ORIGINAL ARTICLE

Effects of Silibinin on Nitric Oxide Synthase Genes Expression during Hepatic Warm Ischemia-reperfusion in Adult Male Rats

Ehsan nabipour[1],
Vahid Akbari Kordkheyli[2],
Soheil Azizi[3],
Abbas Khonakdar-Tarsi[4]

[1] MSc in Biochemistry, Department of Biochemistry-Genetic and Plant Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran
[2] MSc in Clinical Biochemistry, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Laboratory Medicine, Faculty of Allied Medical Sciences, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Assistant Professor, Molecular and Cell Biology Research Center, Department of Biochemistry-Biophysics and Genetics, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received April 4, 2017 ; Accepted July 16, 2018)

Abstract

Background and purpose: Ischemia-reperfusion injuries (I/RI) are the major causes of liver failure after various types of liver surgeries, particularly liver transplantation. Reactive oxygen species (ROS) are the major causes of such injuries, therefore, antioxidant therapy to attenuate hepatic lesions is preferred. We aimed to evaluate the effects of silibinin, a potent radical scavenger, on liver damages and endothelial and inducible nitric oxide synthase (eNOS and iNOS) genes expression after liver I/R.

Materials and methods: In this experimental study, the rats were divided into four groups (n=8 per group). Group1 Vehicle: the rats underwent laparotomy and received DMSO10%, Group 2 SILI: the animals received silibinin alongside laparotomy, Group3 I/R: the rats received DMSO10% and subjected to liver I/R procedure, and group 4 I/R+SILI: this group received both silibinin and liver I/R simultaneously. Silibinin (50 mg/kg I.P) was administered twice in all rats. After 1 h ischemia and 5 h reperfusion, blood samples were collected to evaluate serum AST and ALT levels and liver sections were taken to analyze the eNOS and iNOS gene expressions and histological examinations.

Results: There were no significant differences in all parameters between Vehicle and SILI groups ($p>0.05$). But serum AST and ALT increased significantly in I/R group compared with those in vehicle group. Treatment with silibinin could considerably reduce these markers. Histological damages during I/R improved by silibinin. The iNOS gene was found to be overexpressed whereas eNOS expression decreased in I/R group compared with those in the vehicle group. Silibinin treatment could decline iNOS expression but could not significantly affect eNOS expression ($p>0.05$).

Conclusion: Silibinin protects liver from I/RI. It may decrease iNOS adverse effects by suppressing its expression.

Keywords: Ischemia-reperfusion, eNOS, iNOS, silibinin

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (164): 1-12 (Persian).

* **Corresponding Author: Abbas Khonakdar-Tarsi -** Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: khonakdarab@gmail.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۶۴ شهریور سال ۱۳۹۷ (۱۲-۱)

اثرات سیلیبینین بر بیان ژن های نیتریک اکساید سنتاز طی ایسکمی-ریپرفیوژن گرم کبدی در رت های بالغ نر

احسان نبی پور[۱]
وحید اکبری کردخیلی[۲]
سهیل عزیزی[۳]
عباس خنکدار طارسی[۴]

چکیده

سابقه و هدف: آسیب‌های ایسکمی- ریپرفیوژن (I/R) کبدی، علت اصلی نارسایی کبد در جراحی‌های مختلف به خصوص پیوند کبد می‌باشد. از آن‌جایی که ROS علت عمده آسیب‌های کبدی است، به کارگیری آنتی‌اکسیدان‌ها برای کاهش این عوارض در اولویت قرار دارد. این مطالعه با هدف ارزیابی اثرات سیلیبینین بر آسیب‌های کلی بافت کبد و بیان ژن های *eNOS* و *iNOS* (نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی و القایی) طی I/R انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، رت ها به چهار گروه هشت تایی، شامل گروه حامل (Vehicle) که رت ها مورد عمل لاپارتومی قرار گرفته و حامل (DMSO10%) دریافت کردند، گروه SILI که رت ها همراه لاپاراتومی، سیلیبینین دریافت کردند، گروه I/R که رت ها مورد عمل I/R قرار گرفته و حامل دریافت کردند و گروه I/R+SILI که رت ها همزمان با I/R، سیلیبینین دریافت کردند، تقسیم شدند. سیلیبینین در گروه‌ها برای هر رت دو بار، هر بار با دوز ۵۰ mg/kg (I.P) تزریق گردید. پس از یک ساعت ایسکمی و ۵ ساعت ریپرفیوژن، نمونه‌های خون برای سنجش AST و ALT سرم و نمونه‌های کبد برای ارزیابی بیان ژن‌های *eNOS* و *iNOS* و بررسی‌های بافت شناسی جمع آوری شدند.

یافته‌ها: بین گروه های Vehicle و SILI در کلیه پارامتر ها، تغییر معنی داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵). سطوح AST و ALT سرم در گروه I/R افزایش چشمگیری نسبت به گروه حامل داشت، که توسط سیلیبینین کاهش قابل توجهی پیدا کرد. همچنین آسیب های بافتی مشاهده شده در گروه I/R توسط سیلیبینین بهبود پیدا کرد. بیان ژن های *iNOS* و *eNOS* طی I/R به ترتیب افزایش و کاهش بارزی در مقایسه با گروه حامل داشت. درمان با سیلیبینین توانست بیان *iNOS* را کاهش دهد اما نتوانست اثر معنی داری روی بیان *eNOS* بگذارد(p>۰/۰۵).

استنتاج: سیلیبینین اثرات حمایتی روی کبد طی I/R از خود نشان داده و می‌تواند با کاهش بیان *iNOS*، از اثرات مضر آن بکاهد.

واژه های کلیدی: ایسکمی- ریپرفیوژن، نیتریک اکسید سنتاز، سیلیبینین

مقدمه

ایسکمی ریپرفیوژن (I/R) پدیده آسیب‌رسانی است که در اثر قطع موقتی جریان خون یک عضو، رفع انسداد و بازگشت جریان خون به آن عضو رخ می‌دهد. با توجه به این که ۷۵ درصد خون مورد نیاز کبد از ورید

مولف مسئول: عباس خنکدار طارسی- ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم(ص)، دانشکده پزشکی E-mail: khonakdarab@gmail.com
۱. کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی ژنتیک و زیست شناسی گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد دامغان، دامغان، ایران
۲. کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، گروه بیوشیمی، بیوفیزیک و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۷/۱/۱۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۷/۱/۲۶ تاریخ تصویب : ۱۳۹۷/۴/۲۵

