



## بررسی اثر سیلی‌مارین بر زخم روده بزرگ القا شده با اسید استیک در موش‌های آزمایشگاهی نژاد Balb/C

وحید حمایت خواه جهرمی\* و حبیب اله جوهری

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه زیست‌شناسی، جهرم، ایران

مسئول مکاتبات: Dr.hemayatkhah@yahoo.com

### چکیده

زخم روده‌ی بزرگ یک بیماری مزمن التهابی است. رادیکال‌های آزاد با کاهش عوامل ضد اکسیدان باعث افزایش شدت این بیماری می‌شوند. سیلی‌مارین یک ترکیب فلاونوئیدی است که از گیاه خارمریم به دست می‌آید و دارای مواد ضد اکسیدان می‌باشد و از واکنش‌های التهابی مانع می‌گردد. در این مطالعه، اثر سیلی‌مارین در درمان زخم روده بزرگ القا شده با اسید استیک در موش‌های آزمایشگاهی بررسی گردیده است. از ۳۲ سوری بالغ نژاد Balb/C به وزن تقریبی  $4 \pm 36$  گرم استفاده و به ۴ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل بدون ایجاد بیماری، گروه شاهد دارای زخم روده بدون تحت درمان و گروه‌های تحت درمان تیمار دارای زخم با ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سیلی‌مارین که به صورت خوراکی داده شد. موش‌های گروه تیمار روزانه و به مدت یک هفته بعد از ایجاد بیماری سیلی‌مارین دریافت کردند. داروها به صورت گاواژ داده شد. برای ایجاد زخم، یک میلی‌لیتر اسید استیک ۴٪ به صورت درون رکتومی تزریق شد. یک هفته بعد از تشخیص زخم، قسمتی از نمونه کولون برای مطالعات بافتی برداشته و آسیب‌های کولون به روش موریس و مورتی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که سیلی‌مارین، التهاب و زخم ایجاد شده توسط اسید استیک را درمان و ترمیم می‌کند. چون زخم روده یک بیماری مزمن است، مصرف سیلی‌مارین می‌تواند در جلوگیری از برگشت بیماری مؤثر باشد. می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد با توجه به اینکه درمان با سیلی‌مارین اثرات جانبی استفاده از داروهای شیمیایی را ندارد بنابراین می‌تواند به عنوان روشی جهت درمان و پیشگیری از این بیماری مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: سیلی‌مارین، زخم روده بزرگ، اسید استیک، موش

### مقدمه

خونی، افزایش ورود نوتروفیل‌ها به بافت مخاطی و گسترش التهاب می‌گردند. آزاد شدن واسطه‌های التهابی و آنزیم‌ها موجب تخریب دیواره روده، ایجاد زخم، خونریزی و اسهال می‌گردد. رادیکال‌های آزاد همچنین باعث کاهش عوامل ضد اکسیدان و در نتیجه افزایش شدت بیماری می‌گردند [۲۲]. کنترل التهاب و کاهش اثرات سوء داروها از اهداف مهم درمان زخم روده می‌باشد. بهترین راه درمان بیماری استفاده از داروهایی مثل کورتیکواستروئیدها و آمینوسالسیلات‌ها است که دارای اثرات جانبی

زخم روده بزرگ یک عارضه مزمن است که افراد با سنین مختلف را مبتلا می‌کند و عوامل التهابی و رادیکال‌های آزاد نقش مهمی در ایجاد آن دارند [۱۱] و [۱۲]. آماس گلبول‌های سفید و ماکروفاژها به بافت مخاطی روده از علائم این عارضه است [۲۵]. گلبول‌های سفید فعال شده در بافت مخاطی روده، رادیکال‌های آزاد تولید می‌کنند که باعث پراکسیداسیون لیپیدها، افزایش نفوذپذیری رگ‌های



### مواد و روش کار

این یک مطالعه تجربی است. در این پژوهش کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است. از ۳۲ سر سوری نژاد Balb/C به وزن تقریبی  $4 \pm 36$  گرم تهیه شده از مرکز تحقیقات واکسن و سرم‌سازی شیراز استفاده شد. حیوانات به حیوان‌خانه‌ی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم منتقل شدند و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. برای تغذیه موش‌ها از غذای استاندارد فشرده شده (Pellet) استفاده گردید. حیوانات به ۴ گروه ۸ تایی به صورت زیر تقسیم شدند:

گروه ۱- موش‌های کنترل و دست‌نخورده بدون ایجاد بیماری.

