

مقایسه اثرات محافظت‌کنندگی کبدی نانومیسل کورکومین با سیلی‌مارین در سندرم کبد الکلی مزمن در موش سوری

فائزه مقسومی^۱، سپیده اربابی بیدگلی^{۲*}

۱- دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه سم‌شناسی داروشناسی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران

*آدرس مکاتبه: تهران، خیابان دکتر شریعتی، قلهک، ابتدای یخچال، واحد علوم دارویی

صندوق پستی: ۶۴۶۶۱۹۳۹۵

تلفن: ۵-۲۲۶۴۰۰۵۱ (۰۲۱)، نمابر: ۲۲۶۰۲۰۵۹ (۰۲۱)

پست الکترونیک: sepideharbabi@gmail.com

[doi: 10.29252/jmp.4.72.s12.64](https://doi.org/10.29252/jmp.4.72.s12.64)

تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۲۸

تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۱۹

چکیده

مقدمه: کورکومین دارای اثرات کلینیکی ارزشمندی بر کبد است اما جذب ضعیف، متابولیسم سریع و عوارض جانبی دوزهای بالای آن در اثربخشی آن جهت پیشگیری و درمان بیماری‌ها محدودیت فراوانی ایجاد نموده است.

هدف: در این تحقیق، اثرات حفاظتی و ترمیم‌کنندگی نانومیسل کورکومین بر آسیب کبدی ناشی از مصرف مزمن اتانول، با کورکومین و سیلی‌مارین در مدل موش سوری مقایسه شد.

روش بررسی: تعداد ۴۲ سر موش سوری ماده، در ۸ گروه تقسیم‌بندی شدند و وضعیت این گروه‌ها بر اساس شاخص‌های کلینیکی، بیوشیمیایی (ALT، AST، ALP و LDH) و هیستوپاتولوژیک پس از ۶۰ روز در پایان مطالعه مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: سطوح سرمی ALT و AST در گروه‌های تحت درمان با نانوکورکومین (۱۰۰ mg/kg)، کورکومین (۱۰۰ mg/kg) و سیلی مارین (۲۵ mg/kg) نسبت به گروه مصرف‌کننده اتانول کاهش معنی داری یافت ($P < 0/05$) که بیانگر کاهش آسیب کبدی ناشی از اتانول می‌باشد. علاوه بر شاخص‌های بیوشیمیایی، یافته‌های هیستوپاتولوژیک نیز هم‌ارزی نانوکورکومین، کورکومین و سیلی‌مارین را در کنترل شاخص‌های سمیت کبدی ناشی از اتانول پس از قطع مواجهه با اتانول و در دوران نقاهت مسمومیت با الکل تأیید نمودند لیکن در این مقایسه، نانوکورکومین تنها ترکیبی بود که توانست به طور اختصاصی باعث کاهش معنی‌دار سطح LDH پس از قطع اتانول شود.

نتیجه‌گیری: نانوکورکومین با کنترل افتراقی سطح LDH نسبت به کورکومین و سیلی‌مارین می‌تواند قابلیت‌های کلینیکی ویژه‌ای در کنترل آسیب‌های کبدی ناشی از سمیت زینوبیوتیک‌ها در صورت انجام مطالعات تکمیلی داشته باشد.

کل‌واژگان: نانومیسل کورکومین، کورکومین، سیلی‌مارین، سندرم کبد الکلی



مقدمه

زردچوبه (Turmeric) یک ترکیب گیاهی است که از ریشه گیاه *Curcuma longa* L. جدا شده و به عنوان یک مکمل گیاهی بسیار رایج با خواص قابل توجه آنتی اکسیدانی در هندوستان، ایران و سایر کشورهای آسیا، مدیترانه شرقی و سایر قاره‌ها استفاده می‌شود. مطالعات مختلفی که بر روی زردچوبه انجام شده است، نشان می‌دهد که این ماده شامل ترکیبات متعددی است که مهم‌ترین آنها عبارتند از روغن‌های ضروری، تورمرون‌ها، آتالتون‌ها، زینجیبرن، تورمرین و کورکومینوئیدها. از دیگر مواد موجود در زردچوبه می‌توان به مواد معدنی نظیر پتاسیم، کاروتن، ویتامین C و نشاسته ژلاتینه شده اشاره نمود [۱]. زردچوبه، از دیرباز در طب سنتی هند (آیورودا) از اهمیت قابل ملاحظه‌ای برخوردار بوده است. طب آیورودا بیش از ۵۱۱ نوع داروی گیاهی را شرح می‌دهد که شامل ادویه‌ها و افزودنی‌های خوراکی است که موجب تقویت سلامت می‌شوند. کورکومین (7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1, 6-heptadiene-3,5-dione یک ترکیب پلی فنولی مشتق از زردچوبه است [۲]. اگرچه از دیرباز در طب سنتی از کورکومین در درمان بیماری‌های تنفسی مثل آنفلوانزا، آسم، سینوزیت، آلرژی، بیماری‌های کبدی، روماتیسم، بیماری‌های پوستی، ترمیم زخم‌ها، سوختگی‌ها و بیماری‌های گوارشی استفاده می‌شده است لیکن با پیشرفت‌های علم پزشکی بسیاری از خواص ناشناخته کورکومین شامل اثرات ضدتوموری، ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی نیز آشکار شده است که در طب نوین از این خواص اخیر کورکومین جهت پیشگیری و درمان کمکی انواع سرطان‌های کبد، پانکراس، دهان، معده، ریه، پوست، خون، پستان، پروستات، تخمدان، سر و گردن، بیماری‌های قلبی، کلیوی، کبدی، پارکینسون، آلزایمر، مولتیپل اسکلروزیس و ایدز استفاده می‌شود [۳]. علی‌رغم اینکه اثرات حفاظتی کورکومین بر روی بافت کبد در برابر طیف وسیعی از آسیب‌های ناشی از زینوبیوتیک‌ها مشخص شده است [۴، ۵] لیکن ماندگاری و پایداری کورکومین اندک بوده و این موضوع تأثیرات سویی بر کاربرد درمانی زردچوبه دارد. از طرفی دیگر جذب خوراکی کورکومین محدود است

[۶] و حلالیت کورکومین در آب ناچیز بوده و حتی در حلال حلال‌های خنثی و یا آب با pH اسیدی در حدود قابل اغماضی است [۷]. به این ترتیب میزان جذب کورکومین در مجرای گوارشی روده نیز حدود ۲۵ درصد از دوز تجویز شده است که نسبتاً محدود به نظر می‌رسد [۸]. بنا بر محدودیت محدودیت‌های ذکر شده، روش‌های مختلفی جهت افزایش اثربخشی کورکومین پیشنهاد شده است. یکی از روش‌های مورد استفاده، بهره‌برداری از فناوری نانو بوده است تا فراهمی زیستی کورکومینوئیدهای ضدالتهاب و دارای خاصیت آنتی اکسیدانی، در بدن افزایش یابد [۹ - ۸]. افزایش حلالیت کورکومین در آب با افزایش میزان جذب و افزایش فراهمی زیستی و به تبع آن با افزایش خواص درمانی کورکومین همراه است به طوری که استفاده از فناوری نانو در برخی از فرمولاسیون‌های کورکومین با افزایش ۱۰ تا ۱۴ برابری در میزان جذب خوراکی کورکومین در مقایسه با کورکومین معمولی همراه بوده است [۱۰].

