

اثر سیلیمارین بر فیروز ریوی ناشی از بلئومایسین در موش

لیلا صفائیان*، عباس جعفریان دهکردی*، نوشین افشار مقدم**، شادی سرهرودی***

* فارماکولوژیست، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

** استاد فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

*** دانشیار پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

**** استادیار فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سیلیمارین از مواد مؤثره گیاه خار مریم (Silybum Marianum L) می باشد که در فیروز کبدی از طریق مکانیسم های مختلفی نقش آنتی فیرووتیک را ایفا می کند. با توجه به شباهت در پاتوژن بیماری های فیروپرولیفراتیو، در این مطالعه اثر سیلیمارین بر فیروز ریوی ناشی از بلئومایسین مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی فیروز ریه در موش با تزریق منفرد داخل تراشه ای بلئومایسین (۳/۵ واحد به ازای کیلوگرم) ایجاد گردید. سیلیمارین با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم (داخل صفاقی)، ۲ روز قبل از تجویز بلئومایسین تزریق شد و به صورت روزانه تا ۲ هفته ادامه یافت. در پایان دوره آزمایش ریه ها از نظر بافت شناسی و میزان هیدروکسی پرولین ارزیابی شدند. نتایج با استفاده از آزمون ANOVA یک طرفه و آزمون تکمیلی دانت مورد ارزیابی قرار گرفتند و مقادیر $P < 0.05$ معنی دار تلقی گردید.

یافته ها: تزریق داخل تراشه ای بلئومایسین موجب افزایش میزان هیدروکسی پرولین ریه ($P = 0.003$) و نیز وزن ریه ($P < 0.001$) شد. سیلیمارین توانست به طور معنی داری از افزایش سطح هیدروکسی پرولین ریه جلوگیری نماید ($P < 0.05$). وزن ریه نیز در گروه سیلیمارین مشابه با ریه های سالم بود. در بررسی های بافت شناسی، سیلیمارین توانست تا حدودی از تغییرات پاتولوژیک ناشی از بلئومایسین جلوگیری کند.

نتیجه گیری: احتمالاً سیلیمارین از طریق جلوگیری از تجمع کلاژن و نیز پیشگیری از التهاب در جلوگیری از تغییرات پاتولوژیک بافتی در مدل فیروز ریوی ناشی از بلئومایسین در موش مؤثر می باشد.

کلید واژه ها: سیلیمارین؛ بلئومایسین؛ فیروز ریه؛ هیدروکسی پرولین.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی: lsafaeian@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۹۳۲۵۱۰۸۵

تاریخ پذیرش: ۸۸/۱/۲۵

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۱/۶

مقدمه

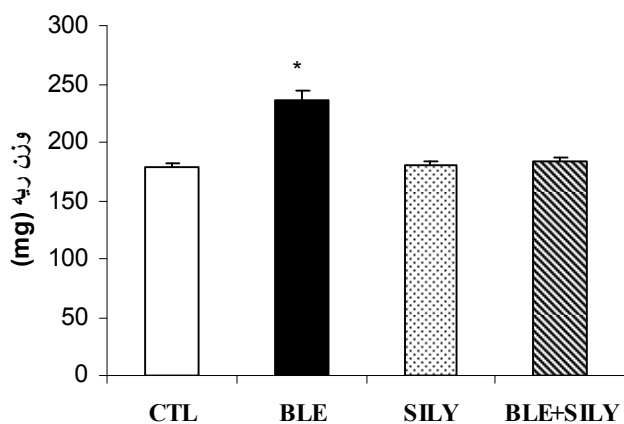
به طور گسترده ای همراه با سایر عوامل شیمی درمانی به کار رود. ولی متأسفانه به دلیل بروز عارضه فیروز ریوی، کاربرد این دارو از نظر بالینی بسیار محدود شده است (۱). از آن جا که فیروز ریوی ناشی از بلئومایسین به راحتی در گونه های مختلف پستانداران ایجاد می شود، از مدل های تجربی با استفاده از این دارو