گروه ۲- موش‌های شاهد دارای زخم روده بدون تحت درمان.

گروه ۳- موش‌های دارای زخم + ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم سیلی‌مارین که به صورت خوراکی داده شد.

گروه ۴- موش‌های دارای زخم + ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم سیلی‌مارین که به صورت خوراکی مصرف شد. موش‌های گروه ۳ و ۴ روزانه به مدت یک هفته بعد از ایجاد بیماری سیلی‌مارین دریافت کردند. داروها به صورت گاواژ داده شد. جهت ایجاد کویت (زخم) از روش تزریق درون رکتومی اسید استیک استفاده گردید [۱۴].

نحوه انجام کار به این ترتیب بود که موش‌ها برای مدت ۲۴ ساعت در حالت روزه‌داری نگه داشته شدند و فقط اجازه مصرف آب داده شد. برای ایجاد کویت حیوان را به طور مختصر با اتر بیهوش کرده و یک کاتتر به رکتوم حیوان وارد کرده و یک میلی لیتر اسید استیک ۴ درصد به درون رکتوم تزریق و بدنبال آن اسید استیک تزریق شده کاملاً پخش می-

شدید هستند [۱۳]. به همین دلیل جهت کنترل و پیشگیری از بیماری مطالعات گسترده‌ای انجام می‌شود تا از روش‌های درمان طبیعی از جمله استفاده از مواد ضد اکسیدان استفاده گردد [۹ و ۱۰]. مواد ضد اکسیدان قادرند با حذف رادیکال‌های آزاد مانع از تخریب سلول‌ها و بافت‌ها در بدن گردند [۲۱].

سیلی‌مارین یک ترکیب فلاونوئیدی است که از گیاه خارمریم استخراج می‌شود [۶]. این گیاه خاصیت ضد اکسیدانی و ضد التهاب دارد [۱۷]. سیلی‌مارین همچنین به عنوان پایدارکننده غشای سلولی و افزایش دهنده گلوکوتایون سلولی می‌باشد. گلوکوتایون مسئول مسمومیت‌زدایی و حذف رادیکال‌های آزاد در بدن است [۸ و ۱۶]. به طور سنتی از این گیاه برای افزایش ترشح شیر، افسردگی و احتقان کبد و کلیه استفاده شده است [۵].

سیلی‌مارین به هورمون‌های استروئیدی بسیار شبیه است و این هورمون‌ها از طریق افزایش تولید پروتئین بر میزان بیان ژن موثرند [۶]. اثر ضد سرطانی سیلی‌مارین روی سلول‌های سرطانی پوست، کولون، تخمدان و دستگاه عصبی مطالعه شده است [۲۲]. سیلی‌مارین از لیوپروکسیداسیون و آسیب غشای سلولی جلوگیری می‌کند [۲۰].

بنابراین با توجه به موارد استفاده زیاد سیلی‌مارین از جنبه‌های مختلف، در این تحقیق، تأثیر آن بر کاهش التهاب و ترمیم بافت مخاطی روده القاشده توسط اسید استیک در موش‌های سوری که شباهت زیادی هم به زخم روده در انسان دارد [۱۴] مورد بررسی قرار گرفته است.



### نتایج

**مطالعات ماکروسکوپی:** تزریق محلول اسید استیک ۴ درصد به داخل رکتوم حیوان باعث بروز زخم در کولون گردید (تصویر ۱). نمره‌ی آسیب‌های ماکروسکوپی روده بزرگ در گروه دارای زخم در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) را نشان داد (نمودار ۱).

آسیب‌های ماکروسکوپی در گروه‌های مختلف نشان داد، بیشترین میزان آسیب مربوط به گروه کولیت بدون تحت درمان با سیلی‌مارین است. در گروه‌های تیمار، استفاده از سیلی‌مارین به میزان ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، باعث کاهش معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) آسیب‌های ماکروسکوپی گردید (نمودار ۱).

