

Effects of Silymarin on Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children: A Crossover Clinical Trial

Abolfazl Iranikhah¹,
Javad Shapouri²,
Akram Heidari³,
Mohammad Aghaali⁴,
Hanieh Hajian⁵

¹ Assistant Professor, Department of Pediatrics, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran

² Assistant Professor, Department of Pediatrics, Clinical Research Development Center, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran

³ Associate Professor, Department of Community Medicine, Spiritual Health Research Center, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran

⁴ PhD Student in Epidemiology, Student Research Committee, School of Public Health, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁵ Resident in Pediatric, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran

(Received June 1, 2016 ; Accepted October 4, 2016)

Abstract

Background and purpose: Nonalcoholic fatty liver disease is one of the most common causes of chronic liver disease and is a major public health problem worldwide. In recent years, the prevalence of nonalcoholic fatty liver disease has increased in children and adolescents. This study aimed to investigate the effect of silymarin on children with nonalcoholic fatty liver disease.

Materials and methods: In this randomized crossover clinical trial, 40 children with nonalcoholic fatty liver disease were divided into two period treatment groups. Patients in group A received 140 mg silymarin capsules, three times a day in the first three months, and after one-month washout period they received placebo for three months. Group B received placebo at first and then silymarin. Liver enzymes, LDL, HDL and triglyceride levels were measured at baseline and after the first and second stages. At the end of three months, the patients underwent ultrasonography.

Results: The study included 36 boys and 4 girls. After treatment with silymarin no significant changes were seen in weight, AST, ALT, HDL, LDL and TG levels of patients compared with those of the control group ($P>0.05$). However, fatty liver grade decreased significantly after treatment with silymarin ($P=0.02$).

Conclusion: As previous studies on adults, our results showed beneficial effects of silymarin on reducing fatty liver grade in children with nonalcoholic fatty liver disease. Larger studies with longer treatment periods are recommended in order to achieve comprehensive results.

(Clinical Trials Registry Number: IRCT2015012520781N1)

Keywords: non-alcoholic fatty liver, silymarin, child, cross-over studies, clinical trial

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(144): 119-126 (Persian).

بررسی اثر سیلی مارین بر کبد چرب غیر الکلی کودکان: کار آزمایی بالینی متقاطع

ابوالفضل ایرانی خواه^۱جواد شاپوری^۲اکرم حیدری^۳محمد آقاعلی^۴هانیه حاجیان^۵

چکیده

سابقه و هدف: بیماری کبد چرب غیرالکلی یکی از شایع ترین علل بیماری های مزمن کبدی بوده و یک مشکل عمده بهداشت عمومی در سراسر جهان است. در سال های اخیر شیوع کبد چرب غیرالکلی در کودکان و نوجوانان افزایش یافته است. مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر سیلی مارین بر کبد چرب غیرالکلی در کودکان انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه کار آزمایی بالینی متقاطع تصادفی شده، ۴۰ کودک مبتلا به کبد چرب غیرالکلی به دو دوره درمانی تقسیم شدند. بیماران در دوره درمانی A سه ماه اول، کپسول سیلی مارین را با دوز 140 mg سه بار در روز دریافت کردند و پس از یک ماه دوره پاکسازی، سه ماه پلاسبو دریافت کرد. بیماران در دوره درمانی B، ابتدا پلاسبو و بعد سیلی مارین دریافت نمودند. آنزیم های کبدی، HDL، LDL و تری گلیسرید بیماران در ابتدای مطالعه و بعد از مرحله اول و دوم اندازه گیری شدند. در پایان ۳ ماه، بیماران مجدداً تحت سونوگرافی قرار گرفتند.

یافته ها: در مجموع ۳۶ پسر و ۴ دختر وارد مطالعه شدند. پس از مصرف سیلی مارین تغییر آماری معنی داری در میانگین AST و ALT، HDL، LDL و TG و وزن بیماران در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد ($p > 0.05$). اما با مصرف سیلی مارین، درجه کبد چرب به طور معنی داری کاهش نشان داد ($p = 0.02$).