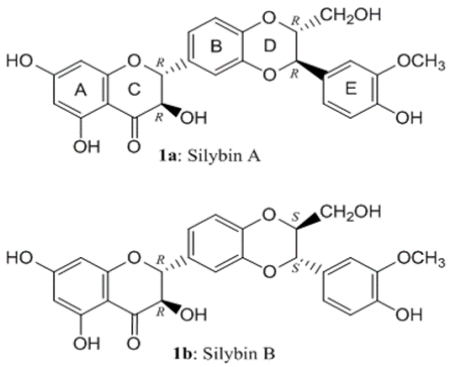
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

پورت و تنها ۲۵ درصد خون آن از شریان کبدی غنی از اکسیژن تامین می‌شود، کبد بیشتر مستعد آسیب‌های I/R می‌باشد(۱). ایسکمی ریپرفیوژن کبدی در مواقع بالینی متعددی از جمله، تروما، شوک هموراژیک، سپسیس، تومور و جراحی‌های اساسی نظیر بیوپسی و پیوند کبد رخ می‌دهد. فاکتور هایی مانند گرسنگی، کبد چرب، سن، زمان و شدت و سرعت ایسکمی و ریپرفیوژن در میزان آسیب‌ها تاثیر گذار می‌باشد(۲). آسیب‌های ناشی از I/R کبدی با مکانیسم‌های مولکولی مختلف رخ می‌دهند که می‌توان به این موارد اشاره کرد: تهی شدن سلول از ATP به دلیل نبود اکسیژن که باعث اختلال در pH، تبادلات غشایی و ادم سلولی می‌شود، آسیب به جریان خون عروق کوچک به خصوص انقباض سینوزوئیدها که به دلیل تغییر در بیان ژن‌های تنظیم‌کننده انقباض و انبساط عروق رخ می‌دهد و پدیده عدم جریان مجدد را باعث می‌شود و پاسخ التهابی ناشی از فعال شدن سلول‌های کوپفر و تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن (ROS) و سایتوکاین‌ها که پراکسیداسیون لیپیدها و پروتئین‌های مختلف سبب می‌شود. همچنین سایتوکاین‌ها می‌توانند کموتاکسی نوتروفیل‌ها را در فاز تاخیری، و سندرم پاسخ التهابی سیستمیک و در نتیجه آسیب ارگان‌های دور مثل مغز، ریه و کلیه نیز سبب شوند(۵-۳). جلوگیری از آسیب جریان خون عروق کوچک یکی از اهداف اصلی در کاهش آسیب‌های I/R بوده، مداخله در بیان ژن‌های دخیل در تنظیم انقباض و انبساط عروق، استراتژی مناسبی در نیل به این هدف می‌باشد. نیتریک اُکساید (NO) به عنوان متسع‌کننده و اندوتلین ۱ (ET-1) به عنوان تنگ‌کننده رگ، در تنظیم جریان خون میکروسکوپی کبد اهمیت زیادی دارند. در آسیب ایسکمی، افزایش ET-1 و به دنبال آن انقباض سینوزوئیدها، کاهش جریان خون کبدی طی ریپرفیوژن یا ریپرفیوژن غیر موثر را سبب می‌شود(۶). در کبد، رادیکال NO توسط نیتریک اُکساید سنتاز اندوتلیالی (*eNOS*) یا نیتریک اُکساید سنتاز القایی (*iNOS*) تولید می‌شود و این در حالی است که *eNOS* تنها در سلول‌های اندوتلیال سینوزوئیدی بیان دائمی دارد. بیان *iNOS* عمدتا در سلول های التهابی به طور القایی تنظیم می‌شود. به‌طور معمول پذیرفته شده است که طی I/R، NO مشتق از *eNOS* از طریق انبساط عروق، کاهش چسبندگی و تجمع نوتروفیل‌ها و پلاکت‌ها و ممانعت از انقباض سلول‌های ستاره‌ای کبدی، حفظ سیالیت خون را موجب می‌شود و اما، NO اضافی حاصل از عمل *iNOS* در شرایط التهابی، با ترکیبات رادیکالی از جمله سوپر اکسید واکنش می‌دهد و رادیکال خطرناک پروکسی نیتریت (استرس نیتروزاتیو) را تولید می‌نماید(۷). همراه با ریپرفیوژن و برقراری جریان خون و اکسیژن، ROS به مقدار فراوان در بافت ایسکمیک تولید می‌شود. توانایی این مولکول‌های فعال در ایجاد آسیب استرس اکسیداتیو و فعال‌کردن مسیرهای پیام رسانی و در نهایت تولید مازاد پاسخ التهابی سبب آپوپتوز و نارسایی جریان خون عروق کوچک می‌شود، بنابراین ROS و RNS از اهمیت زیادی در آسیب‌های کبد طی I/R برخوردار هستند و به همین دلیل، زداینده‌های رادیکال آزاد برای کاهش این آسیب‌ها مورد توجه بسیار قرار گرفته‌اند(۸). سیلیمارین، ۸۰-۷۰ درصد از عصاره دانه گیاه خار مریم [1] را تشکیل می‌دهد و از دیرباز به عنوان حمایت‌کننده کبد شناخته شده است. در سال اخیر بیش از ۵۰۰ مقاله روی اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد سرطانی مختلف از سیلیمارین و محتویات آن منتشر شده است. ترکیبات مختلفی مثل، سیلیبین A و B، سیلیکریستین، سیلیدیانین، تاکسیفولین و کوئرستین از سیلیمارین جداسازی شده‌اند. سیلیبینین یا ترکیب سیلیبین A و B فلاونولیگنانی است که ۸۰-۷۰ درصد از سیلیمارین را تشکیل می‌دهد و ماده موثر اصلی آن می‌باشد(۹). تصویر شماره ۱ ساختار سیلیبینین را نشان می‌دهد. گزارش شده است که سیلیبینین از طریق جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد به خصوص به‌وسیله حلقه C، افزایش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و نیز تحریک

1. Silybum marianum

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

فاکتور رونویسی آنتی اکسیدانی Nrf-2، ارتقا ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن در شرایط استرس اکسیداتیو را سبب می شود(۱۰). سیلیبینین قادر است از طریق مهار فعالیت فاکتور رونویسی التهابی NF-κB از مازاد پاسخ التهابی جلوگیری کند و همچنین اثرات ضد سرطانی سیلیبینین از طریق القای آپوپتوز و مهار فاکتور های رشد به اثبات رسیده است(۱۲،۱۱). با توجه به این که پاسخ التهابی، استرس نیتروزاتیو (ناشی از *iNOS*) و نارسایی جریان خون عروق کوچک (ناشی از تغییر بیان ژن‌های تنظیم کننده انقباض و انبساط عروق مثل *eNOS*) از مهم‌ترین علل آسیب‌های I/R کبدی می‌باشد و با توجه به این که سیلیبینین و سیلیمارین، اثرات ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و توانایی تغییر بیان ژن‌ها در شرایط بالینی مختلف از خود نشان می‌دهند، در این مطالعه تاثیرات سیلیبینین روی بیان ژن‌های *eNOS* و *iNOS*، مقادیر سرمی AST و ALT و هم‌چنین آسیب‌های بافتی کبد (مثل نفوذ و فعال شدن سلول‌های التهابی)، طی I/R کبدی در رت مورد بررسی قرار گرفت.



