an updated review. *Lipids Health Dis.* 2020;19(1):23.
- 4.Papapanagiotou A, Siasos G, Kassi E, Gargalionis AN, Papavassiliou AG. Novel Inflammatory Markers in Hyperlipidemia: Clinical Implications. *Curr Med Chem.* 2015;22(23):2727-43.
- 5.Prasad K. Hypocholesterolemic and antiatherosclerotic effect of flax lignan complex isolated from flaxseed. *Atherosclerosis.* 2005;179(2):269-75.
- 6.Esper RJ, Nordaby RA, Vilariño JO, Paragano A, Cacharrón JL, Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol.* 2006;5:4.
- 7.Rader DJ, Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature.* 2008;451(7181):904-13.
- 8.Alsherif DA, Hussein MA, Abuelkasem SS. *Salvia officinalis* Improves Glycemia and Suppresses Pro-inflammatory Features in Obese Rats with Metabolic Syndrome. *Curr Pharm Biotechnol.* 2024;25(5):623-36.
- 9.Mohammed HA, Eldeeb HM, Khan RA, Al-Omar MS, Mohammed SAA, Sajid MSM, et al. Sage, *Salvia officinalis* L., Constituents, Hepatoprotective Activity, and Cytotoxicity Evaluations of the Essential Oils Obtained from Fresh and Differently Timed Dried Herbs: A Comparative Analysis. *Molecules.* 2021;26(19):5757.
- 10.Mohebbati R, Momeni-Moghaddam MA, Asghari R, Abbasnezhad A, Ebrahim Zadeh Bideskan A, Salarbashi D, et al. The comparison of the effects of nano-silymarin and silymarin on high-fat diet-induced fatty liver of adult male rats. *Avicenna J Phytomed.* 2024;14(3):365-75.
- 11.Soto C, Recoba R, Barrón H, Alvarez C, Favari L. Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2003;136(3):205-12.
- 12.Khajavi Rad A, Mohebbati R, Hosseinian S. Drug-induced Nephrotoxicity and Medicinal Plants. *Iran J Kidney Dis.* 2017;11(3):169-79.
- 13.Jacobs BP, Dennehy C, Ramirez G, Sapp J, Lawrence VA. Milk thistle for the treatment of liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Med.* 2002;113(6):506-15.
- 14.Adhikari M, Arora R. Nano-silymarin provides protection against γ -radiation-induced oxidative stress in cultured human embryonic kidney cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2015;792:1-11.
- 15.Ahmad U, Faiyazuddin M, Hussain MT, Ahmad S, M Alshammari T, Shakeel F. Silymarin: an insight to its formulation and analytical prospects. *Acta physiologiae plantarum.* 2015;37(11):253.
- 16.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.
- 17.Nouri A, Heidarian E. Nephroprotective effect of silymarin against diclofenac-induced renal damage and oxidative stress in male rats. *J Herbmmed Pharmacol.* 2019;8(2):146-52.

18. Polachi N, Bai G, Li T, Chu Y, Wang X, Li S, et al. Modulatory effects of silibinin in various cell signaling pathways against liver disorders and cancer - A comprehensive review. *Eur J Med Chem.* 2016;123:577-95.
19. Ahmadi-Noorbakhsh S. Sample size calculation for animal studies-with emphasis on the ethical principles of reduction of animal use. *Res Med.* 2018;42(3):144-53.
20. Farrag SM, Hamzawy MA, El-Yamany MF, Saad MA, Nassar NN. Atorvastatin in nano-particulate formulation abates muscle and liver affliction when coalesced with coenzyme Q10 and/or vitamin E in hyperlipidemic rats. *Life Sci.* 2018;203:129-40.
21. Hajizadeh Moghaddam A, Ahmadi Avendi E, Sayraf R, Zare M. Comparison of the Therapeutic Effects of Silymarin and Nanosilymarin on Hepatotoxicity Induced by Titanium Dioxide Nanoparticles. *Avicenna J Clin Med.* 2017;23(4):345-51. [In Persian]
22. Ghaeni Pasavei A, Mohebbati R, Jalili-Nik M, Mollazadeh H, Ghorbani A, Nosrati Tirkani A, et al. Effects of *Rhus coriaria* L. hydroalcoholic extract on the lipid and antioxidant profile in high fat diet-induced hepatic steatosis in rats. *Drug Chem Toxicol.* 2021;44(1):75-83.
23. Pasavei AG, Mohebbati R, Boroumand N, Ghorbani A, Hosseini A, Jamshidi ST, et al. Anti-Hypolipidemic and Anti-Oxidative Effects of Hydroalcoholic Extract of *Origanum majorana* on the Hepatosteatorosis Induced with High-Fat Diet in Rats. *Malays J Med Sci.* 2020;27(1):57-69.
24. Puavilai W, Laorugpongse D, Deerochanawong C, Muthapongthavorn N, Srilert P. The accuracy in using modified Friedewald equation to calculate LDL from non-fast triglyceride: a pilot study. *J Med Assoc Thai.* 2009;92(2):182-7.
25. Nelson RH. Hyperlipidemia as a risk factor for cardiovascular disease. *Prim Care.* 2013;40(1):195-211.
26. Mohebbati R, Khajavi Rad A, Naser Shafei M, Soukhtanloo M, Hosseini S, Beheshti F, et al. The effects of vitamin C on adriamycin-induced hypercholesterolemia in rat. *Current Nutrition & Food Science.* 2015;11(4):309-14.
27. El-Kot SM, Wanas W, Hafez AM, Mahmoud NA, Tolba AM, Younis AH, et al. Effect of silymarin on the relative gene expressions of some inflammatory cytokines in the liver of CCl₄-intoxicated male rats. *Sci Rep.* 2023;13(1):15245.
28. Mohammadi SM, Rezazadeh S, Ziaee M, Fallah Huseini H. Clinical efficacy of Silybum marianum seed extract in treatment of type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic fatty liver disease: a narrative review. *J Med Plants.* 2020;19(73):12-26. [In Persian]
29. Isfahani YS, Aslani A, Memarzadeh MR, Aarabi MH. Preventive effect of novel nanomicelle of silymarin on liver injury induced by carbon tetrachloride in rat. *Sci J Kurdistan Univ Med Sci.* 2021;26(2):1-11. [In Persian]
30. Marková I, Malínská H, Hüttl M, Mikláňková D, Oliarnyk O, Poruba M, et al. The combination of atorvastatin with silymarin enhances hypolipidemic, antioxidant and anti-inflammatory effects in a rat model of metabolic syndrome. *Physiol Res.* 2021;70(1):33-43.
31. Amin MM, Arbid MS. Estimation of the novel antipyretic, anti-inflammatory, antinociceptive and antihyperlipidemic effects of silymarin in Albino rats and mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2015;5(8):619-23.
32. Talaei A, Mahmudpour M, Shahdoost M. The Effect of Atorvastatin on Inflammatory Markers in Patients with Type Two Diabetes. *J Arak Univ Med Sci.* 2018;21(4):40-7. [In Persian]

- 33.Ma X, Liu S, Li T, Yuan H. Intensive statin treatment ameliorate the Th17/Treg functional imbalance in patients with non-ST elevation acute coronary syndrome underwent percutaneous coronary intervention. Clin Cardiol. 2020;43(4):379-85.
- 34.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.
- 35.Balouchi S, Gharagozloo M, Esmaeil N, Mirmoghtadaei M, Moayedi B. Serum levels of TGF β , IL-10, IL-17, and IL-23 cytokines in β -thalassemia major patients: the impact of silymarin therapy. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2014;36(4):271-4.