استنتاج: نتایج این مطالعه مانند مطالعات پیشین بر روی بالغین توانست اثرات سودمندی از مصرف سیلی مارین در کاهش درجه کبد چرب را در کودکان مبتلا به کبد چرب غیرالکلی نشان دهد. مطالعات گسترده تر و با طول مدت درمان بیش تر جهت حصول نتایج جامع و کامل توصیه می شود.

شماره ثبت کار آزمایی بالینی: IRCT2015012520781N1

واژه های کلیدی: کبد چرب غیرالکلی، سیلی مارین، کودکان، مطالعه متقاطع، کار آزمایی بالینی

مقدمه

کبد چرب یکی از اختلالات مزمن کبدی است که با تجمع لیپید در هپاتوسیت ها همراه می باشد. این اختلال از یک شکل استئاتوز ساده تا استئاتوهپاتیت غیرالکلی و

در نهایت فیروز پیشرفته و سیروز متغیر است (۱). کبد چرب غیرالکلی به صورت تجمع چربی کبدی در بیش از ۵ درصد هپاتوسیت ها در غیاب مصرف بیش از حد

E-mail: haniyeh.hajian@gmail.com

مؤلف مسئول: هانیه حاجیان - قم، بلوار شهید بهشتی، بیمارستان شهید بهشتی، واحد توسعه تحقیقات بالینی

۱. استادیار، گروه اطفال، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران

۲. استادیار، گروه اطفال، واحد توسعه تحقیقات بالینی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران

۳. دانشیار، گروه پزشکی اجتماعی، مرکز تحقیقات سلامت معنوی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران

۴. دانشجوی PhD اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۵. رزیدنت کودکان، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۱۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۲/۱۴ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۷/۱۳

الکل و یا شواهد بیماری کبدی ویروسی، خود ایمنی یا ناشی از دارو تعریف می شود (۲). در حال حاضر کبد چرب غیرالکلی به عنوان یکی از علل اصلی بیماری های مزمن کبدی در کودکان مطرح بوده و شیوع آن در کودکان چاق در مطالعات مختلف از ۴۲/۶ درصد تا ۷۷/۱ درصد گزارش شده است. انتظار می رود که در آینده نزدیک، این بیماری به عنوان شایع ترین علت بیماری مزمن کبدی در کودکان باشد (۴،۳). اگرچه علت بیماری ناشناخته است، اما همراهی با سندرم متابولیک شامل چاقی، دیابت، مقاومت به انسولین و هایپرلیپیدمی مشاهده شده است (۵). در واقع چاقی شایع ترین علت تجمع چربی در کبد است و با افزایش چاقی، شیوع، میزان تشخیص و شدت کبدچرب غیرالکلی و استئاتوهپاتیت الکلی در کودکان و بزرگسالان افزایش یافته است (۶).

درمان قطعی ثابت شده برای کبدچرب غیرالکلی وجود ندارد. اگرچه اصلاح ریسک فاکتورها مثل چاقی، دیابت و هایپرلیپیدمی اغلب توصیه می شود، کاهش وزن تنها درمان مفید و سودمند است. یافتن داروهایی که باعث درمان کبدچرب غیرالکلی و استئاتوهپاتیت غیرالکلی می شوند، در دست تحقیق است (۷). عصاره بذر گیاه خارمریم که به آن سیلی مارین (Silymarin) گفته می شود، ترکیبی از فلاونوئیدهاست و چهار ماده شاخص موجود در آن شامل سیلی بین (Silybin)، ایزوسیلی بین (Isosilybin)، سیلی کریستین (Silycristin) و سیلی دیانین (Silydianin) هستند (۹،۸). سیلی مارین اثر حفاظتی بر سلول های کبدی داشته و مطالعات قبلی بر روی این گیاه اثر آن را بر کاهش کلسترول پلاسما و محتوای کلسترول کبد نشان داده است (۱۰). هم چنین اثرات درمانی بر کبد چرب، سیروز کبدی، ضد دیابت و چربی خون، ضد آب مروارید، ضد پوکی استخوان و ضد سرطان دارد (۱۱-۱۵). علاوه بر این، سیلی مارین دارای خاصیت آنتی اکسیدانی قابل توجه بوده و سبب کاهش رادیکال های آزاد، مهار

پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش فعالیت سوپراکسید دیس موتاز در اریتروسیت ها و کاهش سطح مالون دی آلدئید در بافت کبد و ALT می شود. به علاوه دارای اثرات ضدالتهابی بوده و سبب مقاومت در برابر ذخیره گلوکاتینون شده و به هنگام آسیب پارانشیم کبد، سنتز پروتئین توسط هپاتوسیت ها را افزایش می دهد. در نتیجه باعث افزایش بازسازی بافت کبد می شود. ضمناً موجب کند شدن و برگشت فیروز کبد می شود (۱۹-۱۶).

Socha و همکارانش، ۱۵ کارآزمایی بالینی (۲) کارآزمایی کودکان) در زمینه درمان کبد چرب غیر الکلی را بررسی کردند، اما این مرور سیستماتیک به دلیل محدودیت مطالعات در این زمینه نتوانست نتیجه بخش باشد (۲۰).

کبدچرب احتمال ابتلای کودک به بیماری های قلبی و سیروز کبدی را افزایش می دهد (۴). از آن جاکه تاکنون مطالعه ای به بررسی تأثیر سیلی مارین در درمان کبدچرب غیرالکلی کودکان نپرداخته و با توجه به شیوع و عوارض بالای آن در کودکان و عدم وجود اطلاعات کافی در رابطه با درمان های قطعی این بیماری، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر سیلی مارین بر کبدچرب غیرالکلی کودکان انجام شد.

مواد و روش ها

در این کارآزمایی بالینی دوسوکور متقاطع، ۴۰ کودک ۵ تا ۱۴ ساله مبتلا به کبدچرب غیرالکلی (براساس سونوگرافی کبد) به صورت تصادفی و به روش بلوک های متغیر در دو دوره درمانی (A و B) قرار گرفتند. حجم نمونه بر اساس مطالعات قبلی و با استفاده از مطالعه Siyasinghe محاسبه گردید (۲۱). کودکان دارای اضافه وزن، چاق و یا مبتلا به هایپرلیپیدمی و یا کودکان به ظاهر سالم که معیارهای لازم برای تشخیص کبدچرب غیرالکلی را داشته و به درمانگاه و یا به متخصص غدد و یا گوارش مراجعه می کردند، مورد مطالعه قرار گرفتند. بیماران در صورت مصرف اتانول،