جهت ارزیابی سمیت کبدی، از آزمون‌های بیوشیمیایی استفاده می‌شود که از مهم‌ترین و معتبرترین این آزمون‌ها می‌توان به فعالیت آمینوترانسفرازهای سرمی آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) Aspartate aminotransferase و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) Alanine aminotransferase اشاره نمود که بالا رفتن سطح سرمی آنها نشان‌دهنده صدمه به هپاتوسیت‌ها بوده و افزایش فعالیت این دو آنزیم می‌تواند هشداردهنده حضور یک بیماری فعال کبدی باشد. آلکالین فسفاتاز (Alkaline phosphatase) (ALP) نیز یکی دیگر از بیومارکرهای آسیب کبدی است که عمدتاً در بیماری‌های مرتبط با ترشح و دفع صفرا (بیماری‌های کلستاتیک) افزایش می‌یابد [۱۱]. تغییرات معنی‌دار این سه فاکتور در آسیب‌های کبدی به معنی شدت بروز انواع آسیب و ضرورت درمان است.

الکل زمینه‌ساز بروز بیماری‌های کبدی از قبیل استئاتوزیس، هپاتیت کبدی، فیروز و سیروز الکلی است که غالباً به دلیل مصرف طولانی مدت الکل بروز پیدا می‌کنند

مواد مورد استفاده

در این مطالعه کورکومین به صورت بالک از شرکت مرک آلمان، سیلی مارین به صورت بالک از شرکت سیگما و نانومیسل کورکومین با اسم تجاری سیناکورکومین به صورت کپسولهای ۸۰ و ۴۰ میلی گرمی از شرکت ایرانی اکسیر نانو سینا سینا خریداری شده است. بر مبنای ادعای شرکت سازنده، با توجه به ماهیت لیپوفیل کورکومین، جذب خوراکی کورکومین در فرمهای معمول خوراکی (پودر، کپسول و قرص) بسیار پایین است ولی در فرآورده سیناکورکومین، تمام کورکومین در بخش هیدروفوبیک نانومیسلهای کورکومین محبوس می باشد. این نانومیسلهای کروی شکل اندازه ذره‌ای حدود ۱۰ نانومتر دارند و باعث افزایش حلالیت کورکومین در آب می شوند. پس از مصرف خوراکی، کپسولهای سافت ژل حاوی نانومیسل نانومیسلهای کورکومین در کمتر از ۱۵ دقیقه در محیط اسیدی معده باز و پخش می شوند. این نانومیسلها در محیط اسیدی معده حداقل ۶ ساعت پایدارند و از بین نمی روند و به صورت دست نخورده به روده کوچک می رسند. نانومیسلها پس از رسیدن به روده کوچک، موجب تسهیل انتقال کورکومین از لایه آبی که در سطح سلولهای اپیتلیال روده‌ای وجود دارد و به عنوان سد در برابر جذب ترکیبات محلول در چربی می می باشد، عمل نموده و باعث افزایش جذب کورمین از راه خوراکی می شوند. سایر مواد این مطالعه از جمله زایلن، کتامین، فرمالدئید از شرکت مرک تهیه شد. کیت‌های سنجش ALT, AST, ALP و لاکتات دهیدروژناز Lactate dehydrogenase (LDH) محصولات شرکت طب گستران حیان بودند.

طراحی مطالعه

در این مطالعه تجربی موش‌های سوری نر ۴ الی ۶ هفته‌ای در محدوده وزنی 20 ± 5 گرم (۴۸ سر) در قفس‌هایی از جنس فولاد ضدزنگ، در دمای کنترل شده اتاق با دمای (۲۲) درجه سانتی‌گراد و دارای چرخه ۱۲ ساعته نور و تاریکی در حیوانخانه دانشکده داروسازی و علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی نگهداری شدند. حیوانات در طول مطالعه دسترسی

[۱۳، ۱۲]. مصرف طولانی مدت و مزمن الکل همچنین باعث کاهش استرس اکسیداتیو و ظرفیت آنتی اکسیدانی کبد و موجب بروز لیپید پراکسیداسیون و آسیب جدی به غشای سلول‌ها و ارگان‌های این بافت و آزادسازی آلدئیدهای فعال می شود که موجب فعال شدن فاکتورهای التهابی و اثرات پروفیبروتیک می گردد [۱۴]. با توجه به اهمیت کبد و نقش آن در متابولیسم زینوبیوتیک‌ها، خواص دارویی کورکومین و با توجه به اهمیت محصولات گیاهی مؤثر بر آسیب‌های کبدی، مطالعه حاضر به بررسی و مقایسه اثرات محافظتی کورکومین و فرم نانولیپوزومال کورکومین موجود در بازار کشور با اثرات محافظت کبدی گیاه خارمریم (Milk thistle) به عنوان کنترل مثبت می پردازد. این گیاه با اسم علمی *Silybum marianum* (L.) Gaerthn. از اعضای تیره کاسنیان است که میوه آن حاوی مخلوطی از فلاونولیکان فلاونولیکان‌هاست که به عنوان سیلی مارین نام گرفته و ماده مؤثره اصلی آن سیلی بین است. در این مطالعه از فرم تجاری سیلی مارین استفاده شد که با برخورداری از اثرات ضدالتهابی و آنتی اکسیدانی قوی، خواص ترمیمی قابل توجهی بر بافت کبدی دارد و اثربخشی کلینیکی آن بر کبد الکلی، هپاتیت غیر غیرالکلی، هپاتیت ویرال، مسمومیت با قارچ‌های سمی و هپاتیت ناشی از داروها به اثبات رسیده [۱۵] و می تواند فرایند پیشرفت فیروز کبدی ناشی از مواجهه با تراکلریدکربن و سایر زینوبیوتیک‌ها را در موش صحرایی کنترل نماید [۱۶].

مواد و روش‌ها

وسایل و دستگاه‌ها

دستگاه آب دو بار تقطیر (فاطر اکترونیک) ایران، شیکر (Falc) ایتالیا، ترازوی دیجیتال با دقت $100 \mu\text{g}$ (Sartorius) آلمان، pH متر دیجیتال (Sartorius) آلمان، سانتریفیوژ یخچال دار (Sigma2K15) آلمان، سانتریفیوژ اپندورف (Eppendorf) آلمان، اسپکتروفتومتر (Ultrasper2000UV, Pharmacia Biotech)، وسایل جراحی.

همزمان، درمان با کورکومین به میزان 100 mg/kg صورت گرفت.

گروه G8: در این گروه به مدت ۶۰ روز تجویز اتانول با دوز 5 g/kg صورت گرفت و پس از روز بیستم، به طور همزمان، درمان با سیلی‌مارین به میزان 25 mg/kg صورت گرفت (شکل شماره ۱).