بلئومایسین یک داروی شیمی درمانی است که در برابر طیف وسیعی از سرطان های انسانی مؤثر می باشد. این دارو حداقل اثر سمی را بر بافت های خونساز و سیستم ایمنی دارد و چون سمی بودن آن با دیگر داروهای ضد سرطان مشترک نیست، می تواند

روش بررسی

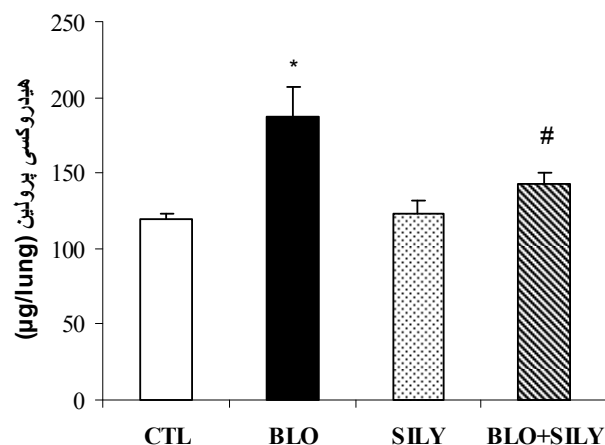
در این مطالعه تجربی از ۲۸ موش ماده نژاد NMRI (انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران) با وزن ۳۰-۲۵ گرم استفاده گردید. حیوانات در اتاق مخصوص با درجه حرارت 22 ± 3 سانتی گراد و در شرایط روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شده و دسترسی به آب و غذای کافی داشتند. به منظور ایجاد فیروز ریه در موش از تزریق منفرد داخل تراشه‌ای بلئومایسین (Nippon Kayaku, Japan) استفاده گردید. بدین منظور موش‌ها با تجویز داخل صفاقی ۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم کتامین (Rotexmedica, Germany) بیهوش شدند. جهت دسترسی به تراشه، برش جراحی در ناحیه قدامی گردن موش ایجاد شد و محلول تازه تهیه شده‌ی بلئومایسین با دوز ۳/۵ واحد به ازای کیلوگرم در ۵۰ میکرولیتر نرمال سالین مستقیماً به داخل تراشه تزریق گردید (۱۷). سیلیمارین خریداری شده از Sigma به صورت تازه در PBS (فسفات بافر سالین) سوسپانسیون شده و با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی، ۲ روز قبل از تجویز بلئومایسین تزریق گردید (۱۸). تجویز سیلیمارین به صورت روزانه تا پایان دوره آزمایش (۲ هفته بعد از تجویز بلئومایسین) ادامه یافت. موش‌ها به چهار گروه ۷ تایی تقسیم شدند: گروه کنترل فیروز که فقط بلئومایسین دریافت کردند. گروه کنترل سالم که فقط حامل PBS به صورت داخل صفاقی به آن‌ها داده شد. گروه موش‌های سالمی که ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم سیلیمارین دریافت نمودند. گروهی که علاوه بر بلئومایسین ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم سیلیمارین نیز به آن‌ها داده شد. پس از پایان دوره آزمایش (۲ هفته) حیوانات با دوز بالای کتامین (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بیهوش و ریه‌ها خارج شده و توزین گردیدند. وزن کل ریه به عنوان شاخص التهاب ریه مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۹). لوب راست جهت آزمایشات بیوشیمیایی کنار گذاشته شد و لوب دیگر جهت آزمایشات بافت‌شناسی به مدت ۲۴ ساعت در فرمالین ۱۰٪ نگهداری گردید. تمامی مواد مورد نیاز برای آزمایشات بیوشیمیایی و بافت‌شناسی از Sigma و Merck تهیه شدند. برای تخمین میزان تجمع کلاژن در بافت ریه که شاخصی از میزان فیروز می‌باشد، میزان هیدروکسی پرولین در نمونه هموزنه بافت ریه طبق روش Woessner اندازه‌گیری شد (۲۰). بدین منظور به نمونه هموزنه بافت ریه در