بررسی آسیب بافتی و التهاب روده بزرگ از دیدگاه میکروسکوپی از نظر میکروسکوپی از بین رفتن وسیع سلول‌های پوششی روده و آماس شدید گلبول‌های سفید در گروه دارای زخم در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد که این تغییرات از مشخصات بیماری زخم روده است (تصاویر ۲، ۳، ۴ و ۵ و نمودار ۲).

مقایسه‌ی نمره درجه آسیب و التهاب میکروسکوپی در گروه‌های مختلف نشان داد که بالاترین نمره مربوط به گروه دارای زخم بدون تحت درمان است (نمودار ۲).

استفاده از سیلی‌مارین در مقادیر ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث کاهش معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) آسیب‌های میکروسکوپی روده و شدت التهاب در مقایسه با گروه دارای زخم گردید (نمودار ۲).

شد. یک هفته بعد از تشخیص زخم، برای هر موش ۵ سانتی متر بخش انتهایی روده بزرگ برداشته شد. سپس کولون به صورت طولی برش داده شده و با سالین سرد شستشو و توزین شد. قسمتی از نمونه بافتی کولون را برای مطالعات بافتی برداشته و در بوئن تثبیت گردید. آسیب ماکروسکوپی کولون به روش موریس [۱۸]

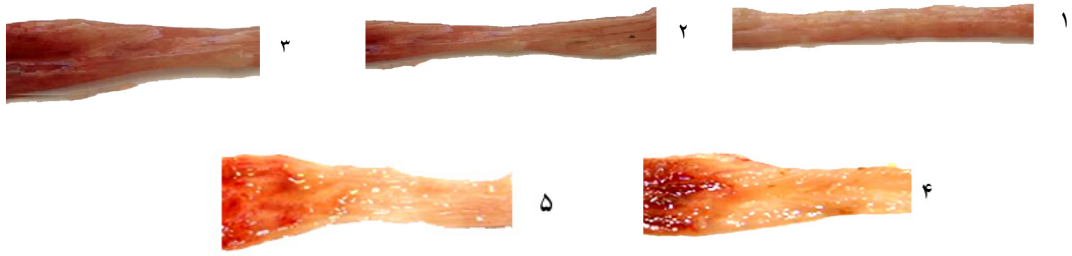
با توجه به ویژگی‌های زیر از ۰ تا ۵ نمره‌دهی گردید:

بدون آسیب (۰)، آسیب موضعی و بدون زخم (۱)، زخم‌های خطی بدون التهاب شدید (۲)، زخم‌های خطی با التهاب در یک نقطه (۳)، التهاب یا زخم در دو محل یا بیشتر یا یک محل زخم و التهاب بزرگ با طول بیش از یک سانتی‌متر (۵).

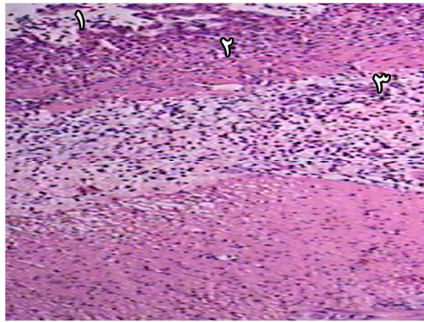
برای مطالعات میکروسکوپی، نمونه‌های روده بعد از فیکس شدن در الکل آب‌گیری و در پارافین قرار داده شدند و با میکروتوم مقاطع ۵ میکرونی تهیه و سپس با هماتوکسیلین - ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. درجه‌ی آسیب میکروسکوپی کریپت و شدت التهاب به روش مورتی [۱۹] ارزیابی و نمره‌دهی گردید.

نمره‌دهی آسیب کریپت به این صورت است: کریپت سالم (۰)، از بین رفتن یک سوم کریپت (۱)، از بین رفتن دو سوم کریپت (۲) از بین رفتن کل کریپت‌ها و سالم بودن اپیتلیوم (۳)، از بین رفتن کل کریپت‌ها و اپیتلیوم (۴).

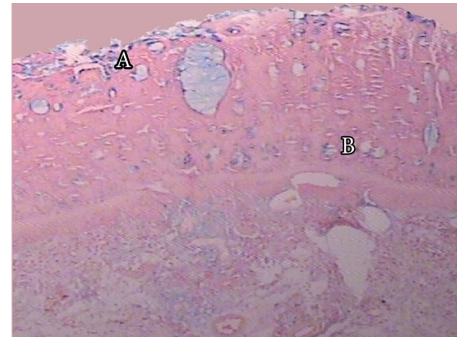
تجزیه و تحلیل اطلاعات به کمک نرم‌افزار SPSS و آنالیز واریانس یک‌طرفه انجام و هیستوگرام‌های لازم رسم گردید.