نمونه برداری

طی مطالعه و در پایان روز ۶۰، موش‌ها وزن شده و با تزریق داخل صفاقی مخلوط $1/5$ میلی‌لیتر کتامین ۱۰ درصد و $1/5$ میلی‌لیتر زایلازین ۲ درصد بیهوش شده، شکم باز شد و از ورید اجوف تحتانی مقدار $1/5$ میلی‌لیتر خون گرفته شد. این خون در درجه حرارت 4°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت 3000 r/min سانتریفوژ شد؛ سپس قسمت فوقانی (supernatant) جمع‌آوری شده و در دمای -80°C نگهداری شد. در مرحله بعد کبد موش‌ها نیز برداشته شد و یک تکه از بافت لب راست کبد جدا شده و در فرمالین ۱۰ درصد برای فیکس کردن نگهداری شد.

اندازه‌گیری مارکرهای کبدی

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ALT

ALT مسئول انتقال گروه آمین آلانین به ۲-اکسولوتارات و تولید گلوتامات و پیرووات می‌باشد. در نهایت پیرووات در واکنش با $\text{NADH} + \text{H}^+$ ، تولید NAD^+ می‌کند. تغییر در نسبت NADH/NAD^+ ارتباط مستقیمی با میزان فعالیت ALT دارد. سنجش این آنزیم بر اساس روش Frankel-Reitman که یک روش کالریمتریک است و با استفاده از معرف‌های شرکت زیست شیمی انجام شد. بر اساس این روش اسید آمینه آلانین توسط آنزیم SGPT به اسید آمینه پیروویک تبدیل می‌شود که با اضافه کردن یک معرف رنگی در محیط قلیایی تولید یک کمپلکس قهوه‌ای رنگ می‌کند که در طول موج 505 nm نانومتر قابل سنجش است.

آزاد به خوراک استاندارد و آب داشتند و تمام آزمایش‌های حیوانی این مطالعه، مطابق با راهنمای کار با حیوانات مصوب کمیته اخلاق دانشگاه و طبق دستورالعمل کار با حیوانات وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی انجام شد. گروه‌های مورد پژوهش به شرح زیر می‌باشد که در همه گروه‌ها، مطالعه طی مدت ۶۰ روز انجام شده [۱۷] و تجویز الکل، نانوکورکومین، کورکومین و سیلی‌مارین از طریق گاواژ خوراکی طی مدت ۲۰ روز القای سمیت کبدی و ۴۰ روز تجویز همزمان ماده مورد آزمون و الکل صورت گرفت [۱۸]. در این مطالعه تمامی رقت‌های نانو کورکومین، کورکومین و سیلی‌مارین با نرمال سالین تهیه شد و در گروه کنترل منفی نیز صرفاً نرمال سالین تجویز شد.

گروه‌بندی حیوانات

گروه G1: به حیوانات این گروه به مدت ۶۰ روز نرمال سالین داده شده است.

گروه G2: حیوانات این گروه به مدت ۶۰ روز، روزانه محلول ۵ درصد اتانول با دوز 5 g/kg دریافت کردند [۱۴].

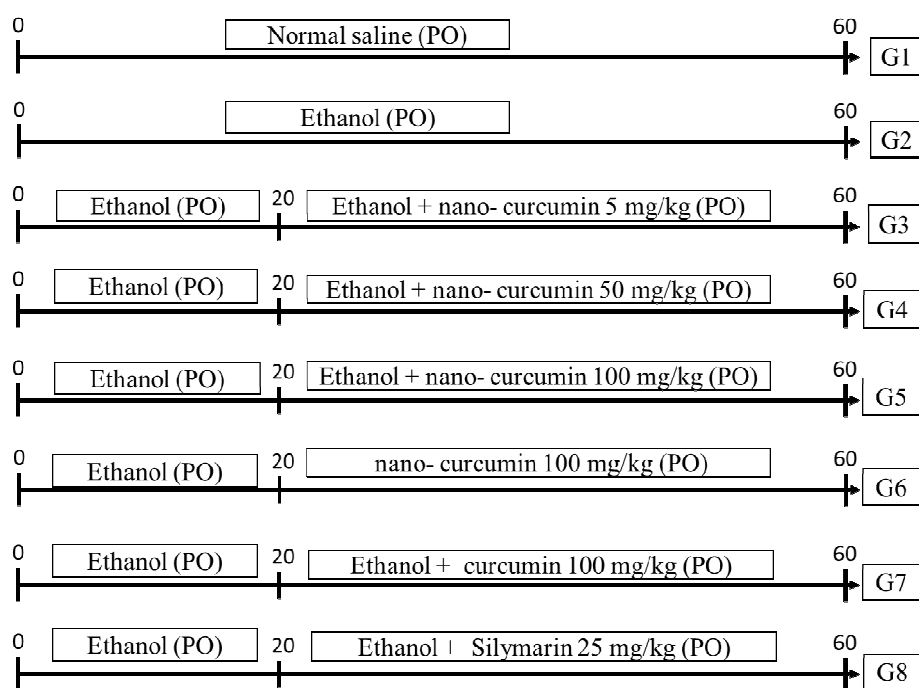
گروه G3: در این گروه به مدت ۶۰ روز تجویز اتانول با دوز 5 g/kg صورت گرفت و از روز بیستم، به طور همزمان، درمان با نانو کورکومین به میزان 5 mg/kg صورت گرفت.

گروه G4: در این گروه به مدت ۶۰ روز تجویز اتانول با دوز 5 g/kg صورت گرفت و از روز بیستم، به طور همزمان، درمان با نانو کورکومین به میزان 50 mg/kg صورت گرفت.

گروه G5: در این گروه به مدت ۶۰ روز تجویز اتانول با دوز 5 g/kg صورت گرفت و از روز بیستم، به طور همزمان، درمان با نانو کورکومین به میزان 100 mg/kg صورت گرفت.

گروه G6: در این گروه به مدت ۲۰ روز تجویز اتانول با دوز 5 g/kg صورت گرفت و پس از آن، مصرف الکل قطع شد و درمان با نانوکورکومین به میزان 100 mg/kg تا روز ۶۰ ادامه پیدا کرد.

گروه G7: در این گروه به مدت ۶۰ روز تجویز اتانول با دوز 5 g/kg صورت گرفت و پس از روز بیستم، به طور



شکل شماره ۱- طراحی شماتیک مطالعه بر اساس گروه‌بندی حیوانات، نوع و مدت مداخله

اندازه‌گیری آنزیم LDH

اندازه‌گیری LDH بر اساس روش Deutsche Gesellschaft für klinische Chemie (DGKC) بر مبنای تغییر پیرووات به لاکتات است. کاهش میزان جذب در ۳۴۰ نانومتر، با توجه به اکسیداسیون NADH به NAD⁺ مستقیماً متناسب با فعالیت آنزیم است.

مطالعه هیستوپاتولوژیک: پس از فیکس کردن بافت‌ها در فرمالین ۱۰ درصد، بلوک‌های پارافینه از بافت‌ها تهیه و با ضخامت ۵ میکرون برش داده شد. سپس رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین جهت بررسی آسیب‌های پاتولوژیک انجام شد. در این مطالعه تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت کبد با استفاده از سیستم Ishak امتیازدهی شده است که نتایج حاصل از آن با توجه به شدت فیروز، نکروز و هپاتیت به ترتیب ارزیابی شده است.