به منظور شناخت دقیق مکانیسم رخداد فیروز و راه‌های درمان آن استفاده می‌گردد (۲). مکانیسم‌های متعددی برای فیروز ریه پیشنهاد شده‌اند که از جمله می‌توان به موارد ذیل اشاره نمود: **الف)** ایجاد آپوپتوز در سلول‌های اپی‌تلیال آلئولی و برونشولی به عنوان یک واقعه آغازگر فرآیند فیروز (۳). **ب)** ایجاد التهاب و افزایش فعالیت آنزیم سیکلواکسیژناز، ارتشاح سلول‌های التهابی به فضای آلئولی و مشارکت نوتروفیل‌ها و ماکروفاژهای ریوی در آزادسازی آنزیم‌های پروتئولیتیک و واسطه‌های التهابی (۴). **ج)** دخالت کموکاین‌ها و سیتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند اینترلوکین‌ها (IL-1, IL-5, IL-8)، عامل نکروزدهنده تومور (TNF- α) و فاکتورهای رشد نظیر فاکتور رشد مبدل بتا (TGF- β) و عامل نسخه‌برداری NF- κ B که بیان ژن‌های این سیتوکاین‌ها را تنظیم می‌کنند (۵، ۶). **د)** نقش استرس اکسیداتیو و مشارکت گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی (۷). **ه)** تخلیه ATP، NAD و سیستم آنتی‌اکسیدان طبیعی نظیر گلوکاتینون (۸). **و)** وجود آهن در بافت ریه که کوفاکتور اصلی در آسیب اکسیداتیو بلئومایسین به DNA و RNA بوده و نیز کوفاکتور ضروری برای فعالیت آنزیم پرولیل هیدروکسیلاز می‌باشد، که در تشکیل کلاژن نقش دارد (۹، ۱۰). **ز)** افزایش تولید و تجمع ماتریکس خارج سلولی به ویژه کلاژن توسط فیبروبلاست‌ها و بیان بیش از حد مهارکننده‌های بافتی متالوپروتئینازها (TIMP) که از تجزیه کلاژن جلوگیری می‌کنند (۱۱). گیاه خار مریم (Silybum Marianum L) یکی از گیاهان دارویی است که حاوی فلاوئولگن‌های سیلیمارین (سیلیبین، سیلیکریستین، سیلیمونین و...)، فلاونوئیدها، استرول‌ها، ساپونین‌ها و غیره می‌باشد (۱۲). خواص فارماکولوژیک متعددی برای این گیاه به اثبات رسیده و مدارک متعددی مبنی بر نقش ضد فیروز سیلیمارین در فیروز کبدی وجود دارند (۱۳-۱۵). از آن‌جا که پاتوژنز بیماری‌های فیبروپروفراتیو مختلف شباهت زیادی با یکدیگر دارند (۱۶) و با توجه به این که تاکنون هیچ مطالعه‌ای در مورد اثر این ترکیب گیاهی بر روی فیروز ریوی صورت نگرفته است، لذا این تحقیق با هدف تعیین اثر سیلیمارین بر فیروز ریوی ناشی از بلئومایسین انجام شد.



نمودار شماره ۱: اثر سیلیمارین بر میزان هیدروکسی پرولین ریه در فیروز ریوی ناشی از بلئومایسین. ۲ هفته بعد از تجویز داخل تراشه‌ای بلئومایسین (۳/۵ واحد بر کیلوگرم) (BLE) با یا بدون سیلیمارین (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی) (BLE+SILY)، محتوای هیدروکسی پرولین ریه در موش‌ها اندازه‌گیری شد. گروه‌های کنترل حجم معادلی از سالین (CTL) یا سیلیمارین (SILY) دریافت کردند. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ و با استفاده از ANOVA یک طرفه تعیین شدند. $P=0/001$ * در مقایسه با سالین. $P<0/05$ # در مقایسه با بلئومایسین.