تصویر شماره ۱: ساختار سیلیبینین

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، ۳۲ رت نر نژاد ویستار با وزن ۲۱۰ تا ۲۳۰ گرم که از مرکز تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تهیه گردید، مورد مطالعه قرار گرفت. این رت‌ها در دمای ۲۱ تا ۲۳ درجه، رطوبت ۵۰ تا ۵۵ درصد، سیکل روشنایی تاریکی ۱۲ ساعته و در اتاق دارای تهویه مناسب نگهداری شدند. آب و رژیم غذایی طبیعی به صورت دائمی در اختیار آن‌ها قرار داده شد. یک هفته قبل از شروع آزمایش، رت‌ها جهت مطابقت با محیط، به اتاق آزمایش منتقل شدند. رت ها به صورت تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی، گروه حامل، SILI، I/R و گروه I/R + SILI تقسیم شدند. رت‌ها در گروه اول، حامل (Vehicle)، فقط مورد عمل لاپارتومی قرار گرفته و ۱۰ درصد DMSO (حلال سیلیبینین) دریافت کردند. گروه دوم، SILI، رت‌ها مورد عمل لاپارتومی قرارگرفته و سیلیبینین دریافت کردند. رت‌ها در گروه سوم I/R، طی I/R حامل (حلال سیلیبینین) دریافت کردند و گروه چهارم گروه SILI+I/R رت‌ها همراه با I/R سیلیبینین دریافت کردند.

روش ایجاد ایسکمی- ریپرفیوژن

کلیه مراحل کار با حیوانات تحت نظارت کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شد. اعمال جراحی تحت شرایط استریل انجام گرفت و برای حذف اثرات مخدوش‌کننده، زمان همگی در ساعات ۸ تا ۱۴ انجام شدند. رت‌ها ۱۸ ساعت قبل از جراحی در حالت ناشتا قرار گرفته و تنها آب در اختیار آن ها قرار داده شد. برای بیهوشی عمومی از کتامین ۶۰ mg/kg و زایلازین ۸ mg/kg به صورت داخل صفاقی استفاده شد. برای القای ایسکمی، ابتدا برش روی خط میانی شکم انجام شد و کبد به کمک انگشتان دست بیرون آورده، تا عروق سه گانه پورت شامل شریان کبدی، ورید پورت و مجرای صفراوی قابل رویت شود. شاخه چپ عروق سه گانه، مربوط به لوب‌های چپ و میانی کبد به وسیله کلمپ فلزی بولداگ به مدت یک ساعت مسدود شدند. با این روش، ایسکمی کلی کبد به میزان ۷۰ درصد حاصل شد(۱۳). لوب راست و دمی برای جلوگیری از احتقان روده‌ای و گرفتگی عروق مزانتریک، جریان خون آزاد داشتند. در طول مدت ایسکمی، کبد با گاز استریل

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

آغشته به سرم فیزیولوژی مرطوب نگهداشته شد. پس از یک ساعت ایسکمی، کلمپ به آهستگی برداشته و کبد به داخل حفره شکمی انتقال یافت. محل برش جراحی دوخته شد و ریپرفیوژن به مدت ۵ ساعت آغاز گردید. در طول این مدت هر زمان که نیاز بود، رت‌ها با کتامین دوباره بیهوش شدند.

تزریق سیلیبینین

سیلیبینین با خلوص بیشتر از ۹۸ درصد به صورت لیوفیلیزه (شرکت سیگما) خریداری شد. این دارو به دلیل حلالیت بسیار کم در آب (۰/۵ gr/L)، ۱۰ دقیقه قبل از تزریق در DMSO ۱۰ درصد (در نرمال سالین) و در حجم نهایی ۰/۵ mL حل گردید. سیلیبینین دو بار، یک بار نیم ساعت قبل ایسکمی و بار دیگر بلافاصله پس از شروع ریپرفیوژن و هر بار ۵۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی تزریق شد(۱۶-۱۴).

سنجش AST و ALT

پس از ریپرفیوژن، نمونه های خون از ورید اجوف تحتانی، جمع آوری شد و به مدت بیست دقیقه جهت جدا شدن لخته، در دمای محیط قرار داده شد. جهت جدا سازی سرم، نمونه‌ها در دور ۳۰۰۰ rpm، به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ شدند. در نهایت سرم‌ها تا زمان شروع آنالیزهای بیوشیمیایی در ۷۰- °C نگهداری شدند. سنجش فعالیت AST و ALT، سرم بر حسب (U/L) پس از ۲۴ ساعت از نمونه‌گیری در آزمایشگاه با دستگاه اسپکتروفوتومتر با استفاده از کیت پارس آزمون (کرج، ایران) انجام شد.

بررسی های بافت شناسی

همزمان با خون‌گیری، قطعاتی از بافت کبد از لوب ایسکمی شده جهت بررسی‌های هیستولوژی گرفته شد و جهت خارج کردن خون و لخته، بلا فاصله در سرم فیزیولوژی شستشو داده شد. بافت‌ها در فرمالین ۱۰ درصد در دمای محیط تا شروع بررسی‌ها نگهداری شدند. برای آماده‌سازی بافت‌ها جهت بررسی‌های میکروسکوپی، بافت‌ها با آب شستشو داده شد تا مایع فیکساتیو خارج گردد، سپس دهیدراتاسیون با درجات مختلف الکل (۱۰۰-۵۰ درصد) انجام شد و بعد از آن در زایلن شفاف شدند. در نهایت در پارافین قرار داده و به قطعاتی به اندازه ۵-۳ میکرو متر با میکروتوم برش داده شد. قطعات در هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند.