آنالیز آماری: داده‌ها به شکل متغیرهای پیوسته با توزیع نرمال بودند که برای هر یک از متغیرها میانگین \pm انحراف معیار از ۳ نمونه در هریک از گروه‌های ۸ گانه انجام شد. برای آنالیز آماری از ANOVA یک طرفه به همراه آزمون

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم AST

اندازه‌گیری آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز یا گلوتامیک اگزال استیک ترانس آمیناز در خون بر اساس روش International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) انجام گرفت. کاهش میزان نسبت NADH/NAD⁺ ارتباط مستقیمی با میزان فعالیت AST دارد. سنجش این آنزیم بر اساس روش Frankel-Reitman و با استفاده از معرف‌های شرکت زیست شیمی انجام شد.

اندازه‌گیری ALP

روش اندازه‌گیری به صورت Endpoint و با استفاده از معرف‌های شرکت زیست شیمی انجام شد که بر اساس این مکانیسم، آنزیم در مجاورت یک محلول سوبسترا به نام p-Nitrophenylphosphate و بافر (DEA) Diethanolamine می‌تواند سوبسترا را هیدرولیز کند و تولید محصول زرد رنگ به نام p-Nitrophenol نماید. جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. در این واکنش یون منیزیم به آنزیم کمک می‌کند.

Independent Samples Test استفاده شد. میزان $P < 0/05$

به عنوان اختلاف معنادار آماری در نظر گرفته شد.

نتایج

تغییرات وزن

اگرچه تجویز دوز الکل به مقدار 5 g/kg به مدت ۶۰ روز به موش‌های دریافت کننده سبب افزایش وزن حیوان شد ولی این اختلاف از نظر آماری با گروه کنترل معنادار نبود ($P = 0/691$). در این مطالعه تجویز نانوکورکومین در هر سه دوز انتخابی هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در وزن حیوانات ایجاد نکرد و همین موضوع در رابطه با گروه تحت درمان با کورکومین و سیلی‌مارین نیز سبب تغییر معنادار وزن حیوانات نسبت به کنترل و یا گروه دریافت‌کننده الکل نشد ($P = 0/589$). همچنین در اندازه‌گیری وزن کبد، نانوکورکومین، کورکومین و سیلی‌مارین سبب کاهش یا افزایش معنادار وزن کبد نسبت به گروه کنترل یا گروه دریافت‌کننده الکل نشدند ($P = 0/731$). جدول شماره ۱ نشان‌دهنده‌ی وزن کبد و وزن موش‌ها قبل از شروع مطالعه و وزن آنها در پایان مطالعه است.

فاکتورهای بیوشیمیایی

همان‌طور که در جدول شماره ۲ الی ۵ به تفصیل ذکر شده است، تجویز الکل به مدت ۶۰ روز به موش‌های سوری در

گروه G2 سبب افزایش معنادار سطح فاکتورهای بیوشیمیایی AST (جدول شماره ۲)، ALT (جدول شماره ۳)، LDH (جدول شماره ۴) و ALP (جدول شماره ۵) نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0/05$) که نشان‌دهنده موفقیت مدل در ایجاد کبد الکلی بوده است اما تجویز نانو کورکومین با دوز 5 mg/kg از روز ۲۰ تجویز همزمان با الکل بر اساس داده‌های این جداول سبب کاهش سطح آسیب کبدی و کاهش سطح فاکتورهای بیوشیمیایی آسیب کبدی در گروه G3 نشد. گرچه تجویز نانوکورکومین در دوزهای 50 mg/kg و 100 mg/kg در گروه G4 و G5 سبب کاهش نسبی سطح فاکتورهای مورد بررسی نسبت به گروه مصرف‌کننده الکل به تنهایی G2 شده اما این تفاوت باز هم از نظر آماری معنادار نبود لیکن در گروه G6 که نانوکورکومین در روز ۲۰ مطالعه پس از قطع مصرف الکل تجویز شد مارک‌های بیوشیمیایی کاهش معناداری در مقایسه با گروه ۲ نشان داد ($P < 0/05$) همچنین مصرف کورکومین در گروه G7 باعث کاهش معنی‌دار سطح فاکتورهای ALT، AST و LDH (جدول شماره‌های ۲ تا ۵) نسبت به گروه دریافت‌کننده الکل شد ($P < 0/05$). در گروه‌های مصرف‌کننده سیلی‌مارین و الکل و کورکومین و الکل به طور همزمان، کاهش معناداری در سطح آنزیم‌های ALT، AST و ALP نسبت به گروه دریافت‌کننده الکل به تنهایی وجود داشت ($P < 0/05$) (جدول شماره‌های ۲ تا ۵).

جدول شماره ۱- میانگین وزن بدن حیوانات و وزن کبد در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	مداخله	میانگین وزن کبد بر حسب گرم در پایان مطالعه	میانگین وزن کامل بدن بر حسب گرم قبل از شروع مداخله	میانگین وزن کامل بدن بر حسب گرم در پایان مداخله	نسبت وزن کبد به وزن بدن حیوان در پایان مداخله
G1	Normal salin	$1/92 \pm 0/4$	20 ± 1	$32/66 \pm 4/6$	$0/058 \pm 0/004$
G2	Alcohol	$2/14 \pm 0/39$	21 ± 2	$40/33 \pm 9/07$	$0/053 \pm 0/009$
G3	Alcohol+ NC 5	$2/09 \pm 0/27$	20 ± 1	37 ± 1	$0/053 \pm 0/006$
G4	Alcohol + NC 50	$1/80 \pm 0/02$	19 ± 3	34 ± 1	$0/056 \pm 0/003$

ادامه جدول شماره ۱-

گروه‌ها	مداخله	میانگین وزن کبد بر حسب گرم در پایان مطالعه	میانگین وزن کامل بدن بر حسب گرم قبل از شروع مداخله	میانگین وزن کامل بدن بر حسب گرم در پایان مداخله	نسبت وزن کبد به وزن بدن حیوان در پایان مداخله
G5	Alcohol + NC100	$1/92 \pm 0/15$	20 ± 1	$34/66 \pm 4/1$	$0/055 \pm 0/002$
G6	Alcohol+ NC100	$2/14 \pm 0/23$	20 ± 2	$40 \pm 1/7$	$0/053 \pm 0/003$
G7	Alcohol + C 100	$1/73 \pm 0/11$	20 ± 2	36 ± 3	$0/048 \pm 0/002$
G8	Alcohol + silymarin	$1/92 \pm 0/26$	21 ± 1	$37 \pm 4/3$	$0/051 \pm 0/004$

جدول شماره ۲- میانگین سطح (AST (U/L) در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	مداخله	(AST) آسپاراتات آمینوترانسفراز	p-value *
G1	Normal salin	$63/4 \pm 2/5$	
G2	Alcohol	$73/3 \pm 4/9$	$0/032^1$
G3	Alcohol+ NC 5	$74/1 \pm 6$	$0/93$
G4	Alcohol + NC 50	$68/1 \pm 4$	$0/45$
G5	Alcohol + NC100	$68/1 \pm 5/2$	$0/2$
G6	Alcohol+ NC100	$62/3 \pm 3$	$0/02$
G7	Alcohol + C 100	$60/7 \pm 3/7$	$0/02$
G8	Alcohol + silymarin	$63/1 \pm 3/9$	$0/04$

^۱: مقایسه نسبت به گروه نرمال سالین (G ۱) صورت گرفته است.