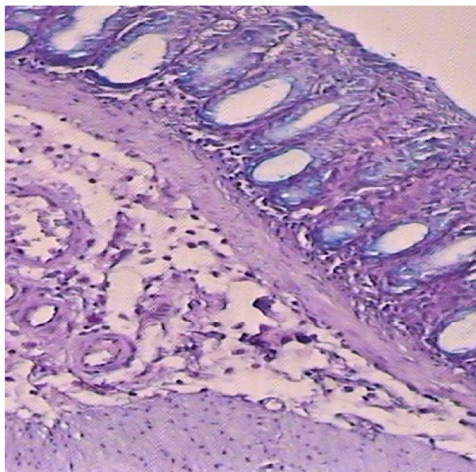
تصویر ۱- شمای ماکروسکوپی روده. التهاب همراه با خونریزی در روده (۲ و ۳) بوضوح دیده می‌شود.  
۱- گروه کنترل ۲- گروه دارای زخم بدون درمان، ۳- برش طولی روده در گروه دارای زخم بدون درمان ۴- برش طولی روده در گروه تیمار (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سیلی مارین) ۵- برش طولی روده در گروه تیمار (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سیلی مارین)



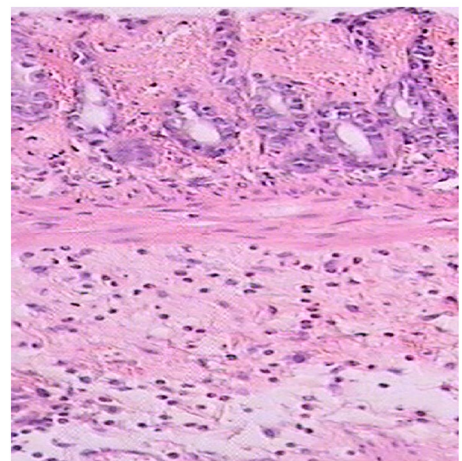
تصویر ۳- فتومیکروگراف از ساختار بافتی روده بزرگ در گروه دارای زخم بدون درمان. از بین رفتن سلول‌های پوششی (۱)، از بین رفتن ساختار کریپت (۲)، آماس گلبول‌های سفید (۳)؛ رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین، بزرگ‌نمایی X ۴۰۰



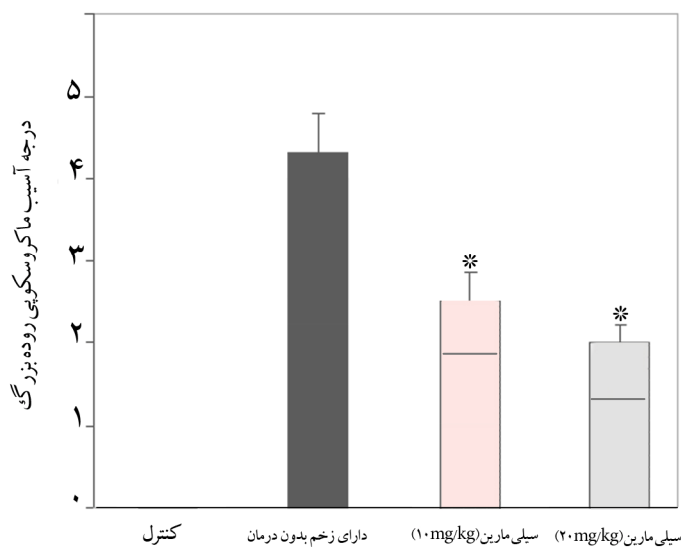
تصویر ۲- فتومیکروگراف بافت روده بزرگ در گروه دارای زخم بدون درمان. همانطور که مشاهده می‌گردد مخاط روده آسیب شدید پیدا کرده است به گونه‌ای که قابل تشخیص نیست. A- مخاط، B- زیرمخاط؛ رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین، بزرگ‌نمایی X ۴۰۰