مصرف داروهای هپاتوتوکسیک، ابتلا به هپاتیت B، C و اتوایمیون، بیماری ویلسون، هموکروماتوز، آلفا ۱ آنتی تریپسین، بیماری شدید زمینه‌ای مانند بیماری قلبی و ریوی، سیروز کبد، عدم تمایل بیمار به ادامه درمان و بروز عوارض دارویی از مطالعه خارج شدند. جهت بررسی و تشخیص کبدچرب غیرالکلی و رد سایر علل کبدچرب سونوگرافی انجام شد. پس از توضیح روش کار به والدین بیماران و اخذ رضایت نامه کتبی، قد و وزن تمام بیماران اندازه‌گیری و BMI آنان محاسبه شد. مقدار ۳ cc خون پس از ناشتایی ۱۲ ساعته جهت اندازه‌گیری لیپید (LDL، HDL، TG) و آنزیم‌های کبدی (ALT و AST) اخذ شد. کلیه آزمایشات در آزمایشگاه بیمارستان حضرت معصومه (س) قم انجام شد. در سه ماه اول مطالعه، بیماران در دوره درمانی A، کپسول سیلی مارین (ساخت شرکت سبزدارو، ایران) را با دوز ۱۴۰ mg سه بار در روز و در دوره درمانی B، کپسول پلاسبو حاوی نشاسته، سه بار در روز با شکل و بسته بندی کاملاً مشابه دریافت کردند. دو گروه ماهانه از نظر عوارض دارویی و همکاری از نظر مصرف دارو پیگیری شدند. در پایان فاز اول درمان، مجدداً آزمایشات اولیه و سونوگرافی تکرار شدند. پس از سه ماه، با دوره washout یک ماهه، در فاز دوم مطالعه دو گروه جابجا شده و به مدت سه ماه بیماران در دوره درمانی B، تحت درمان با ۱۴۰ mg سه بار در روز سیلی مارین و در دوره درمانی A، پلاسبو دریافت کردند. بلافاصله بعد از پایان فاز دوم درمان نیز بیماران از نظر وزن، BMI، لیپیدها و آنزیم‌های کبدی (توسط همان آزمایشگاه اولیه)، سونوگرافی کبد (توسط همان سونوگرافیست و بدون اطلاع از گروه‌های درمانی) و ارزیابی پاسخ به درمان بررسی مجدد شدند و نتایج توسط چک لیست جمع‌آوری شد. نمونه‌گیری به صورت تصادفی به روش بلوک‌های متغیر از کودکان ۵ تا ۱۴ ساله مبتلا به کبدچرب غیرالکلی مراجعه‌کننده به مرکز آموزشی درمانی حضرت معصومه (س) قم بود. اطلاعات توسط

چک لیست جمع‌آوری شد و نتایج حاصل از سونوگرافی و آزمایشگاه، قبل و بعد از مداخله، در هر دو گروه ثبت شد. داده‌های به دست آمده از طریق نرم‌افزار NCSS نسخه ۱۰ و با استفاده از آزمون t-test برای مقایسه متغیرهای اولیه بین دو دوره درمانی و آزمون Cross-Over Analysis Using T-Tests جهت بررسی اثر درمان با سیلیمارین، اثر دوره (period effect) و اثر انتقال (Carryover effect) در بیماران مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و $p < 0.05$ معنی‌دار تلقی گردید. طرح فوق در مرکز ثبت کارآزمایی بالینی ایران به شماره IRCT2015012520781N1 ثبت شد.

یافته‌ها

در مطالعه حاضر در مجموع ۳۶ پسر (۹۰/۰ درصد) و ۴ دختر (۱۰/۰ درصد) وارد مطالعه شدند. توزیع پارامترهای اندازه‌گیری شده افراد در دو دوره درمانی از لحاظ آماری تفاوت معناداری نداشت (جدول شماره ۱). میانگین سن افراد شرکت‌کننده $11/73 \pm 1/96$ سال بود. میانگین BMI بیماران در دوره درمانی A برابر $30/16 \pm 4/09$ و در دوره درمانی B برابر $30/59 \pm 2/88$ کیلوگرم بر مترمربع بود و بین دو گروه تفاوت معنی‌دار آماری یافت نشد ($p = 0/932$). توزیع فراوانی درجه کبدچرب پیش از شروع طرح در دو گروه اختلاف معنادار آماری نداشت ($p = 0/158$). بر اساس آنالیز آماری انجام شده در مورد هیچ یک از متغیرهای اندازه‌گیری شده، اثر انتقال و اثر دوره وجود نداشت. اثر درمان با سیلیمارین نیز در مورد پارامترهای AST، ALT، تری‌گلیسیرید، LDL، HDL و وزن معنی‌دار نبود (جدول شماره ۲). نتایج نشان داد درمان با سیلیمارین توانسته است درجه کبد چرب اندازه‌گیری شده با سونوگرافی را به طور معنی‌داری کاهش دهد ($p = 0/02$). آزمون ویل کاکسون نیز نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در کاهش درجه کبد چرب در دو گروه بود ($p = 0/035$).