*: مقایسه با گروه G ۲ صورت گرفته است.

جدول شماره ۳- میانگین سطح (ALT (U/L) در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	مداخله	(ALT) آلانین آمینوترانسفراز	p-value *
G1	Normal salin	$31/6 \pm 3/1$	-
G2	Alcohol	$38/1 \pm 2/8$	$0/05^1$
G3	Alcohol+ NC 5	$38/1 \pm 3$	$0/98$
G4	Alcohol + NC 50	$34/2 \pm 4/4$	$0/3$
G5	Alcohol + NC100	$34/2 \pm 1/7$	$0/1$
G6	Alcohol+ NC100	$30/2 \pm 3/1$	$0/03$
G7	Alcohol + C100	$27/8 \pm 5/4$	$0/04$
G8	Alcohol + silymarin	$33/1 \pm 2/8$	$0/09$

^۱: مقایسه نسبت به گروه نرمال سالین (G ۱) صورت گرفته است.

*: مقایسه با گروه G ۲ صورت گرفته است.



جدول شماره ۴- میانگین سطح ALP (U/L) در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	مداخله	آلکالین فسفاتاز (ALP)	p-value *
G1	Normal salin	119 ± 6	-
G2	Alcohol	126/7 ± 2/4	0/198 ^۱
G3	Alcohol+ NC 5	126 ± 3/8	0/84
G4	Alcohol + NC 50	124/6 ± 2/1	0/26
G5	Alcohol + NC 100	124/6 ± 3/2	0/4
G6	Alcohol+ NC100	121/9 ± 3/7	0/1
G7	Alcohol + C 100	120/9 ± 2/5	0/04
G8	Alcohol + silymarin	123/1 ± 2/7	0/1

۱: مقایسه نسبت به گروه نرمال سالین (G ۱) صورت گرفته است.

*: مقایسه با گروه G ۲ صورت گرفته است.

جدول شماره ۵- میانگین سطح LDH (U/L) در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	مداخله	لاکتات دهیدروژناز (LDH)	p-value *
G1	Normal salin	0/16 ± 0/03	
G2	Alcohol	0/23 ± 0/04	0/083 ^۱
G3	Alcohol+ NC 5	0/23 ± 0/04	0/93
G4	Alcohol + NC 50	0/017 ± 0/17	0/37
G5	Alcohol + NC 100	0/17 ± 0/015	0/09
G6	Alcohol+ NC 100	0/14 ± 0/03	0/04*
G7	Alcohol + C 100	0/14 ± 0/04	0/06
G8	Alcohol + silymarin	0/15 ± 0/03	0/06

۱: مقایسه نسبت به گروه نرمال سالین (G ۱) صورت گرفته است.

*: مقایسه با گروه G ۲ صورت گرفته است.

مطالعه هیستوپاتولوژیک

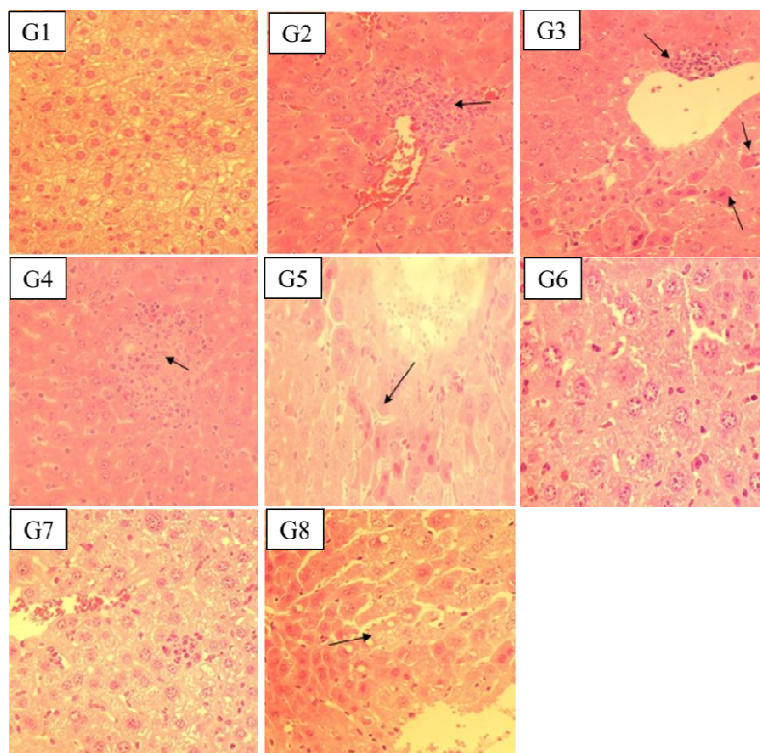
در پایان مطالعه پس از انجام مطالعات هیستوپاتولوژی در گروه کنترل G1 اثری از نکروز، التهاب و فیبروز بافتی مشاهده نشد و هیپاتوسیت‌ها کاملاً طبیعی گزارش شد (شکل شماره ۱- G1). در گروه G2 (اتانول 5 g/kg)، نکروز مولتی فوکال هیپاتوسیت‌ها (Multifocal hepatocyte necrosis) در بافت کبد مشاهده شد. همچنین در این گروه تعداد سلول‌های التهابی تک هسته‌ای (Mononuclear) در اطراف فضای پورتال افزایش یافته و سلول‌های خونی از جمله اریتروسیت و میلوئید در فضای پورت قابل مشاهده بودند (شکل شماره ۱-

G2). در گروه G3 (الکل و نانوکورکومین 5 mg/kg)، حضور سلول‌های التهابی در اطراف فضای پورت، نکروز و تغییرات دژنراتیو در اطراف هیپاتوسیت‌ها به وضوح عدم کارایی این دوز از نانوکورکومین به عنوان یک عامل حفاظت‌کننده کبد را نشان داد (شکل ۱- G3). تغییرات هیستوپاتولوژی در گروه G4 (الکل و نانوکورکومین 50 mg/kg به طور همزمان) نیز همچنان دیده شد و مشاهده سلول‌های التهابی تک هسته‌ای اطراف ورید مرکزی، تغییرات دژنراتیو و آپوپتوز در هیپاتوسیت‌ها دلالت بر عدم کارایی این دوز از نانوکورکومین به عنوان یک عامل حفاظت‌کننده کبد داشت (شکل شماره ۱- G4). تغییرات هیستوپاتولوژی در گروه



به گروه کنترل G1 بود و مشابه گروه G6 نمای طبیعی از بافت کبد مشاهده شد (شکل شماره ۱ -GV). در گروه G8 (سیلی سیلی مارین همزمان با مصرف الکل)، تغییر هیستوپاتولوژیک نزدیک به گروه کنترل G1 بوده و در این گروه نیز نمای طبیعی از بافت کبد مشاهده شده است (شکل شماره ۱ -G8). مجموعاً نتایج این بخش نشان‌دهنده قابلیت مناسب و قابل مقایسه حفاظت کبدی در کورکومین و سیلی مارین بود، حال آنکه نانو کورکومین قابلیت ویژه‌ای را در ترمیم ضایعات کبدی ناشی از سمیت کبدی ناشی از مصرف مزمن اتانول نشان داد.