بررسی بیان ژن های eNOS و iNOS

استخراج RNA کل از ۳۰ mg از بافت کبد که درون RNA LATER (شرکت کیاژن) در دمای ۷۰ °C- نگهداری می‌شد، طبق پروتکل RNeasy plus mini kit (Qiagen, Ger) انجام شد. خلوص RNA استخراج شده با اسپکتروفوتو متری و نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ nm به ۲۸۰ بررسی گردید. این RNA ها بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد دارای سایبرگرین با اختلاف پتانسیل ۸۵ V، به مدت ۴۵ دقیقه ران شده و از لحاظ داشتن دو باند مشخص مربوط به RNA ریبوزومی ۱۸ S و ۲۸ S تایید شدند. cDNA نیز از ۵ µg از RNA کل استخراج شده طبق پروتکل QuantiTect RT-PCR kit (Qiagen, Ger) در کمتر از ۳۰ دقیقه ساخته شد. Real time PCR در حجم کلی ۲۵ µL، ۱۲/۵ µL مسترمیکس حاوی سایبرگرین (Amplicon-poland)، ۲ µL cDNA، پرایمر مستقیم و معکوس هرکدام ۰/۵ µL (طوری که غلظت نهایی کلیه پرایمرها ۱۰ µM شد) با دستگاه Rotor-Gene®Q انجام شد (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: توالی پرایمر ها و طول قطعات محصولات

ژن	توالی پرایمر 3'→5'	طول محصولات (bp)
iNOS	Sense : TGGTGAGGGGACTGGACTTT Antisense: CCAACTCTGCTGTTCTCCGT	207
eNOS	Sense : CAGGCTCTCACTTACTTCC Antisense: AACCACTTCCATTCTTCGTA	149
β-actin	Sense : 5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3' Antisense: 5'-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3'	145

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

کلیه واکنش‌ها به صورت دوپلیکیت و در پروتکل دمایی، ۱۵ دقیقه در °C ۹۵ جهت فعال‌سازی آنزیم TAq polymerase، سپس تا ۳۵ سیکل، ۲۰ ثانیه در °C ۹۵ (دناتوراسیون)، ۳۰ ثانیه در °C ۶۱ (اتصال) و ۳۰ ثانیه در °C ۷۲ (تکثیر) انجام شد. دمای اتصال از طریق گرادیانت دمایی با PCR معمولی تعیین گردید. از ژن بتا-اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده و تغییرات بیان ژن‌ها نسبت به آن سنجش شد. محصولات Real time PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد حاوی سایبرگرین، در اختلاف پتانسیل V ۸۵، به مدت ۴۰ دقیقه ران و باندها از لحاظ اختصاصی بودن بررسی شدند. نمودار دمای ذوب پرایمرها از لحاظ داشتن یک پیک تایید شدند و نتایج Real time PCR طبق فرمول ۱ آنالیز شدند.

فرمول ۱

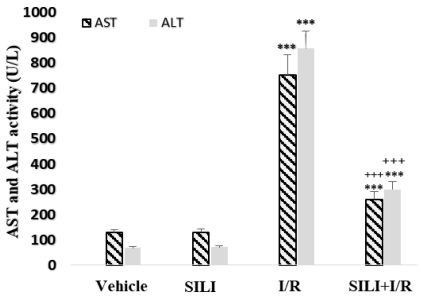
$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}, \Delta\Delta Ct = \Delta Ct\,(test) - \Delta Ct\,(calibrator)$$

نتایج سنجش AST و ALT به صورت میانگین ± انحراف‌معیار میانگین (mean ± SEM) بیان شدند. تفاوت میانگین گروه‌ها توسط آزمون ANOVA و Tukey multiple comparison test در نرم‌افزار SPSS-18 تعیین و سطح معنی‌داری $p < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج سنجش AST و ALT

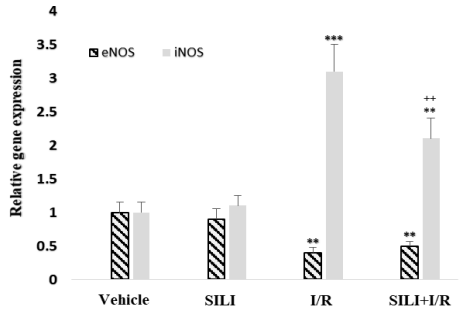
فعالیت آنزیم‌های AST و ALT سرم در گروه Vehicle و SILI تفاوت چندانی با هم نداشتند. در گروه I/R فعالیت این آنزیم‌ها نسبت به گروه حامل افزایش چشمگیری داشت (p<۰/۰۰۱) و در گروه I/R+SILI، سیلیبینین توانست فعالیت این آنزیم ها را به صورت قابل توجهی (p<۰/۰۰۱) نسبت به گروه I/R کاهش دهد هر چند میزان آن به سطح گروه حامل نرسید. نمودار شماره ۱، اثر سیلیبینین روی فعالیت آنزیم‌های AST و ALT سرم، پس از I/R کبدی را نشان می دهد.



نمودار شماره ۱: اثر سیلیبینین روی فعالیت آنزیم های AST و ALT سرم، پس از I/R کبدی. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار میانگین (mean ± SEM) با ۸ رت در هر گروه نشان داده شدند. *** اختلاف معنی‌دار را نسبت به گروه حامل (p<۰/۰۰۱) و +++ اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه I/R (p<۰/۰۰۱) را نشان می‌دهد.

نتایج Real time PCR

پس از آنالیز نتایج Real time PCR، مشخص شد که میزان mRNA ژن‌های *eNOS* و *iNOS* در گروه‌های Vehicle و SILI تفاوت چندانی نداشته است. اما در گروه I/R مقدار mRNA، *eNOS* و *iNOS* نسبت به گروه Vehicle، به ترتیب کاهش ($p < ۰/۰۱$) و افزایش ($p < ۰/۰۰۱$) چشمگیری داشته است. درمان با سیلیبینین در گروه SILI+I/R توانست میزان بیان ژن *iNOS* را نسبت به گروه I/R کاهش دهد ($p < ۰/۰۱$) و این در حالی است که سیلیبینین نتوانست تاثیر معنی‌داری روی بیان ژن *eNOS* اعمال کند. نمودار شماره۲، مقایسه نسبی بیان ژن‌های *eNOS* و *iNOS* را در در چهار گروه نشان می‌دهد.