جدول شماره ۱: مقایسه میانگین پارامترها در ابتدای مطالعه در گروه ها

پارامترها	دوره درمانی	تعداد	میانگین	انحراف معیار	سطح معنی داری	power
وزن (کیلوگرم)	A	۲۰	۷۱/۰۷	۱۵/۹۷	۰/۳۵۰	۰/۴
	B	۲۰	۷۵/۲۷	۱۱/۸۱		
AST	A	۲۰	۳۰/۶۵	۱۲/۰۷	۰/۸۳۱	۰/۱۳
	B	۲۰	۲۹/۵۰	۸/۶۶		
ALT	A	۲۰	۳۰/۴۵	۲۳/۱۴	۰/۲۴۹	۰/۵
	B	۲۰	۲۳/۴۰	۱۳/۷۶		
تری گلیسرید	A	۲۰	۱۴۰/۶۵	۷۶/۵۷	۰/۰۹۳	۰/۷۷
	B	۲۰	۱۰۸/۱۰	۳۵/۴۶		
HDL	A	۲۰	۳۵/۵۵	۱۰/۳۱	۰/۰۷۳	۰/۸۱
	B	۲۰	۴۰/۸۵	۷/۶۶		
LDL	A	۲۰	۱۰۰	۲۶/۷۲	۰/۳۱۱	۰/۴۵
	B	۲۰	۱۰۷/۷۵	۲۰/۶۲		
درجه کبدچرب	A	۲۰	۱/۶	۰/۶۸	۰/۰۶۲	۰/۸۵
	B	۲۰	۱/۲۵	۰/۴۴		

جدول شماره ۲: تاثیر درمان با سیلیمارین بر پارامترهای اندازه گیری شده

پارامتر	اثر	خطای	آماره T	سطح	فاصله
	پراورد شده	استاندارد	(درجه آزادی ۳۸)	معنی داری	اطمینان ٪۹۵
وزن	-۰/۸۳	۰/۳۹	-۱/۸۵	۰/۰۷۲	(-۱/۵۲) - (۰/۰۷)
AST	-۲/۴۰	۱/۹۴	-۱/۲۴	۰/۲۲۳	(-۶/۳۳) - (۱/۵۳)
ALT	-۰/۶۳	۲/۴۸	-۰/۲۵	۰/۸۰۲	(-۵/۶۵) - (۴/۴۰)
تری گلیسرید	-۲۰/۸۸	۱۱/۴۶	-۱/۸۲	۰/۰۷۶	(-۴۴/۰۸) - (۲/۳۳)
HDL	-۲/۲۸	۱/۷۷	-۱/۲۸	۰/۲۰۶	(-۵/۸۶) - (۱/۳۱)
LDL	۰/۲۸	۴/۰۱	۰/۰۷	۰/۹۴۵	(-۷/۸۴) - (۸/۳۹)
درجه کبدچرب	۰/۳۰	۰/۱۲	۲/۴۱	۰/۰۲۰	(۰/۰۵) - (۰/۵۵)

بحث

کبدچرب غیرالکلی شایع ترین بیماری خاموش کبدی است که شیوع آن در کشورهای غربی ۲۰-۳۰ درصد و در ایران ۳۰ درصد تخمین زده می شود (۲۳،۲۲). مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر سیلی مارین بر کبدچرب غیرالکلی کودکان انجام شد. در این مطالعه بین میانگین وزن قبل و بعد از درمان در دو گروه اختلاف معناداری یافت نشد. هم سو با مطالعه ما، در مطالعه تقوایی و همکاران، حاجی آقامحمدی و همکاران و Cacciapuoti و همکاران نیز اختلاف آماری معنی داری بین میانگین وزن و BMI قبل و بعد از درمان در دو گروه بیماران وجود نداشته است (۲۴-۲۶). در مطالعه حاضر با مصرف سیلیمارین، درجه کبدچرب به صورت معنی داری کاهش پیدا کرد. در در مطالعه تقوایی و همکاران، بالغین تحت درمان با سیلی مارین کاهش معنی داری را در شدت استئاتوز کبدی بر اساس نتایج سونوگرافی (به

صورت کاهش درجه سونوگرافی کبد) بعد از ارزیابی ۶ ماهه نشان دادند (۲۵). هم چنین مطالعات دیگر، اثربخشی سیلی مارین را در درمان کبدچرب غیرالکلی نشان داده اند (۲۷-۲۹).