G5 (الکل و نانو کورکومین ۱۰۰ mg/kg به طور همزمان) مجدداً با دژنراسیون عروق هپاتوسیت‌ها و نکروز در اطراف ورید مرکزی و آپوپتوز در هپاتوسیت‌ها همراه بود (شکل شماره ۱ -G5). اما در گروه G6 (تجویز نانو کورکومین ۱۰۰ mg/kg پس از قطع مصرف الکل)، تغییرات هیستوپاتولوژیک نسبت به گروه دریافت‌کننده الکل به وضوح مشاهده شده و در این گروه نمای طبیعی از بافت کبد مشاهده شد (شکل شماره ۱ -G6). در گروه GV (کورکومین mg/kg ۱۰۰ همزمان با مصرف الکل)، تغییر هیستوپاتولوژیک نزدیک



شکل شماره ۱- تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد در ۸ گروه مورد مطالعه

G1: هپاتوسیت‌ها کاملاً طبیعی G2: نکروز مولتی فوکال هپاتوسیت‌ها (Multifocal hepatocyte necrosis) در بافت کبد به انضمام سلول‌های التهابی تک هسته ای (Mononuclear) در اطراف فضای پورتال و سلول‌های خونی از جمله اریتروسیت و میلوئید، G3: سلول‌های التهابی در اطراف فضای پورت، نکروز و تغییرات دژنراتیو در اطراف هپاتوسیت‌ها G4: سلول‌های التهابی تک هسته‌ای اطراف ورید مرکزی، تغییرات دژنراتیو و آپوپتوز در هپاتوسیت‌ها، G5: دژنراسیون عروق هپاتوسیت‌ها و نکروز در اطراف ورید مرکزی و آپوپتوز در هپاتوسیت‌ها G6: نمای طبیعی از بافت کبد، GV: نمای طبیعی از بافت کبد، G8: نمای طبیعی از بافت کبد

بحث

اگرچه مکانیسم دقیق کورکومین درخصوص کاهش آسیب آسیب‌های کبدی ناشی از مواجهه غیرمعارف با زینوبیوتیک‌ها تا حد زیادی ناشناخته باقی مانده است، لیکن در منابع اخیر مکرراً نسبت به قابلیت‌های کورکومین در افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن در برابر واکنش‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species-ROS) از قبیل گلوتاتیون اشاره شده است. یکی از اصلی‌ترین مکانیسم‌های حفاظتی کورکومین جلوگیری از تشکیل رادیکال‌های آزاد ناشی از مواجهه با سموم و عوامل خارجی است که بخشی از آن از طریق مهار برخی از ایزوآنزیم‌های سیتوکروم P450 (CYP450) Cytochrome P450 (CYP2E1) از جمله صورت می‌گیرد [۲۰، ۱۹]. به علاوه کورکومین دارای اثرات مهارکنندگی رشد تومور به واسطه نقش قابل توجه آن بر مهار بیان ژن فاکتور رشد اندوتلیال عروقی Vascular endothelial growth factor (VEGF) است [۲۱].

با این وجود، اگرچه تأثیرات کورکومین بر هپاتوسیت‌ها به عنوان یک راهکار غلبه بر محدودیت‌های درمانی موجود جهت پیشگیری و درمان آسیب‌های کبدی ناشی از الکل و یا سایر عوامل هپاتوتوکسیک از جمله فیبروز القا شده توسط CCl₄ در کبد موش صحرایی عنوان شده است [۲۲]، لیکن جذب محدود، فراهمی زیستی ناچیز، متابولیسم سریع و عوارض جانبی ترکیب در دوزهای بالا، عمده محدودیت‌هایی هستند که اثر بخشی کلینیکی آن را دچار مشکل نموده و محققان و صنایع داروسازی را بر آن داشته تا با استفاده از فناوری نانو و تولید کورکومین نانو میسلار، در پی رفع این مشکل و افزایش کارآمدی کورکومین با اتکا بر مکانیسم اثر اصلی آن و با تأکید بر اصلاح نقطه ضعف ماده در جذب سیستمیک آن باشند [۱۶]. اگرچه مطالعات محدودی در خصوص مکانیسم اثرات حفاظت کبدی نانو کورکومین در مقایسه با کورکومین وجود دارد، ثابت شده است که نانوکورکومین علاوه بر برخورداری از قابلیت‌های کورکومین به صورت مستقیم سبب القای آپوپتوز و القای بیان فعال‌کننده پرولیفراسیون پروکسی زوم Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-γ)

می‌شود که یک مدیاتور اساسی در ترمیم ضایعات کبدی است [۲۳].

در این مطالعه با استفاده از تجویز خوراکی اتانول در موش سوری نر در یک مدل ۶۰ روزه، به استناد افزایش سطح آنزیم‌های عملکرد کبدی (ALT و AST) و تغییرات هیستوپاتولوژیک واضح (شکل شماره ۱) سندرم کبد الکلی مزمن ایجاد شد [۱۵]. اگرچه نمی‌توان نتایج مربوط به یکی از گروه‌های مطالعه (که تنها ۲۰ روز الکل دریافت کرده‌اند) را با گروه‌های دیگر مطالعه که ۶۰ روز اتانول دریافت کرده بودند، مقایسه کرد اما به هر شکل اثر بخشی نانوکورکومین در این طراحی به طور همزمان بر آسیب‌های کوتاه‌مدت و بلندمدت اتانول مورد مقایسه قرار گرفت. در القای مدل سمیت کبدی ناشی از تجویز اتانول، مطالعات زیادی وجود دارند که بر اساس جمع تحقیقات می‌توان به افزایش سطح سرمی مارکرهای عملکرد کبدی بویژه ALT و تغییرات هیستوپاتولوژیک به منظور اثبات کارآمدی مدل استناد نمود و تغییر قابل قبول در این شاخص در این مطالعه به طور کامل تحقق پیدا کرد که در تجویزهای ۲۰ و ۶۰ روزه مشاهده شد.

در مطالعه‌ای که توسط Huang QH و همکاران در سال ۲۰۱۷ صورت گرفت، حیوانات مورد مطالعه با دوز ۷ mg/kg هر ۱۲ ساعت (۵ تکرار) الکل دریافت کردند. نتایج نشان دادند که میزان آنزیم‌های کبدی ALT، AST، ALP و LDH به طور معناداری در گروه دریافت‌کننده الکل بیشتر از گروه کنترل بودند [۱۶]. اگرچه این مدل با افزایش قابل توجه ALP و LDH از کارآمدی بیشتری نسبت به مدل القای سمیت کبدی نسبت به این مطالعه برخوردار بود لیکن مدل ایجاد شده با توجه به جمع فرضیات تحقیق مبنی بر ارزیابی تأثیرات پیشگیرانه و درمانی نانوکورکومین در مقایسه با کورکومین و سیلی‌مارین پاسخگو بود.