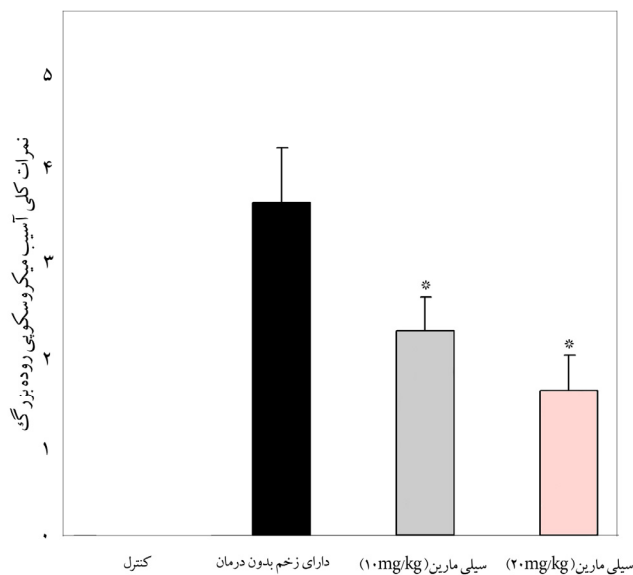
تصویر ۵- فتومیکروگراف از بافت روده بزرگ در گروه کنترل، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین، بزرگ‌نمایی X ۴۰۰



تصویر ۴- فتومیکروگراف از بافت روده بزرگ دارای زخم، درمان شده با سیلی مارین؛ رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین، بزرگ‌نمایی X ۴۰۰



نمودار ۱- اثر سیلی مارین بر آسیب ماکروسکوپی روده در گروه دارای زخم القا شده با اسید استیک.  
\* نشان دهنده معنی دار بودن در سطح احتمال (  $P < 0/05$  ).



نمودار ۲- اثر سیلی مارین بر روی آسیب‌های میکروسکوپی روده در گروه دارای زخم القا شده با اسید استیک.  
\* نشان دهنده معنی دار بودن در سطح احتمال (  $P < 0/05$  ).

### بحث

بیماری‌های التهابی روده از شایع‌ترین بیماری‌های دستگاه گوارش محسوب می‌شود. زخم روده بزرگ



یک بیماری مزمن التهابی کولون است که عوامل التهابی و رادیکال‌های آزاد نقش بسزایی در بروز آن دارند [۱۱]. آماس گلبول‌های سفید و ماکروفاژها به بافت مخاطی روده از علایم بارز این بیماری است [۲۲]. نوتروفیل‌های فعال شده در بافت مخاطی روده، رادیکال‌های آزاد از جمله یون پراکسید، رادیکال هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن تولید می‌کنند. این عوامل موجب پراکسیداسیون لیپیدها، افزایش نفوذپذیری رگ‌های خونی، افزایش ورود نوتروفیل‌ها به بافت مخاطی و گسترش التهاب می‌گردند [۱]. در حال حاضر بهترین شیوه درمان این بیماری استفاده از داروهای ضدالتهابی نظیر کورتیکواستروئیدها و آمینوساسیلات‌ها است ولی این داروها اثرات جانبی شدید دارند [۲۵]. به همین

دلیل مطالعات وسیعی انجام می‌گیرد تا از روشهای درمان طبیعی، بویژه استفاده از مواد ضد اکسیدان برای کنترل بیماری استفاده گردد [۱۳]. در مطالعه حاضر اثر سیلی مارین در رفع التهاب مخاط روده در مدل تیمار کولیت در موش‌ها بررسی شده است. نتایج مطالعه اخیر نشان داد که تزریق درون رکتومی اسید استیک موجب از بین رفتن سلول‌های پوششی و کریپت‌های روده می‌شود که از علائم میکروسکوپی بیماری به حساب می‌آید. از دیدگاه ماکروسکوپی نیز التهاب و زخم در جداره روده بزرگ دیده شد که از دیگر مشخصات بیماری محسوب می‌گردد [۱۳].