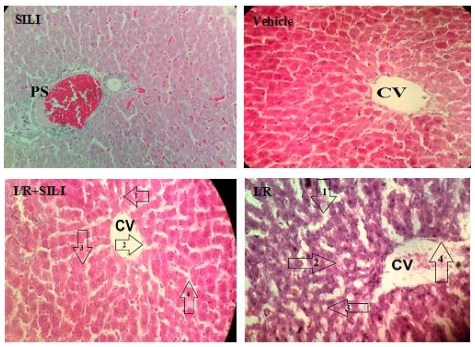


نمودار شماره ۲: مقایسه نسبی بیان ژن های *eNOS* و *iNOS* در چهار گروه مورد مطالعه، نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار میانگین (mean ± SEM) با ۸ رت در هر گروه نشان داده شدند. **: اختلاف معنی‌دار را نسبت به گروه حامل(p<۰/۰۱) و ***: اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه حامل(p< ۰/۰۰۱) را نشان می‌دهند. ++: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (p< ۰/۰۱) نسبت به گروه I/R می باشد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

نتایج بررسی های بافت شناسی

بررسی‌های میکروسکوپی لام‌های تهیه شده از بافت کبد، نشان داد که گروه‌های Vehicle و SILI، ساختار بافتی سالمی داشته و اندوتلیوم سینوزوئیدها و ورید مرکزی، سالم بوده است. در گروه I/R، پارانشیم کبد به صورت کلی آسیب دید. قرینگی دو طرفه هپاتوسیت‌ها، اطراف ورید مرکزی از بین رفت و اتساع وسیع سینوزوئید ها مشاهده گردید. سلول‌های کوپفر، فعال و متراکم بودند و نفوذ و تجمع نوتروفیل‌ها در سینوزوئیدها و اطراف وریدمرکزی دیده شد. واکوئلیزاسیون سیتوپلاسمی و دژنراسیون هپاتوسیت‌ها در چندین مورد مشاهده شد و کانون‌های نکروز به ندرت و تنها در ناحیه ۳ بافت کبد دیده شد. در گروه I/R+SILI، گسترش سینوزوئیدها، نفوذ نوتروفیل‌ها و فعال شدن سلول‌های کوپفر نسبت به گروه I/Rشدت کم‌تری داشت و هپاتوسیت‌ها و سلول‌های اندوتلیال مورفولوژی سالم‌تری داشتند. دژنراسیون و واکوئلیزاسیون هپاتوسیت‌ها جز در موارد محدود و نکروز سلولی اصلا دیده نشد. تصویر شماره ۲، مقایسه تصاویر بافت شناسی در چهار گروه را نشان می دهد.



تصویر شماره ۲: مقایسه تصاویر بافت‌شناسی درچهارگروه مورد مطالعه. گروه Vehicle: ساختار بافتی و ورید مرکز لوبولی سالم هستند (ورید مرکز لوبولی:CV)، گروه SILI: ساختار بافتی و فضای پورت سالم هستند (فضای پورت :PS). در گروه I/R، ۱: اتساع وسیع سینوزوئیدها، ۲: دژنراسیون آبی شدید، ۳: واکوئلیزاسیون سیتوپلاسمی و ۴: تخریب اندوتلیوم مشاهده می‌شود. در گروه I/R+SILI، ۱: تعداد سلول‌های کوپفر فعال، ۲: آسیب اندوتلیوم، ۳: دژنراسیون آبی و ۴: اتساع سینوزوئیدها کاهش یافته است. تصاویر با میکروسکوپ نوری Nicon و با بزرگنمایی ۲۰۰ x تهیه شده است

بحث

عوارض I/R کبدی، علت ۸۱ درصد از عدم عملکرد یا عملکرد نا صحیح کبد پس از پیوند می‌باشند(۱۷). پاتوژنز آسیب‌های I/R کبدی چند عاملی، پیچیده و شامل تهی شدن سلول از ATP، استرس اکسیداتیو، آسیب جریان خون عروق کوچک و پاسخ التهابی می‌باشد که ممکن است در نهایت به پاسخ التهابی سیستمیک، آسیب ارگان‌های دورتر و رد حاد پیوند منجر شود(۱۹،۱۸). این آسیب‌ها در زمان ریپرفیوژن به علت برقراری جریان خون و تحویل اکسیژن و تشکیل ROS شدیدتر می‌شوند. طی I/R همانند سایر شرایط استرس اکسیداتیو، ROS نقش اصلی را در بروز آسیب‌ها دارند. شواهد زیادی وجود دارند که نشان می دهند، کاهش آسیب‌های I/R کبد به میزان قرار گرفتن در معرض آنتی‌اکسیدان بستگی دارد. سطح آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی خون مثل سوپر اکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و پاراکسوناز به دلیل افزایش سطح ROS کاهش می‌یابد، در نتیجه آنتی‌اکسیدان درمانی یک استراتژی خوب برای کاهش آسیب‌های I/R می‌باشد(۲۱،۲۰). سیلیبینین ترکیبی از نسبت مساوی سیلیبین A و B و ۸۰ درصد ماده تشکیل دهنده سیلیمارین می‌باشد و نقش عمده‌ای در بروز خواص بیولوژیک سیلیمارین دارد. علاوه بر خاصیت آنتی اکسیدانی، مطالعات نشان داده‌اند که سیلیبین از طریق مهار بیان فاکتور رونویسی NF-κB و در نتیجه کاهش سطح TNF-α، PGE2 و IL-1β اثرات ضد التهابی زیادی از خود نشان داده است(۲۲). اثرات ضد سرطانی سیلیبینین روی ریه، پروستات، مثانه و تیروئید نیز اثبات شده است(۲۴،۲۳).

در مطالعه حاضر سیلیبینین توانست میزان AST و ALT سرم را که در شرایط I/R افزایش چشمگیر داشت، تا حد قابل توجهی کاهش دهد. این آنزیم‌ها در اثر افزایش ROS طی I/R و به دنبال آن پراکسیداسیون لیپیدها و پروتئین‌های غشای سلول‌های پارانشیم کبد آزاد می‌شوند. در مطالعات دیگر نشان داده شد که