در این مطالعه مصرف نانوکورکومین، کورکومین و سیلی‌مارین در کبد، سبب ایجاد تغییرات معنی‌داری در وزن حیوانات، وزن کبد حیوانات و نسبت وزن کبد به وزن حیوان نشد. در مطالعه Hassan و همکاران در سال ۲۰۱۴، اثر نانوکورکومین در کبد موش‌های سرطانی با



این ترکیب در کنترل و کاهش معنی‌دار LDH (جدول شماره ۵) نسبت به سیلی‌مارین که به عنوان شاخص‌ترین ترکیب محافظت‌کننده کبدی در بازارهای دارویی ایران و جهان مطرح است، دستاورد اختصاصی و مهم مطالعه حاضر است. با توجه به اهمیت کلینیکی آنزیم LDH و سایر آنزیم‌های کبدی مورد مطالعه در این طراحی، لازم است این قابلیت در مدل‌های سمیت کبدی ناشی از سایر سموم در مقایسه با عوامل محافظت‌کننده کبدی دیگر جهت مصارف گسترده‌تر و مؤثرتر کلینیکی مورد ارزیابی‌های بیشتر قرار گیرد.

علاوه بر آسیب‌های کبدی که به تفضیل مورد بحث قرار گرفت، لاکتات دهیدروژناز در مقایسه با سایر آنزیم‌های کبدی از ارزش بسیار بالای تشخیصی بخصوص در بیماران سرطانی برخوردار است. سلول‌های سرطانی، آنزیم‌های داخل سلولی مختلفی را بواسطه تخریب جداره سلولی آزاد می‌کنند که عمدتاً منتهی به تغییر در عملکرد میتوکندریایی شده، روند آپتوزیس را دچار اختلال می‌کنند. این وضعیت نه تنها در مدل‌های برون‌تنی، بلکه در مدل‌های درون‌تنی نیز به اثبات رسیده است. لذا لاکتات دهیدروژناز به عنوان اندیکاتور بسیار حساس به متابولیسم درون سلولی، گلیکولیز هوازی و بی هوازی و ترانسفورماسیون سلولی تلقی می‌شود. با این تفاسیر، این آنزیم یک شاخص اولیه جهت تشخیص زودرس سرطان و مهار آن به عنوان یک مکانیسم قابل اعتماد جهت پیشگیری از بروز تومور است که برای نخستین بار در این مطالعه حیوانی به اثبات رسیده است [۲۶]. مضاف بر این قابلیت، نقش LDH در پیش‌بینی پاسخ‌دهی به داروهای جدید هپاتوسلولار کارسینوما از جمله سورافنیب (Sorafenib) پیشنهاد شده است که رابطه مستقیم با میزان آنژیوژنز تومور دارد که می‌تواند نقش مضاعف این ترکیب را به عنوان مکمل ویژه در تومورهای کبدی با سطح بالای LDH به عنوان گروه درمانی پاسخ‌دهنده به نانوکورکومین مطرح نماید [۲۷].

نتیجه‌گیری

نانوکورکومین می‌تواند در دوزهای محدود و کمتر از ۱۰۰ mg/kg به عنوان یک جایگزین مناسب درمان‌های روتین

Diethylnitrosamine بررسی شد. در این مطالعه نیز طی دوره مواجهه تغییری در وزن کبد در گروه‌های مورد مطالعه طی درمان مشاهده نشد [۲۴] که با نتایج این مطالعه هماهنگی دارد که یکی از نقاط قدرت این مطالعه محسوب می‌شود. بر اساس پیش‌آزمون‌های قبلی دوز مطالعه برای این فرآورده به درستی محاسبه شده و به جهت ضرورت اعتبار تحقیق عملاً تغییری در وزن کبد موش‌های دریافت‌کننده ایجاد نکرده است. اگرچه در گروه‌های کنترل مثبت مطالعه حاضر، یعنی حیوانات دریافت‌کننده سیلی‌مارین و کورکومین، وزن کبدها عملاً نسبت به گروه دریافت‌کننده الکل کمتر بود ولی این اختلاف هم معنادار نبود اما مطالعات قبلی نشان داده‌اند که مصرف دوزهای بسیار بالای زردچوبه در طول ۲ هفته و کورکومین در طول ۷ روز می‌تواند کاهش قابل توجهی در وزن کبد ایجاد کند [۱۹]. Safari R و همکارانش نشان دادند که نانوکورکومین به تنهایی نمی‌تواند سبب کاهش یا افزایش وزن کبد نسبت به گروه‌های دریافت‌کننده یک ماده توکسیک دیگر (salinomycin) شود که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد [۲۲].

در مطالعه Sayrafi R و همکاران دوز روزانه ۲۰۰ mg/kg نانوکورکومین سبب کاهش سطح آنزیم AST شد که طی مصرف Salinomycin در کبد جوجه ایجاد شده بود [۲۶]. در مطالعه حاضر مصرف نانوکورکومین به دلیل مطالعات قبلی در دوزهای کمتری صورت گرفت که علی‌رغم بی‌تأثیر بودن دوز دوزهای ۵ و ۵۰، دوز روزانه ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن پس از قطع تجویز الکل سبب کاهش معنادار سطح آنزیم AST نسبت به گروه دریافت‌کننده الکل و با نتایج قابل قبول و مشابهی با کورکومین و سیلی‌مارین همراه بود اما در مواردی که تجویز نانوکورکومین همزمان با تجویز الکل بوده است این اختلاف معنادار نبود. اگرچه در سایر مطالعات [۲۵، ۲۰]، استفاده از کورکومین به عنوان یک ماده حفاظتی سبب کاهش سطح ALT، AST و همچنین بهبود پارامترهای هیستوپاتولوژی حتی در آسیب ناشی از تتراکلریدکربن شده است، لیکن با این مطالعه نمی‌توان نسبت به قابلیت‌های مضاعف نانوکورکومین نانومسیلار در بهبود ضایعات کبدی ناشی از سایر زینوبیوتیک‌ها قضاوت نمود اما قابلیت افتراقی

مقایسه با کورکومین و سیلی مارین برخوردار است بلکه می‌تواند به طور افتراقی سطح LDH را کاهش بخشد که درجه دیگری را بر روی قابلیت‌های کلینیکی ویژه این فراورده در انواع بدخیمی می‌گشاید. اثبات این مهم نیازمند انجام مطالعات تکمیلی است.