وزن ریه افزایش قابل توجهی در گروه بلئومایسین در مقایسه با گروه‌های کنترل سالم داشت ($P<0/001$)؛ درحالی‌که وزن ریه در گروه درمان شده با سیلیمارین مشابه با ریه‌های سالم بود (نمودار شماره ۲).

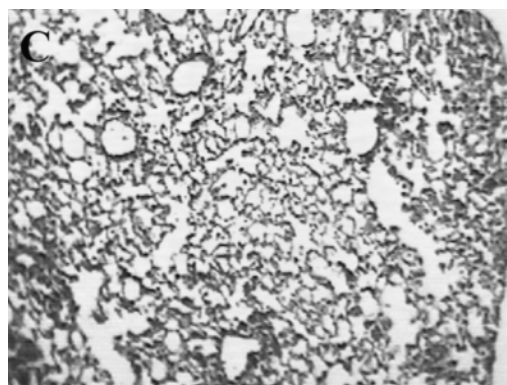


نمودار شماره ۲: اثر سیلیمارین بر وزن ریه در فیروز ریوی ناشی از بلئومایسین. ۲ هفته بعد از تجویز داخل تراشه‌ای بلئومایسین (۳/۵ واحد بر کیلوگرم) (BLE) با یا بدون سیلیمارین (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی) (BLE+SILY)، وزن ریه در موش‌ها اندازه‌گیری شد. گروه‌های کنترل حجم معادلی از سالین (CTL) یا سیلیمارین (SILY) دریافت کردند. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ و با استفاده از ANOVA یک طرفه تعیین شدند. $P<0/001$ * در مقایسه با گروه‌های کنترل

نرمال سالین، اسید کلریدریک ۶ نرمال اضافه گردید و نمونه‌ها در لوله‌های مقاوم به حرارت به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌های هیدرولیز شده با کمک ۲ قطره متیل رد و با استفاده از سود ۲/۵ نرمال خنثی شد ($\text{pH}=6$). سپس مرحله اکسیداسیون با افزودن ۱ میلی‌لیتر محلول کلرامین T (۱/۴۱ گرم کلرامین T در ۲۰ میلی‌لیتر آب، ۳۰ میلی‌لیتر ایزوپروپیل الکل و ۵۰ میلی‌لیتر بافر سیترات / استات) به ۲ میلی‌لیتر از نمونه آغاز گردید. پس از ۲۰ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر معرف ارلیخ (محلول ۲۰٪ پارادی متیل آمینوبنزالدئید در پرکلریک اسید و ایزوپروپیل الکل) اضافه شده و نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از آن میزان جذب توسط اسپکتروفتومتر در ۵۵۷ نانومتر محاسبه گردید. غلظت‌های ۱۰-۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از محلول هیدروکسی پرولین برای تهیه منحنی استاندارد استفاده شده و میزان هیدروکسی پرولین به صورت $\mu\text{g/lung}$ گزارش گردید. جهت مطالعات بافت‌شناسی نمونه‌های ثابت شده در فرمالین را پس از آب‌گیری و قالب‌گیری در پارافین در حد ۴ میکرومتر برش داده و از آن‌ها لام تهیه شد. لام‌ها پس از رنگ‌آمیزی همتاکسیلین-انوزین با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. مقادیر کمی به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ بیان و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS12 و آزمون ANOVA یک‌طرفه و آزمون تکمیلی Dunnett تجزیه و تحلیل شدند. مقادیر $P<0/05$ معنی‌دار تلقی گردید.