مطالعه Loguericio و همکاران که در آن بیماران با یک رژیم غذایی کاملاً محدود تحت درمان با سیلی مارین، ویتامین E و فسفولیپید قرار گرفتند نیز تغییر در درجه کبدچرب را نشان داد (۲۹). در مطالعه Zhang و همکاران، سیلی مارین با بهبود آسیب بافتی و کاهش درجه استئاتوز کبدی، به طور مؤثری سبب محافظت کبد شد (۳۰). در اکثر مطالعات انجام شده، اثرات سودمند سیلیمارین در کاهش درجه کبدچرب در بالغین و با نیز اثر سیلیمارین بر کاهش درجه کبد چرب در درمان سه ماهه و بر روی کودکان مشاهده شد.

در مطالعه حاضر، میانگین AST و ALT در دو گروه اختلاف معنی دار آماری نشان نداد. هم سو با ما، در مطالعه Gordon و همکاران، تغییرات سطح ALT سرم بین افراد دریافت کننده سیلی مارین در مقایسه با پلاسبو تفاوت معنی داری نداشت (۳۱). اما در اکثر مطالعات، کاهش معنی دار AST و ALT در گروه دریافت کننده سیلی مارین مشاهده شد (۱۷، ۲۵، ۲۶، ۲۸، ۳۲، ۳۳). ذکر این نکته حائز اهمیت است که در تمامی مطالعاتی که در آن ها کاهش آنزیم های کبدی مشاهده شد، بیماران مورد مطالعه با ویژگی های NASH، یعنی با میزان AST و ALT بیش تر از حد نرمال، وارد مطالعه شده اند، در حالی که مطالعه ما بر روی بیماران NAFLD با یافته های کبد چرب در سونوگرافی انجام شد و همه بیماران آنزیم های کبدی بیش تر از حد نرمال نداشتند. البته در مطالعه ما نیز در تعدادی از بیماران که AST و ALT افزایش یافته داشتند، شاهد کاهش AST و ALT بودیم. این مطالعه توانست اثر سیلیمارین را در کاهش LDL و HDL نشان دهد. در مطالعه رمضانی و همکاران، کلسترول توتال و LDL کاهش معنادار آماری نشان دادند (۳۴). بر خلاف این

آن نادر و بی خطر بوده، قیمت آن مناسب است و مشتقات دیگر آن هم در دست تولید می باشد (۳۷) و نیز با توجه به اثرات آنتی اکسیدانی آن، به نظر می رسد این گیاه توانایی اثر بر استئاتوز کبدی را خواهد داشت؛ لذا استفاده از آن در بیماران مبتلا به کبد چرب توصیه می شود. پیشنهاد می شود مطالعاتی با حجم نمونه بالاتر و طول مدت بیش تر جهت حصول نتایج جامع و کامل انجام شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله جا دارد از والدین کلیه بیمارانی که در این تحقیق با ما همکاری داشتند، تقدیر و تشکر به عمل آید.

مطالعه T در مطالعه محمدی و همکارانش نیز مانند مطالعه حاضر، کاهش در پروفایل چربی دیده نشد (۳۲). در کلیه مطالعاتی که تاکنون انجام شده، تأثیر سیلیمارین بر روی افراد بالغ بررسی شد و ما در صدد بودیم که تأثیر آن را بر کودکان بسنجیم. علت تفاوت نتایج مطالعه ما با سایر مطالعات می تواند ویژگی های متمایزی باشد که در هیستوپاتولوژی کبد چرب در کودکان در مقایسه با بزرگسالان وجود دارد (۳۵). طبق نتایج مطالعه Takahashi و همکاران، استئاتوز در کودکان نسبت به بالغین شدیدتر است (۳۶). از آن جا که سیلیمارین ایمنی مطلوبی دارد، قابلیت تحمل آن بالاست، عوارض