در کاهش آسیب‌های کبدی مد نظر قرار گیرد که این قابلیت به تفصیل در این مطالعه مورد مقایسه با دوزهای متعارف تحقیقات حیوانی دو فراورده کورکومین و سیلی مارین به عنوان داروهای رایج محافظت‌کننده و ترمیم‌کننده آسیب‌های کبدی بررسی شد. بر اساس شواهد کلینیکی، پاراکلینیکی و هیستوپاتولوژیک نانوکورکومین نه تنها از اثر بخشی قابل

منابع

1. Monton C, Charoenchai L, Suksaeree J and Sueree L. Quantitation of curcuminoid contents, dissolution profile, and volatile oil content of turmeric capsules produced at some secondary government hospitals. *J. Food Drug Anal.* 2016; 24 (3): 493 - 9.
2. Lee W-H, Loo C-Y, Bebawy M, Luk F, Mason RS and Rohanizadeh R. Curcumin and its derivatives: their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st century. *Curr. Neuropharmacol.* 2013; 11 (4): 338 - 78.
3. Girish C and Pradhan SC. Drug development for liver diseases: focus on picroliv, ellagic acid and curcumin. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2008; 22 (6): 623 - 32.
4. Wu P, Huang R, Xiong YL and Wu C. Protective effects of curcumin against liver fibrosis through modulating DNA methylation. *Chin. J. Nat. Med.* 2016; 14 (4): 255 - 64.
5. Yang K-Y, Lin L-C, Tseng T-Y, Wang S-C and Tsai T-H. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. *J. Chromatogr B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007; 853 (1 - 2). 183-9.
6. Tønnesen HH, Måsson M and Loftsson T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *Int. J. Pharm.* 2002; 244 (1 - 2): 127 - 35.
7. Jäger R, Lowery RP, Calvanese AV, Joy JM, Purpura M and Wilson JM. Comparative absorption of curcumin formulations. *Nutr. J.* 2014; 13: 11.
8. Lee WH, Loo CY, Young PM, Traini D, Mason RS and Rohanizadeh R. Recent advances in curcumin nanoformulation for cancer therapy. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2014; 11 (8): 1183 - 201.
9. Yallapu MM, Jaggi M and Chauhan SC. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. *Drug Discov. Today* 2012; 17 (1 - 2): 71 - 80.
10. Song Z, Deaciuc I, Song M, Lee DYW, Liu Y, Ji X, and et al. Silymarin Protects Against Acute Ethanol-Induced Hepatotoxicity in Mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2006; 30 (3): 407 - 13.
11. Seitz HK, Lieber CS, Stickel F, Salaspuro M, Schlemmer HP and Horie Y. Alcoholic liver disease: from pathophysiology to therapy. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2005; 29 (7): 1276 - 81.
12. Seth D, Hogg PJ, Gorrell MD, McCaughan GW and Haber PS. Direct effects of alcohol on hepatic fibrinolytic balance: implications for alcoholic liver disease. *J. Hepatol.* 2008; 48 (4): 614 - 27.

13. Barry R and McGivan J. Acetaldehyde alone may initiate hepatocellular damage in acute alcoholic liver disease. *Gut*. 1985; 26 (10): 1065 - 9.
14. Bertola A, Mathews S, Ki SH, Wang H and Gao B. Mouse model of chronic and binge ethanol Feeding (the NIAAA model). *Nat. Protoc*. 2013; 8 (3): 627 - 37.
15. Abenavoli L, Izzo AA, Milić N, Cicala C, Santini A and Capasso R. Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. *Phytother. Res*. 2018; 2202-2213.
16. Clichici S, Olteanu D, Nagy AL, Oros A, Filip A and Mircea PA. Silymarin inhibits the progression of fibrosis in the early stages of liver injury in CCl₄-treated rats. *J. Med. Food*. 2015; 18 (3): 290 - 8.
17. Rabelo ACS, de Pádua Lúcio K, Araújo CM, de Araújo GR, de Amorim Miranda PH, Carneiro ACA, de Castro Ribeiro ÉM, de Melo Silva B, de Lima WG and Costa DC. Baccharis trimera protects against ethanol induced hepatotoxicity in vitro and in vivo. *J. Ethnopharmacol*. 2018; 215: 1 - 13.
18. Boyanapalli SSS, Huang Y, Su Z, Cheng D, Zhang C, Guo Y, Rao R, Androulakis IP and Kong AN. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Curcumin in regulating anti-inflammatory and epigenetic gene expression. *Biopharm. Drug Dispos*. 2018; 39 (6): 289-297.
19. Huang QH, Xu LQ, Liu YH, Wu JZ, Wu X, Lai XP, Li YC, Su ZR, Chen JN and Xie YL. Polydatin Protects Rat Liver against Ethanol-Induced Injury: Involvement of CYP2E1/ROS/Nrf2 and TLR4/NF-κB p65 Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2017; 7953850. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
20. Joshi D, Mittal DK, Shukla S, Srivastav SK and Dixit VA. Curcuma longa Linn. extract and curcumin protect CYP 2E1 enzymatic activity against mercuric chloride-induced hepatotoxicity and oxidative stress: A protective approach. *Exp. Toxicol. Pathol*. 2017; 69: 373 - 82.
21. Fu Z, Chen X, Guan S, Yan Y, Lin H and Hua ZC. Curcumin inhibits angiogenesis and improves defective hematopoiesis induced by tumor-derived VEGF in tumor model through modulating VEGF-VEGFR2 signaling pathway. *Oncotarget*. 2015; 14; 6 (23): 19469 - 82.
22. Fu Y, Zheng S, Lin J, Ryerse J and Chen A. Curcumin protects the rat liver from CCl₄-caused injury and fibrogenesis by attenuating oxidative stress and suppressing inflammation. *Mol. Pharmacol*. 2008; 73 (2): 399 - 409.
23. Lin J and Chen A. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-γ by curcumin blocks the signaling pathways for PDGF and EGF in hepatic stellate cells. *Lab. Invest*. 2008; 88 (5): 529 - 40.
24. Hassan SK, Mousa AM, Eshak MG, Farrag A and Badawi A. Therapeutic and chemopreventive effects of nano curcumin against diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in rats. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*. 2014; 6 (3): 54.
25. Girish C, Koner BC, Jayanthi S, Ramachandra Rao K, Rajesh B and Pradhan SC. Hepatoprotective activity of picroliv, curcumin and ellagic acid compared to silymarin on paracetamol induced liver toxicity in mice. *Fundam. Clin. Pharmacol*. 2009; 23 (6): 735 - 45.
26. Sayrafi R, Hosseini S and Ahmadi M. The protective effects of nanocurcumin on liver toxicity induced by salinomycin in broiler chickens. *Revue de Medecine Veterinaire* 2017; 168 (7 - 9): 136 - 42.
27. Mathews V, Binu P, Paul MS, Abhilash M, Manju A and Nair RH. Hepatoprotective efficacy

of curcumin against arsenic trioxide toxicity. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2012; 2 (2): S706 - S11.

28. García-Niño WR and Pedraza-Chaverri J. Protective effect of curcumin against heavy metals-induced liver damage. *Food Chem. Toxicol.* 2014; 69: 182 - 201.

29. Jurisic V, Radenkovic S and Konjevic G. The Actual Role of LDH as Tumor Marker, Biochemical and Clinical Aspects. *Adv. Exp. Med.*

Biol. 2015; 867: 115 - 24.

30. Faloppi L, Scartozzi M, Bianconi M, Svegliati Baroni G, Toniutto P, Giampieri R, Del Prete M, De Minicis S, Bitetto D, Loretelli C, D'Anzeo M, Benedetti A and Cascinu S. The role of LDH serum levels in predicting global outcome in HCC patients treated with sorafenib: implications for clinical management. *BMC Cancer.* 2014; 14: 110.