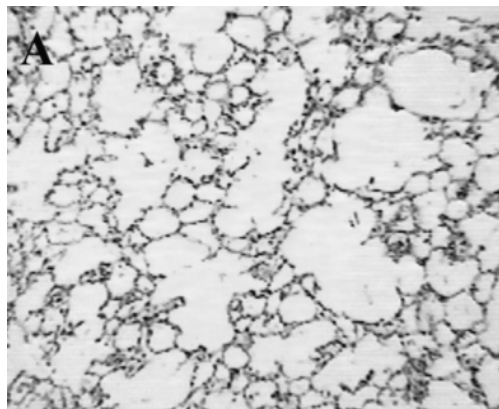
یافته‌ها

افزایش قابل توجه میزان هیدروکسی پرولین ریه در گروه کنترل فیروز نسبت به گروه کنترل سالم مشاهده شد ($P<0/03$). تفاوت معنی‌داری در میزان هیدروکسی پرولین گروه کنترل سالم در مقایسه با گروه سالمی که سیلیمارین دریافت کردند؛ وجود نداشت. اما سیلیمارین توانست به طور معنی‌داری از افزایش سطح هیدروکسی پرولین ریه در موش‌هایی که بلئومایسین دریافت کرده بودند؛ جلوگیری نماید ($P<0/05$) (نمودار شماره ۱).



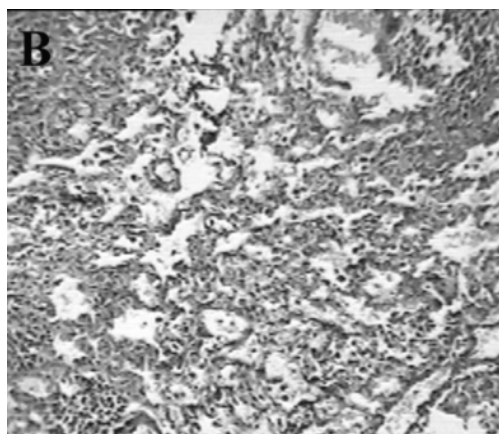
شکل شماره ۳: نمای بافت ریه موش رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین - انوزین، نمای ریه طبیعی مشاهده می شود (بزرگ نمایی $\times 100$).

در بررسی های بافت شناسی ریه های حاصل از گروه بلئومایسین، تغییرات فیروتیک به صورت ارتشاح سلول های التهابی در فضاهای آلوئولی، افزایش ضخامت دیواره آلوئولی و تجمع بافت همبند را نشان دادند (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱: نمای بافت ریه موش رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین، تغییرات فیروتیک ۲ هفته بعد از تجویز داخل تراشه ای بلئومایسین (۳/۵ واحد بر کیلوگرم) مشاهده می شود (بزرگ نمایی $\times 100$).

درمان با سیلیمارین توانست تا حدودی از تغییرات پاتولوژیک ناشی از بلئومایسین جلوگیری کند. در این گروه ارتشاح کمتر سلول های التهابی و کاهش تجمع بافت همبند وجود داشت (شکل شماره ۲)



شکل شماره ۲: نمای بافت ریه موش رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین، B: تغییرات فیروتیک ۲ هفته بعد از تجویز داخل تراشه ای بلئومایسین (۳/۵ واحد بر کیلوگرم)، مشاهده می شود (بزرگ نمایی $\times 100$).

نمای ریه طبیعی در (شکل شماره ۳) مشاهده می شود.