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

افزایش آن‌ها با افزایش زمان ریپرفیوژن نیز بیش‌تر می‌شود و پیک سرمی آن‌ها دوازده ساعت پس از ریپرفیوژن است(۲۵). به نظر می‌رسد که سیلیبینین با خنثی سازی حجم زیادی از ROS توانست تا حدودی باعث پایداری غشا و در نتیجه کاهش سطح AST و ALT سرم شود(۲۶). بررسی‌های بافت شناسی مطالعه حاضر نشان داد که آسیب‌های بافت کبد مثل نفوذ و تجمع نوتروفیل‌ها، فعال شدن سلول‌های کوپفر، واکوئلیزاسیون سیتوپلاسمی و گسترش سینوزوئیدها مشاهده شده در گروه I/R، با تزریق سیلیبین تا حدودی کاهش یافته است. پاسخ التهابی یکی از علل اصلی این آسیب‌ها می‌باشد. طی ایسکمی DAMPs[2] از سلول‌های آسیب دیده آزاد می‌شود که باعث فعال شدن سلول‌های کوپفر در فاز حاد می‌شود و هم‌چنین، این سلول‌ها با تولید ROS (به خصوص از طریق میلوپراکسیداز) و سایتوکاین‌هایی مثل TNF-α و IL-1 باعث جذب شیمیایی نوتروفیل‌ها و پلاکت‌ها در فاز تاخیری می‌شوند که افزایش تولید ROS (به خصوص از طریق NADPH اکسیداز) و سایتوکاین‌های التهابی مثل IL-8 از این سلول‌ها را به همراه دارد. این وقایع باعث فعال‌شدن بیش‌تر سلول‌های کوپفر می‌شود. بنابراین سلول‌های التهابی اثرات یکدیگر را تقویت می‌کنند(۲۷). مقدار زیاد ROS تولید شده باعث دژنراسیون، آسیب اندوتلیوم و نکروز می‌شود که در بررسی‌های میکروسکوپی بافت کبد مشاهده شده است. به نظر می‌رسد سیلیبین با کاهش سطح فاکتورهای التهابی، ROS و افزایش ساخت پروتئین که در مطالعات گذشته به اثبات رسیده است، اثرات حمایتی در برابر آسیب‌های پارانشیم کبد از خود نشان داده است(۲۹،۲۸). اندوتلیوم عروق مستقیما در معرض نیروی مکانیکی جریان خون قرار دارد، بنابراین در پاسخ به آسیب کاهش جریان خون نقش مهمی بر عهده دارد. اندوتلیوم سینوزوئیدهای کبد با آزاد کردن ترکیبات گشادکننده عروق مثل NO hyperpolarizing factor و پروستاسایکلین‌ها و نیز ترکیبات منقبض کننده عروق مثل ET-1 و ترومبوکسان A2 نقش مهمی در تنظیم پاسخ عروق به آسیب I/R ایفا می‌کند. گزارش شده است که بیان ژن‌های تنظیم‌کننده انقباض و انبساط عروق طی I/R تغییر می‌کند. به نظر می‌رسد تغییر در نیروی مکانیکی جریان خون روی اندوتلیوم عروق از طریق تحریک مسیرهای پیام رسانی درون سلولی، در نهایت منجر به تغییر بیان ژن‌های مرتبط با انقباض و انبساط عروق کبدی می‌گردد که مهم‌ترین پیامد این وقایع افزایش ET-1 و کاهش NO می‌باشد(۴،۳۰،۳۱). مهم‌ترین منقبض کننده عروق، ET-1 است که مطالعات زیادی حاکی از افزایش آن در طول I/R می‌باشد(۳۲). NO مشتق از آنزیم *eNOS* به عنوان متسع کننده قوی عروق مطرح است. به دنبال I/R سطح NO اندوتلیومی به سه دلیل کاهش می‌یابد که این سه دلیل شامل کاهش تولید از اندوتلیوم ناشی از کاهش اکسیژن و NADPH (دو سوبسترای مورد نیاز برای ساخ NO) در کبد، واکنش NO با ROS تولید شده طی I/R و تولید رادیکال‌های نیتروژن (RNS) و آزاد شدن مقادیر زیاد آرژینیاز بلافاصله پس از ریپرفیوژن که در آزمایشات گذشته اثبات شده است که باعث کاهش آرژنین در دسترس برای تولید NO می‌گردد، می‌باشد. تغییر تعادل NO/ET از طریق تنگ کردن عروق باعث کاهش جریان خون کبد طی ریپرفیوژن می‌شود که به ایسکمی دوم معروف می‌باشد(۳۳). در دیواره عروق، NO حاصل از عملکرد *eNOS* از غشای سلول‌های اندوتلیال عبور نموده، وارد سلول‌های هدف خود که مهم‌ترین آن سلول‌های ستاره‌ای است، می‌شود(۳۴). لازم به یادآوری است که مونواکسید کربن (CO) نیز با اتصال به گروه هم (Heme) موجود در گوانیلیل سیکلاز، فعالیت آن را تنها ۶ برابر افزایش می‌دهد که این نکته قدرت عملکرد NO را در این رابطه نشان می‌دهد(۳۵). علاوه بر اثرات فوق، مشخص شده است که cGMP القاء شده توسط NO به صورت منفی مولکول‌هایی نظیر گلیکوفورین IIb/IIIa

1. Damage-associated molecular patterns

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

(برای تجمع و فعال شدن پلاکت‌ها و نوتروفیل‌ها ضروری هستند) را تنظیم می‌کند. در نتیجه NO باعث افزایش سیالیت خون و ریپرفیوژن موثر می‌شود(۳۶).

بررسی‌های این مطالعه نشان داد که بیان ژن *eNOS* طی I/R در کبد کاهش می‌یابد. در مطالعه KhonakdarTarsi و همکاران نشان داده شد که بیان ژن *eNOS* پس از ۶ ساعت ریپرفیوژن متعاقب ۹۰ دقیقه ایسکمی کبدی در رت، کاهش یافته است(۳۷). در مطالعه‌ای که توسط Napoli و همکاران انجام پذیرفت، اثبات شد که میزان mRNA ژن *eNOS* و همین‌طور پروتئین آن در قلب رت‌های دچار ۱۵ دقیقه ایسکمی و ۱۸۰-۲۲ دقیقه ریپرفیوژن نسبت به گروه شاهد کاهش چشمگیری داشته است(۳۸). به نظر می‌رسد که کاهش سطح بیان *eNOS* و مقدار NO و به دنبال آن انقباض سینوزوئیدها، به حفظ فشار خون در پاسخ به استرس کاهش جریان خون طی ایسکمی منجر می‌شود. هم‌چنین گزارش شده است که بیان *eNOS* با افزایش سطح ROS سرکوب می‌شود(۳۹). در مطالعات گذشته اثر ترکیبات مختلف روی بیان *eNOS* آزمایش شد. درمطالعه Ghanaat و همکاران، تزریق داروی ضد التهاب دگزامتازون قبل و پس از ایسکمی-ریپرفیوژن کبدی تغییر محسوسی در بیان ژن *eNOS* ایجاد نکرد(۴۰). Hung و همکاران اثبات کردند که درمان رت‌ها با آنتی‌اکسیدان گیاهی رزوراترول، باعث افزایش بیان *eNOS* در ایسکمی-ریپرفیوژن قلبی شده است(۴۱). در بررسی‌هایی که در مطالعه حاضر انجام گرفت، سیلیبینین نتوانست تاثیر معنی‌داری روی بیان ژن *eNOS* بگذارد. نیتریک اکسید سنتاز القایی برای اولین بار در ماکروفاژهای فعال شناسایی گردید و تاکنون در سلول‌های دیگر نظیر مونوسیت ها، نوتروفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها، هپاتوسیت‌ها، پلاکت‌ها و اندوتلیوم نیز شناسایی شده است(۱). بیان ژن *iNOS* در صورت فعال شدن سیستم ایمنی (به عنوان مثال در پاسخ به لیپو پلی ساکارید، اینترفرون گاما، TNF-α و IL-I) القاء می‌شود(۴۲).