نتایج تحقیق حاضر بیانگر این است که سیلی مارین در رفع التهاب آسیب‌های بافتی روده مؤثر است. احتمالاً خواص ضد اکسیدانی و ضد التهابی ترکیبات سیلی مارین باعث بهبودی شده است. سیلی مارین یک ترکیب فلاونوئیدی است که از گیاه خارمریم

بدست می‌آید و خاصیت ضد اکسیدانی بسیار بالایی دارد. این خواص در حیوانات آزمایشگاهی که توسط داروها یا سموم مختلف دچار ضایعات حاد یا مزمن شده‌اند به اثبات رسیده است. ترکیبات ضد اکسیدانی می‌توانند با خنثی نمودن رادیکال‌های آزاد جلوی تخریب سلولی ناشی از اثر رادیکال‌های آزاد را بگیرند [۱۳، ۲۳].

مطالعات نشان می‌دهد سیلی مارین عوامل نسخه برداری هسته‌ای را که در بیان ژن‌های مختلف درگیر در فرایندهای التهاب و ایجاد سرطان نقش دارند مهار می‌کند. تحقیقات حاکی از این است که سیلی مارین فعالیت خود را به واسطه TNF- $\alpha$  انجام می‌دهد [۱۸]. این اثرات از طریق مهار فسفریلاسیون و اختلال در عملکرد فاکتور نکروز توموری- $\alpha$  که جزو فاکتورهای های پیش التهابی است القا می‌گردد [۱۵]. فاکتور نکروز تومور- $\alpha$  یکی از عوامل پیش التهابی است که در ایجاد بیماری های التهابی روده نقش بسزایی دارد. افزایش سطح سرمی این فاکتور در افراد مبتلا به زخم روده (کولیت) موید همین موضوع می‌باشد [۳ و ۲۴].

نتایج تحقیقات انجام شده بر روی مکانیسم عمل ضد التهابی سیلی مارین نشان می‌دهد که سیلی مارین قادر است لیپوپلی ساکارید فعال‌کننده ماکروفاژها را مهار کند. القای پروتئین پیش التهابی توسط این پلی ساکاریدها انجام می‌شود [۲۴]. علاوه بر رادیکال‌های آزاد، اینترلوکین‌ها و پروستاگلاندین‌ها هم در ایجاد کولیت اولسراتیو موثرند [۴]. پروستاگلاندین-E2 به عنوان یک عامل شیمیوتاکسی، تجمع نوتروفیل‌ها در مخاط و تشکیل انواع فعال اکسیژن و آسیب اکسیداتیو در سلول‌ها و تولید اسید آراشیدونیک از فسفولیپیدهای غشای سلول را موجب می‌شود [۲]. اسید آراشیدونیک توسط آنزیم



- 2- Almallah, Y.Z., Ewen, S.W., El-Tahir, A., Mowat, N.A., Brunt, P.W., Sinclair, T.S., Heys, S.D. and Eremin, O. (2002), Distal proctocolitis and n-3 polyunsaturated acids (m-3PUFAs): the mucosal effect in situ. *J Clin Immunol.*, 20(1): 68-76.
- 3- Brostrom, O. (1990), Prognosis in ulcerative colitis. *Med Clin North Am.* 74: 201-218.
- 4- Dalglish, A.G. and O'Byrne, K.(2006). Inflammation and cancer: the role of the immune response and angiogenesis. *Cancer Treat Res.* 130:1-38.
- 5- Derman, D. A. (2001), The Review of Natural Product. 1st ed. Facts and Comparisons. St. Louis. 405- 409.
- 6- Dixit, D., Baboota, S., Kohli, K. and Ahmad, S.(2007), Silymarin: A review of pharmacological aspects and bioavailability enhancement approaches. *Indian Journal of Pharmacology*, 39 (4).
- 7- Durak, I., Cetin, R., Devrim, E. and Erguder, J.(2005), Effects of black grape extract on activity of DNA turnover enzymes in cancerous and non cancerous human colon tissue: *Life Sciences*, 76: 2005-3000.
- 8- Feher, A., Lang, I. and Nekam, K. (1990), Involvement and mechanism of lipid peroxidation in biological system. *Biochem. Sci.*, 15: 129-135.
- 9- Gassull, M.A.(2004). Review article: the role of nutrition in the treatment of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol.*, 20: 79-83.
- 10- Geerling, B.J., Badart, A., Stockbrugger, R.W. and Beumer, R.J. (2000), Comprehensive nutritional status in recently diagnosed patients with inflammatory bowel disease compared with population controls. *Eur J Clin Nutr.*, 54(6): 541-21.