بحث

بیماری های مزمن کبد، پانکراس، روده، کلیه، پوست و ریه معمولاً با به جا گذاردن اثر زخم و از دست رفتن پیشرونده عملکرد اندام مذکور همراه بوده و نیازمند درمان های آنتی فیروتیک هستند (۱۶). در تحقیق حاضر بلئومایسین توانست تجمع کلاژن را به میزان ۵۷٪ افزایش دهد؛ در حالی که تجویز سیلیمارین توانست به میزان ۳۷٪ از این افزایش جلوگیری نماید و تجمع کلاژن در این گروه فقط به میزان ۲۰٪ افزایش یافت. در تحقیق Boigk و همکارانش تجویز سیلیمارین با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به میزان ۳۰ تا ۳۵٪ تجمع کلاژن را کاهش داده است (۲۹). Zhao و همکارانش نیز ۴۲/۶٪ کاهش در میزان هیدروکسی پرولین را در گروه سیلیمارین (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) در مقایسه با گروه مبتلا به فیروز کبدی گزارش کرده اند (۱۴). در مطالعات مذکور سیلیمارین به طور قابل توجهی فیروز کبدی را مهار کرده و برگشت داده است. نتایج حاصل از مطالعه کنونی نیز بیان گر اثرات ضد فیروز سیلیمارین در مدل حیوانی فیروز ریوی از طریق جلوگیری از تجمع کلاژن و جلوگیری از تغییرات پاتولوژیک بافتی می باشد. هم چنین سیلیمارین توانست از طریق پیشگیری از ادم از التهاب ریه جلوگیری نماید. نتایج تحقیقات بر روی سیلیمارین در بیماری های کبدی نشان می دهد که سیلیمارین و ماده فعال تشکیل دهنده آن سیلین اثرات فارماکولوژیک متعددی دارد که بسیاری از این اثرات قادرند با مکانیسم های ایجاد کننده فیروز مقابله نمایند. این اثرات عبارتند از: الف) سیلیمارین فعالیت ضد التهابی برجسته ای دارد و قادر است ادم و

سرباری آهن جلوگیری نمایند (۲۸). (و) در نهایت سیلیمارین بیان پروکلاژن آلفا-۱ و TIMP-1 را کاهش داده و تجمع کلاژن را در فیروز به تأخیر می‌اندازد (۲۹، ۱۸). در تحقیق فعلی به عنوان یک مطالعه اولیه، دوز رایج سیلیمارین که در تعدادی از مطالعات حیوانی مؤثر بود؛ مورد آزمایش قرار گرفت و جهت بررسی دقیق تر لازم است مطالعه دوز- پاسخ با کاربرد تعداد متنوعی از دوزها در فیروز ریوی انجام پذیرد. هم چنین مطالعات بیشتری برای یافتن مکانیسم عمل سیلیمارین در این بیماری مورد نیاز است. نتایج کامل تر امکان کاربرد سیلیمارین را در درمان بیماری مرگ بار فیروز ریه در انسان فراهم می‌سازد.

نتیجه گیری

احتمالاً سیلیمارین از طریق جلوگیری از تجمع کلاژن و نیز پیشگیری از التهاب در جلوگیری از تغییرات پاتولوژیک بافتی در مدل فیروز ریوی ناشی از بلئومایسین در موش مؤثر می‌باشد.

هیپرلازی را مهار نماید. مهار مهاجرت لکوسیت‌ها و ارتشاح نوتروفیل‌ها به موضع التهاب در مکانیسم عمل ضد التهابی آن نقش کلیدی دارد. به نظر می‌رسد سیلیمارین سبب تثبیت ساختارهای غشایی و مهار آزادسازی واسطه‌های التهابی می‌شود و هم چنین قادر است آنزیم‌های سیکلواکسیژناز و لیپواکسیژناز را مهار کند (۲۱). (ب) سیلیمارین بیان سیتوکاین‌های IL-۲ و IL-۴ و RNA پیام‌رسان فاکتور رشد TGF-β1 را کاهش می‌دهد (۲۲، ۱۸). هم چنین از فعال شدن NF-κB و کینازهای مرتبط با نسخه‌برداری ژنی و تکثیر سلولی در اثر TNF-α جلوگیری کرده و سمی بودن سلولی TNF-α را کم می‌کند (۲۴، ۲۳). (ج) سیلیمارین و سیلینین خواص آنتی‌اکسیدان و شلات‌کننده رادیکال‌های آزاد دارند و با مهار لیپید پراکسیداسیون از پیشرفت آسیب سلولی و عواقبی نظیر فیروز ممانعت می‌کنند (۲۶، ۲۵). (د) سبب افزایش محتوای گلوتاتیون و بهبود نسبت گلوتاتیون احیا به اکسید می‌شوند (۲۷). (ه) هم چنین اثر شلات‌کننده آهن داشته و قادر هستند از تغییرات بیوشیمیایی و عملکردی در فیروز ناشی از