مطالعات زیادی نشان دادند، NO تولیدی از منابع التهابی صرف واکنش با ROS می‌شود و رادیکال‌های آزاد نیتروژنه (RNS) مثل پروکسی نیتریت تولید می‌کند که باعث تشدید آسیب‌های استرس اکسیداتیو I/R می‌شود(۳۴). در همین راستا به کارگیری L-N6(iminoethyl) lysine(L-NIL) به‌عنوان مهارکننده اختصاصی *iNOS*، آسیب‌های I/R کبدی را تا حد زیادی کاهش داده است(۴۳). به نظر می‌رسد، به دلیل بالا بودن سطح ROS در سلول‌های التهابی (محل تولید *iNOS*) و افزایش سطح آن‌ها در بافت کبد در فاز تاخیری ریپرفیوژن به بیشینه خود، تعجب‌آور نخواهد بود که NO با ROS واکنش دهد و RNS تولید کند. نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژن *iNOS*، طی I/R افزایش یافت که احتمالا علت اصلی آن فعال شدن سیستم ایمنی به خصوص نوتروفیل‌ها و سلول‌های کوپفر در فاز تاخیری (۲ ساعت پس از ریپرفیوژن) می‌باشد که در بررسی‌های میکروسکوپی مشاهده شده است. کاهش رونویسی ژن *iNOS* می‌تواند ازعمق آسیب‌های I/R بکاهد. در مطالعه Park و همکاران، سطح mRNA ژن *iNOS*، با تزریق قبل از ایسکمی ملاتونین کاهش یافت(۴۴).

Ghobadi و همکاران نیز در مطالعه ی خود اثبات کردند که درمان با دگزامتازون قبل و پس از ایسکمی بیان ژن *iNOS* را به مقدار معنی‌داری کاهش می‌دهد(۴۵). نتایج بررسی‌های مطالعه حاضر نشان داد، سیلیبین بیان ژن *iNOS* را به‌طور معنی‌داری طی I/R کاهش می‌دهد. به‌نظر می‌رسد که سیلیبینین با کاهش ROS، آسیب سلولی و فاکتورهای التهابی، باعث کاهش فعال‌سازی سلول‌های التهابی منبع تولید iNO می‌شود.

در نتیجه، سیلیبینین موجب کاهش آسیب‌های کلی بافت کبد طی I/R می‌شود و هم‌چنین سیلیبینین با کاهش بیان ژن *iNOS* می‌تواند از اثرات مضر آن بکاهد. با این حال پیشنهاد می‌گردد که اثر سیلیبینین روی مقدار

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

پـروتئین‌هـای *eNOS*، *iNOS* و هـم‌چنـین فعالیـت ایـن آنزیم‌ها طی I/R بررسی شود. با توجه به محدودیت‌های مالی و زمانی، انجام برخی از تکنیک‌های پیشرفته‌تر مثل وسترن بلات و ایمونوهیستوشیمی برای مـا مقـدور نبـود. اما انجام این تکنیک‌ها جهت تایید یافته‌هـای ایـن مقالـه توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

این مطالعه با کد اخلاق ۳۴۰ و با پشتیبانی تجهیزاتی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی انجام شده اسـت. عـلاوه بر این از کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علـوم پزشـکی مازندران نیز که با حمایت‌های مالی خود در اجرای بخشـی از این مطالعه سهیم بوده‌اند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. Nastos C, Kalimeris K, Papoutsidakis N, Tasoulis M-K, Lykoudis PM, Theodoraki K, et al. Global consequences of liver ischemia/ reperfusion injury. Oxid Med Cell Longev 2014; 2014: 906965.
2. Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Piña E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. J Surg Res 2008; 147(1): 153-159.
3. Massip Salcedo M, RosellóCatafau J, Prieto J, Avila MA, Peralta C. The response of the hepatocyte to ischemia. Liver Int 2007; 27(1): 6-16.
4. Sonin NV, Garcia-Pagan J-C, Nakanishi K, Zhang JX, Clemens MG. Patterns of vasoregulatory gene expression in the liver response to ischemia/reperfusion and endotoxemia. Shock 1999; 11(3): 175-179.
5. Li J, Li R, Lv G, Liu H. The mechanisms and strategies to protect from hepatic ischemia-reperfusion injury. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2015; 19(11): 2036-2047.
6. Hide Alférez D, Ortega Ribera M, García Pagán JC, Peralta Uroz C, Bosch i Genover J, Gracia-Sancho J. Effects of warm ischemia and reperfusion on the liver microcirculatory phenotype of rats: underlying mechanisms and pharmacological therapy. Sci Rep 2016; 6: 22107.
7. Abd-Elbaset M, Arafa E-SA, El Sherbiny GA, Abdel-Bakky MS ,Elgendy ANA. Quercetin modulates iNOS, eNOS and NOSTRIN expressions and attenuates oxidative stress in warm hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci 2015; 4(3): 246-255.
8. Sun Y, Pu L-Y, Lu L ,Wang X-H, Zhang F, Rao J-H. N-acetylcysteine attenuates reactive-oxygen-species-mediated endoplasmic reticulum stress during liver ischemia-reperfusion injury. World J Gastroenterol 2014; 20(41): 15289-15298.
9. Abenavoli L, Capasso R, Milic N ,Capasso F. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. Phytother Res 2010; 24(10): 1423-1432.
10. Prabu SM, Muthumani M. Silibinin ameliorates arsenic induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats. Mol Biol Rep 2012; 39(12): 11201-11216.
11. Wang C, Wang Z, Zhang X, Zhang X, Dong L, Xing Y, et al. Protection by silibinin against experimental ischemic stroke: up-regulated pAkt, pmTOR, HIF-1α and Bcl-2, down-regulated Bax, NF-κB expression. Neurosci Lett 2012; 529(1): 45-50.
12. Tyagi A, Singh RP, Ramasamy K, Raina K, Redente EF, Dwyer-Nield LD, et al. Growth inhibition and regression of lung tumors by

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

silibinin: modulation of angiogenesis by macrophage-associated cytokines and nuclear factor-κB and signal transducers and activators of transcription 3. Cancer Prev Res (Phila) 2009; 2(1): 74-83.