سیکلوآکسیژناز به انواع پروستاگلاندین‌ها تبدیل می‌شود. سیکلوآکسیژناز در زمان التهاب به وسیله محرک‌های شیمیایی در بافت‌های التهاب‌دیده ساخته می‌شود [۱۵]. مطالعات نشان می‌دهد، ترکیبات تشکیل دهنده سیلی‌مارین (سیلی‌بین، سیلی‌داینین و سیلی‌کریستین) از تشکیل پروستاگلاندین‌ها مانع می‌شوند [۷]. مهار تولید پروستاگلاندین‌ها به وسیله سیلی‌مارین به طور مشخص به مهار آنزیم سیکلوآکسیژناز مرتبط می‌باشد [۲۳].

بنابراین چون کولیت اولسراتیو به عنوان یک بیماری مزمن مطرح است و همچنین دارای دوره‌های بازگشت مکرر است، مصرف سیلی‌مارین می‌تواند در جلوگیری از برگشت بیماری مؤثر باشد. می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که سیلی‌مارین می‌تواند در رفع التهاب روده نقش داشته و مؤثر باشد و با توجه به اینکه درمان با سیلی‌مارین اثرات جانبی استفاده از داروهای شیمیایی را ندارد بنابراین می‌تواند به عنوان روشی جهت درمان و پیشگیری از این بیماری مورد استفاده قرار گیرد. پیشنهاد می‌گردد در آینده، تحقیقات گسترده‌تری در مورد اثرات سیلی‌مارین در سطح ملکولی و آنزیم‌ها انجام گیرد.

#### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله لازم می‌دانند از مساعدت‌های بی‌دریغ معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی جهرم جهت تامین منابع مالی این طرح تحقیقاتی، مراتب امتنان و سپاس خویش را به جای آورند.

#### منابع

- 1- Alarcon, D. C., Martin, M. and Maruenda, E. (1992), Gastric and anti-ulcer activity of silymarin. A lipoxyprogenase inhibitor in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 44:929-931.



- 18- Morris, G.P., Beck, P.L., Herridge, M.S. and Wallact, J.L. (1989), Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, 96:795-803.
- 19- Murthy, S.N., Cooper, H.S., Shim, H., Shah, R.S., Ibrahim, S.A. and Sedergran, D.J. (1993), Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporine. *Dig Dis Sci*. 38(9): 1722-1734.
- 20- Parish, R.C. and Doering, P.L. (1986), Treatment of Amanita mushroom poisoning: a review. *Vet. Hum. Toxicol.*, 28: 318-322.
- 21- Pravda, J. (2005), Radical induction theory of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*, 28:2371-3284.
- 22- Radko, L. and Cybulski, W. (2007), Application of silymarin in human and animal medicine. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, 1(1): 022-026.
- 23- Saller, R., Meier, R. and Brignoli, R. (2001), The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drug*, 285: 693-697.
- 24- Toovey, S., Hudson, E. and Hendry, W.F. (1981), Sulfasalazine and male infertility: Reversibility and possible mechanism. *Gut*, 22: 445-451.
- 25- Wang, J. and Fu, Y.X. (2005), Tumor necrosis factor family members and inflammatory bowel disease. *Immunol. Rev.*, 204: 144-155.
- 11-Hanauer, S.B. (1996), Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 1, 334:384-388.
- 12- Hanauer, S.B. (2006), Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis*. 12: 3-9.
- 13- Head, K.A. and Jurenka, J.S. (2003), Inflammatory bowel disease Part1: ulcerative colitis, pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Altern Med Rev*. 8: 247-283.
- 14- Jurjus, A.R. and Khoury, N.N. (2004), Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol-Toxicol Methods*, 50: 81-92.
- 15- Kang, J.S., Jeon, .Y.J, Park, S.K., Yang, K.H. and Kim, H.M. (2004), Protection against lipopolysaccharide - induced sepsis and inhibition of interleukin- 1beta and prostaglandin E2 synthesis by silymarin. *Biochem Pharmacol.*, 67(1): 175-81.
- 16- Laforge, M. (1990), Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice. *Pharmacol.*, 39: 2027-2034.
- 17- Manna, S.K., Mukhopadhyay, A and Aggarwal, B.B. (1999), Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF-kappa B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. *J. Immunol*. 163(12): 6800-6809.