References:

1. Daba MH, Abdel-Aziz AH, Moustafa AM, Al-Majed AA, Al-Shabanah OA, El-Kashef HA. Effects of L-Carnitin and Ginkgo Biloba Extract (EG b 761) in Experimental Bleomycin-Induced Lung Fibrosis. *Pharmacol Res* 2002;45(6):461-467.
2. Grande NR, Peao MND, Sa CM, Aguas AP. Lung Fibrosis Induced by Bleomycin: Structural Changes and Overview of Recent Advances. *Scanning Microsc* 1998;12(3):487-494.
3. Uhal BD. Apoptosis in Lung Fibrosis and Repair. *Chest* 2002;122(6 Suppl): 293S-298S.
4. Sato E, Koyama S, Masubuchi T, Takamizawa A, Kubo K, Nagai S, et al. Bleomycin Stimulates Lung Epithelial Cells to Release Neutrophil and Monocyte Chemotactic Activities. *Am J Physiol* 1999;276(6):L941-L950.
5. Oku H, Shimizu T, Kawabata T, Nagira M, Hikita I, Ueyama A, et al. Antifibrotic Action of Pirfenidone and Prednisolone: Different Effects on Pulmonary Cytokines and Growth Factors in Bleomycin-Induced Murine Pulmonary Fibrosis. *Eur J Pharmacol* 2008;590(1-3):400-408.
6. Kalayarasan S, Sriram N, Sudhandiran G. Diallyl Sulfide Attenuates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis: Critical Role of INOS, NF-Kappa B, TNF-alpha and IL-1beta. *Life Sci* 2008;82(23-24):1142-1153.
7. Tamagawa K, Taooka Y, Hiyama K, Ishioka S, Yamakido M. Inhibitory Effects of a Lecithinized Superoxide Dismutase on Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(4Pt1):1279-1284.
8. Giri SN, Blaisdell R, Rucker RB, Wang Q, Hyde DM. Amelioration of Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Hamsters by Dietary Supplementation with Taurine and Niacin: Biochemical Mechanisms. *Environ Health Perspect* 1994;102(Suppl 10):137-147.
9. Teixeira KC, Soares FS, Rocha LG, Silveira PC, Silva LA, Valença SS, et al. Attenuation of Bleomycin-Induced Lung Injury and Oxidative Stress by N-Acetylcysteine Plus Deferoxamine. *Pulm Pharmacol Ther* 2008;21(2):309-316.
10. Ikeda H, Wu GY, Wu CH. Evidence That an Iron Chelator Regulates Collagen Synthesis by Decreasing the Stability of Procollagen mRNA. *Hepatology* 1992;15(2):282-287.

11. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing and Evolving Hypotheses about Its Pathogenesis and Implication for Therapy. *Ann Intern Med* 2001;134(2):136-151.
12. Morazzoni P, Bombardelli E. Silybum Marianum (Carduus Marianus). *Fitoterapia* 1995;66(1):3-42.
13. Tsai JH, Liu JY, Wu TT, Ho PC, Huang CY, Shyu JC, et al. Effects of Silymarin on the Resolution of Liver Fibrosis Induced by Carbon Tetrachloride in Rats. *J Viral Hepat* 2008;15(7):508-514.
14. Zhao XY, Wang BE, Wang TL, Li XM. Inhibitory Effects of Silymarin on Hepatic Fibrosis Induced by Dimethylnitrosamine: Experiment with Rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2006;86(36):2563-2566.
15. Di Sario A, Bendia E, Taffetani S, Omenetti A, Candelaresi C, Marzioni M, et al. Hepatoprotective and Antifibrotic Effect of a New Silybin-Phosphatidylcholine-Vitamin E Complex in Rats. *Dig Liver Dis* 2005;37(11):869-876.
16. Schuppan D, Koda M, Bauer M, Hahn EG. Fibrosis of Liver, Pancreas and Intestine: Common Mechanisms and Clear Targets? *Acta Gastroenterol Belg* 2000;63(4):366-370.
17. Oury TD, Thakker K, Menache M, Chang L, Crapo JD, Day BJ. Attenuation of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis by a Catalytic Antioxidant Metalloporphyrin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25(2):164-169.
18. Jia JD, Bauer M, Cho JJ, Ruehl M, Milani S, Boigk G, et al. Antifibrotic Effect of Silymarin in Rat Secondary Biliary Fibrosis Is Mediated by Downregulation of Procollagen. *Alpha1 and TIMP-1* 2001;35(3):392-398.
19. Tanino Y, Makita H, Miyamoto K, Betsuyaku T, Ohtsuka Y, Nishihira J, et al. Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Bleomycin-Induced Lung Injury and Fibrosis in Mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283(1):L156-L162.
20. Woessner JF. The Determination of Hydroxyproline in Tissue and Protein Samples Containing Small Proportions of This Imino Acid. *Arch Biochem Biophys* 1961;93:440-447.
21. De La Puerta R, Martinez E, Bravo L, Ahumada MC. Effect of Silymarin on Different Acute Inflammation Models and in Leukocyte Migration. *J Pharm Pharmacol* 1996;48(9):968-970.
22. Johnson VJ, Osuchowski MF, He Q, Sharma RP. Physiological Responses to a Natural Antioxidant Flavonoid Mixture, Silymarin, in BALB/c Mice: II. Alterations in Thymic Differentiation Correlate with Changes in C-myc Gene Expression. *Planta Med* 2002;68(11):961-965.
23. Manna SK, Mukhopadhyay A, Van NT, Aggarwal BB. Silymarin Suppresses TNF-Induced Activation of NF-kappaB, C-Jun N-Terminal Kinase and Apoptosis. *J Immunol* 1999;163(12):6800-6809.
24. Zhang JP, Hu ZL, Feng ZH, Lin W, Yu XB, Qian DH. Effect of Silymarin on Liver Damage, Production and Activity of Tumor Necrosis Factor. *Yao Xue Xue Bao* 1996;31(8):577-580.
25. Basaga H, Poli G, Tekkaya C, Aras I. Free Radical Scavenging and Antioxidative Properties of Silybin Complexes on Microsomal Lipid Peroxidation. *Cell Biochem Funct* 1997;15(1):27-33.
26. Pietrangelo A, Borella F, Casagrandi G, Montosi G, Ceccarelli D, Gallesì D, et al. Antioxidant Activity of Silybin in Vivo During Long-Term Iron Overload in Rats. *Gastroenterology* 1995;109(6):1941-1949.
27. Valenzuela A, Aspillaga M, Vial S, Guerra R. Selectivity of Silymarin on the Increase of the Glutathione Content in Different Tissues of the Rat. *Planta Med* 1989;55(5):420-422.
28. Borsari M, Gabbi C, Ghelfi F, Grandi R, Saladini M, Severi S, et al. Silybin, A New Iron-Chelating Agent. *J Inorg Biochem* 2001;85(2-3):123-129.
29. Boigk G, Stroedter L, Herbst H, Waldschmidt J, Riecken EO, Schuppan D. Silymarin Retards Collagen Accumulation in Early and Advanced Biliary Fibrosis Secondary to Complete Bile Duct Obliteration in Rats. *Hepatology* 1997;26(3):643-649.