References

- Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346(16): 1221-1231.
- Nanda K. Non-alcoholic steatohepatitis in children. *Pediatr Transplant* 2004; 8(6): 613-618.
- Papandreou D, Karabouta Z, Pantoleon A, Rousso I. Investigation of anthropometric, biochemical and dietary parameters of obese children with and without non-alcoholic fatty liver disease. *Appetite* 2012; 59(3): 939-944.
- Shiasi Arani K, Haghsheenas M, Talari HR, Akbari H, Hami K, Taghavi Ardekani A, et al. Prevalence of Fatty Liver Disease in Obese Children and Adolescents Who Referred to Pediatric Clinic of Kashan University of Medical Sciences, Iran (2012-2013). *JBUMS* 2013; 15(5): 77-83.
- Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990; 11(1): 74-80.
- Esposito E, Iacono A, Bianco G, Autore G, Cuzzocrea S, Vajro P, et al. Probiotics reduce the inflammatory response induced by a high-fat diet in the liver of young rats. *J Nutr* 2009; 139(5): 905-911.
- Papandreou D, Rousso I, Mavromichalis I. Update on non-alcoholic fatty liver disease in children. *Clin Nutr* 2007; 26(4): 409-415.
- Hasanloo T, Khavari Nejad R, Majidi EH. Evaluation of Phenotypic Coefficient and Flavonolignan Content in Dried Fruits of Cultivated and Endemic *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *JMP* 2007; 2 (22): 77-90.
- Abenavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytother Res* 2010; 24(10): 1423-1432.
- Ghosh N, Ghosh R, Mandal V, Mandal SC. Recent advances in herbal medicine for treatment of liver diseases. *Pharm Biol* 2011; 49(9): 970-988.
- Lirussi F, Beccarello A, Zanette G, De Monte A, Donadon V, Velussi M, et al. Silybin-beta-cyclodextrin in the treatment of patients with diabetes mellitus and alcoholic liver disease. Efficacy study of a new preparation of an antioxidant agent. *Diabetes Nutr Metab* 2002; 15(4): 222-231.

12. Agrawal S, Bonkovsky HL. Management of nonalcoholic steatohepatitis: an analytic review. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35(3): 253-261.
13. Cooray HC, Janvilisri T, van Veen HW, Hladky SB, Barrand MA. Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun* .2004; 317(1): 269-275.
14. Gallo D, Giacomelli S, Ferlini C, Raspaglio G, Apollonio P, Prislei S, et al. Antitumour activity of the silybin-phosphatidylcholine complex, IdB 1016, against human ovarian cancer. *Eur J Cancer* 2003; 39(16): 2403-2410.
15. Thelen P, Wuttke W, Jarry H, Grzmil M, Ringert RH. Inhibition of telomerase activity and secretion of prostate specific antigen by silibinin in prostate cancer cells. *J Urol* 2004; 171(5): 1934-1938.
16. 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): 205-212.
17. Roghani M, Baluchnejadmojarad T, Roghani Dehkordi F. The effect of chronic silymarin on serum level of some enzyme markers and tissue level of malondialdehyde in diabetic rats. *J Birjand Univ Med Sci* 2012; 19(1): 12-21.
18. Toklu HZ, Tunali-Akbay T, Erkanli G, Yüksel M, Ercan F, Sener G. Silymarin, the antioxidant component of *Silybum marianum*, protects against burn-induced oxidative skin injury. *Burns* 2007; 33(7): 908-916.
19. Abascal K, Yamell E. The many faces of *silybum marirnum* (Milk Thistle): Part 1- Treating Cancer and Hyperlipidemia and Restoring Kidney Function. *Alternat Complement Ther* 2003; 9(4): 170-175.
20. Socha P, Horvath A, Vajro P, Dziechciarz P, Dhawan A, Szajewska H. Pharmacological interventions for nonalcoholic fatty liver disease in adults and in children: a systematic review. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 48(5): 587-596.
21. Siyasinghe NM, Sooriyarachchi MR. Guidelines for calculating sample size in 2x2 crossover trials: a simulation study. *J Natn Sci Foundation Sri Lanka* 2011; 39(1): 77-89.
22. Williams R. Global challenges in liver disease. *Hepatology* 2006; 44: 521-526.
23. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2005; 42(1): 44-52.
24. Hajiaghamohammadi AA, Ziaee A, Oveisi S, Masroor H. Effects of metformin, pioglitazone, and silymarin treatment on non-alcoholic Fatty liver disease: a randomized controlled pilot study. *Hepat Mon* 2012; 12(8): e6099.
25. Taghvaei T, Bahar A, Hosseini V, Maleki I, Kasrai M. Efficacy of Silymarin on Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2013; 23(98): 164-171 (Persian).
26. Cacciapuoti F, Scognamiglio A, Palumbo R, Forte R, Cacciapuoti F. Silymarin in non alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 2013; 5(3): 109-113.
27. Baloochnejad Mojarrad TD, Roghami M, Homayoonfar H, Khastkhodae Z. Protective effect of long-term prescription of silymarin on blood glucose and lipids level and oxidative stress in diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants* 2009; 10: 143-149.
28. Mohammadian AA, Ziaee A, Rafiei R. The Efficacy of Silymarin in Decreasing Transaminase Activities in Non-Alcoholic