13. Adam ANI. Some mechanisms of the protective effect of ischemic preconditioning on rat liver ischemia-reperfusion injury. Int J Gen Med 2014; 7: 483-489.
14. Canbek M, Uyanoglu M, Bayramoglu G, Senturk H, Erkasap N, Koken T, et al. Effects of carvacrol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver. Phytomedicine 2008; 15(6-7): 447-452.
15. Ergün Y, Kurutaş EB ,Atalay F, Alıcı T. Effects of silibinin and ethanol on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. Acta Cir Bras 2013; 28(3): 179-184.
16. Küçükdurmaz F, Efe E, Ergün Y, Kılıç M, Resim S. The effects of silibinin on corporal oxidative stress and antioxidant enzymes in ischemic priapism. J Clin Anal Med 2017; 8(suppl 4): 266-270.
17. Clavien P-A, Selzner M, Rüdiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, et al. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. Ann Surg 2003; 238(6): 843-852.
18. Han D, Hanawa N, Saberi B, Kaplowitz N. Mechanisms of liver injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2006; 291(1): G1-G7.
19. Cederbaum AI. Introduction—serial review: alcohol, oxidative stress and cell injury. Free Radic Biol Med 2001; 31(12): 1524-1526.
20. Rovati LC, D'amato MM, Mengs U, Pohl R-T, Ferenci P. Silibinin component for the treatment of hepatitis. Google Patents; 2016.
21. Zhou T, Prather ER, Garrison DE, Zuo L. Interplay between ROS and antioxidants during ischemia-reperfusion injuries in cardiac and skeletal muscle. Int J Mol Sci 2018; 19(2): 417.
22. He Q, Kim J, Sharma RP. Silymarin protects against liver damage in BALB/c mice exposed to fumonisin B1 despite increasing accumulation of free sphingoid bases. Toxicol Sci 2004; 80(2): 335-342.
23. Tiwari P, Mishra K. Silibinin in cancer therapy: A promising prospect. Expert Rev Clin Pharmacol 2015; 1(3): 303-318.
24. Miethe C, Nix H, Martin R, Hernandez A, Price R. Silibinin Reduces the Impact of Obesity on Invasive Liver Cancer. Nutr Cancer 2017; 69(8): 1272-1280.
25. Demirci B, Cindoruk M, Yilmaz U, Demirag M, Gonul I, Demirci U, et al. Effects of everolimus on hepatic ischemia/reperfusion injury in an experimental rat model. European Surgery 2013; 45(3): 325-330.
26. Yildiz F, Terzi A, Ates M, Aksoy N, Cakir H, Ocak AR, et al. Nigella sativa relieves the deleterious effects of ischemia reperfusion injury on liver. World J Gastroenterol 2008; 14(33): 5204-5209.
27. AbuAmara M, Yang SY, Tapuria N, Fuller B, Davidson B, Seifalian A. Liver ischemia/ reperfusion injury: processes in inflammatory networks—a review. Liver Transpl 2010; 16(9): 1016-1032.
28. Giorgi VSI, Peracoli MT, Peracoli JC, Witkin SS, Bannwart-Castro CF. Silibinin modulates the NF-κb pathway and pro-inflammatory cytokine production by mononuclear cells from preeclamptic women. J Reprod Immunol 2012; 95(1-2): 67-72.
29. Vargas-Mendoza N, Madrigal-Santillán E, Morales-González Á, Esquivel-Soto J, Esquivel-Chirino C ,y González-Rubio MG-

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

L, et al. Hepatoprotective effect of silymarin. World J Hepatol 2014; 6(3): 144.

30. Orr AW, Helmke BP, Blackman BR, Schwartz MA. Mechanisms of mechanotransduction. Dev Cell 2006; 10(1): 11-20.
31. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. World J Gastrointest Surg 2001; 181(2): 160-166.
32. Garcia-Pagán J-C, Zhang JX, Sonin N, Nakanishi K, Clemens MG. Ischemia/reperfusion induces an increase in the hepatic portal vasoconstrictive response to endothelin-1. Shock (Augusta, Ga) 1999; 11(5): 325-329.
33. Huang H, Evankovich J, Yan W, Nace G, Zhang L, Ross M, et al. Endogenous histones function as alarmins in sterile inflammatory liver injury through Toll like receptor 9 in mice. Hepatology 2011; 54(3): 999-1008.
34. Guan L-Y, Fu P-Y, Li P-D, Li Z-N, Liu H-Y, Xin M-G, et al. Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide. World J Gastrointest Surg 2014; 6(7): 122-128.
35. Potter LR. Guanylyl cyclase structure, function and regulation. Cell Signal 2011; 23(12): 1921-1926.
36. Mikaeili S, Kadkhodaee M, Golab F, Zahmatkesh M, Mahdavi-Mazdeh M, Seifi B, et al. Effects of liver ischemia-reperfusion on renal functional and oxidative stress indices. Physiol Pharmacol 2009; 13(3):254-262 (Persian).
37. Tarsi AK, Ansari M, Khansari MG, Keramatipour M, Ebrahimi AE, Emamgholipour SE, et al. Melatonin inhibits endothelin-1 and induces endothelial nitric oxide synthase genes expression throughout hepatic ischemia/ reperfusion in rats. Afr J Biotechnol 2012; 11(58): 12222-12228.
38. Di Napoli P, Taccardi AA, Grilli A, De Lutiis MA, Barsotti A, Felaco M, et al. Chronic treatment with rosuvastatin modulates nitric oxide synthase expression and reduces ischemia–reperfusion injury in rat hearts. Cardiovasc Res 2005; 66(3): 462-471.
39. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. N Engl J Med 2005; 352(16): 1685-1695.
40. Ghanaat K, Malekzadeh-Shafaroudi M, Khonakdar-Tarsi A. Effect of dexamethasone on the endothelin-1 (ET-1) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) genes expression during hepatic warm ischemia/reperfusion in rat. Res Mol Med 2016; 4(4): 8-14 (Persian).
41. Hung LM, Su MJ, Chen JK. Resveratrol protects myocardial ischemia–reperfusion injury through both NO-dependent and NO-independent mechanisms. Free Radic Biol Med 2004; 36(6): 774-781.
42. Lee C-K, Choi J-S. Effects of silibinin, inhibitor of CYP3A4 and P-glycoprotein in vitro, on the pharmacokinetics of paclitaxel after oral and intravenous administration in rats. Pharmacology 2010; 85(6): 350-356.
43. Nie FQ, Sun M, Yang JS, Xie M, Xu TP, Xia R, et al. Long noncoding RNA ANRIL promotes non–small cell lung cancer cell proliferation and inhibits apoptosis by silencing KLF2 and P21 expression. Mol Cancer Ther 2015; 14(1): 268-277.
44. Park S-W, Choi S-M, Lee S-M. Effect of melatonin on altered expression of vasoregulatory genes during hepatic ischemia/reperfusion. Arch Pharm Res 2007; 30(12): 1619-1624.
45. Ghobadi M, Ghanaat K, Valizadeh-Dizgikan A, Gohari G, Roadi B, Khonakdar-Tarsi A. The Effect of Dexamethasone on Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase Gene During Liver Warm Ischemia-reperfusion in Rat. Res Mol Med 2015; 3(3): 17-22 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]