- Fatty Liver Disease: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Hepatitis Monthly* 2008; 8(3): 191-195.
29. Loguercio C, Federico A, Trappoliere M, Tuccillo C, de Sio I, Di Leva A, et al. The effect of a silybin-vitamin e-phospholipid complex on nonalcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Dig Dis Sci* 2007; 52(9): 2387-2395.
 30. Zhang W, Hong R, Tian T. Silymarin's Protective Effects and Possible Mechanisms on Alcoholic Fatty Liver for Rats. *Biomol Ther (Seoul)* 2013; 21(4): 264-269.
 31. Gordon A, Hobbs DA, Bowden DS, Bailey MJ, Mitchell J, Francis AJ, et al. Effects of Silybum marianum on serum hepatitis C virus RNA, alanine aminotransferase levels and well-being in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21(1 Pt 2): 275-280.
 32. Mohammadi S, Fallah huseini H, Afkhami Ardacani M, Salami M, Bolurani S. Effects of Silymarin on Insulin Resistance and Blood Lipid Profile in First-degree Relatives of Type 2 Diabetic Patients. *JMP* 2013; 2(46): 170-176.
 33. Solhi H, Ghahremani R, Kazemifar AM, Hoseini Yazdi Z. Silymarin in treatment of non-alcoholic steatohepatitis: A randomized clinical trial. *Caspian J Intern Med* 2014; 5(1): 9-12.
 34. Ramezani M, Azarabadi M, Fallah Huseini H, Abdi H, Baher G, Huseini M. The effects of Silybum marianum (L.) Gaertn seed extract on glycemic control in type II diabetic patient's candidate for insulin. *Journal of Medicinal Plants* 2008; 26(7): 79-84.
 35. Kelishadi R, Cook SR, Adibi A, Faghihimani Z, Ghatrehsamani S, Beihaghi A, et al. Association of the components of the metabolic syndrome with non-alcoholic fatty liver disease among normal-weight, overweight and obese children and adolescents. *Diabetol Metab Syndr* 2009; 1: 29.
 36. Takahashi Y, Inui A, Fujisawa T, Takikawa H, Fukusato T. Histopathological characteristics of non-alcoholic fatty liver disease in children: Comparison with adult cases. *Hepatol Res* 2011; 41(11): 1066-1074.
 37. Saller R, Meier R, Brignoli R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs* 2001; 61(14): 2035-2063.