JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

دوره نهم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۳۹۷

بررسی تاثیر داروی سیلیمارین در درمان کاتاراکت تجربی در خرگوش

وریا توحیدی[۱]، سعید عظیم پور[۲]*

۱ – بخش علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه – ایران

۲– بخش علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل – ایران.*

نویسنده مسئول: saeed.azimpour@gmail.com

دریافت مقاله:۶آذر ماه۱۳۹۶ ، پذیرش نهایی: ۶ تیر ماه۱۳۹۷

چکیده:

در کاتاراکت بعلت تیره و تار شدن عدسی چشم نور کمتری از عدسی عبور می‌کند. دراین بیماری توانایی تطابق و وضوح بینایی چشم با گذشت زمان کاهش می‌یابد و در نتیجه حساسیت تفریق از بین خواهد رفت توانایی دید در نور روشن کاهش خواهد می‌یابد. هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر داروی سیلیمارین در کاهش کاتاراکت در خرگوش بود. به این منظور ۱۲ سر خرگوش به مدت دو هفته جهت حصول اطمینان از سالم بودن کلینیکی آنها نگهداری شدند. کاتاراکت سریع با تزریق زیر جلدی سلنیت سدیم با دوز ۱ میلی گرم بازای هر کیلوگرم وزن بدن و دو بار تزریق مجدد با فواصل دو روز در میان (در مجموع ۳ میلی گرم بازای هر کیلوگرم وزن بدن) در ۱۲ سر خرگوش ایجاد گردید. نه روز پس از تزریق سلنیت سدیم در همه خرگوش‌ها کاتاراکت قشری و زیر کپسول خلفی مشاهده گردید. افتالموسکوپی و اولتراسونوگرافی مد روشنایی به صورت روزانه و معاینه با اسلیت لامپ بیومیکروسکوپی هر چهار روز یک بار تا ظهور نشانه های کاتاراکت در روز نهم به عمل آمد. در این روز خرگوش ها به دو گروه شاهد و مطالعه تقسیم شدند و به گروه مطالعه ۱۴۰ میلی گرم بازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی داروی سیلیمارین داده شد. به مدت ۲۲ روز چشم خرگوش‌های هر دو گروه شاهد و مطالعه به وسیله افتالموسکوپی و اولترا–سونوگرافی مد روشنایی به صورت روزانه و معاینه با اسلیت لامپ بیومیکروسکوپی هر چهار روز یک بار بررسی شدند. چشم های چهار خرگوش از دو گروه پس از مرگ بی درد، جهت بررسی آسیب شانسی عدسی چشم ها در روز بیست و سوم به آزمایشگاه آسیب شناسی ارسال گردید. به وسیله افتالموسکوپی، اولتراسونوگرافی مد روشنایی و اسلیت لامپ بیومیکروسکوپی و نیز آسیب شناسی کاتاراکت ایجاد شده در دو گروه باهم مقایسه شدند. اسلیت لامپ بیومیکروسکوپی و آسیب شناسی کاهش نشانه های کاتاراکت در گروه درمان با سیلیمارین نسبت به گروه کنترل را نشان داد ولی اولتراسونوگرافی مد روشنایی نتوانست اثر سیلیمارین را در کاهش نشانه های کاتاراکت نشان دهد.

کلمات کلیدی: خرگوش، کاتاراکت، سیلیمارین

مقدمه:

درمان انتخابی کاتاراکت پیشرفته جراحی است (۱۲) ولی در مواردی از جمله کاتاراکت های غیر پیشرفته عدم تمایل صاحب دام، دیابت و کهولت، جراحی پیشنهاد نمی گردد از این رو ارائه راه کاری که بتواند از پیشرفت کاتاراکت و کدورت کامل عدسی و نابینایی جلوگیری نماید لازم به نظر می رسد.

از آنجا که اکسیداسیون ها نقش مهمی در بیماری زایی کاتاراکت دارند لذا آنتی اکسیدان ها می توانند نقش عمده ای در جلوگیری و متوقف کردن پیشرفت کاتاراکت داشته باشند. مطالعات نشان داده که استفاده از آنتی اکسیدان هایی مانند ویتامین E- سلنیوم، ارگاتین Orgatein، Zinc Ascorbate و کارنوزین Carnosine هم بصورت موضعی و هم بصورت سیستمیک در درمان و پیشگیری از کاتاراکت موثر بوده اند.

گیاه خار مریم با نام علمی سیلیوم ماریانوم Sclybum marianum گیاهی است که از آن از گذشته های بسیار دور به منظور درمان بیماری های کبدی استفاده می شد. در سال ۱۹۶۸ دانشمندان سه مولکول ویژه حفاظت کننده کبد را از این گیاه با نام های سیلیکریستین و سیلیدیانین و سیلیبینین جدا کردند که امروزه مجموعا آنها را سیلیمارین می نامند (۱۱). امروزه مهمترین کاربرد بالینی این گیاه به دلیل خصوصیت محافظت کبدی آن است و به عنوان یک درمان پشتیبان در بیماری های کبدی – التهابی مزمن از قبیل سیروز، هپاتیت ها، مسمومیت های الکلی و سموم شیمیایی مانند تتراکلرید کربن مورد استفاده قرار می گیرد. سیلیمارین همچنین در درمان بیماری های کبدی ناشی از قارچ های سمی نیز کاربرد دارد. اکثر سموم کبدی اثرات مخرب خود را از طریق ایجاد رادیکال های آزاد اعمال می کنند. تحقیقات نشان داده که سیلیبین یک آنتی اکسیدان است و همچنین ساختار غشای یاخته های کبدی را به گونه ای تغییر می دهد که مانع از نفوذ سم به داخل یاخته ها می شود. دیگر این که سیلیبین امکان ایجاد یاخته های جدید کبدی به منظور جایگزینی با یاخته های آسیب دیده را از طریق تحریک سنتز پروتئین فراهم می کند. سیلیبلن بعنوان یک پادزهر قوی برای سمیت ناشی از کلاهک قارچ سمی آمانیتا فالوییدس مورد استفاده قرار می گیرد (۸ و ۱۰).

با توجه به وجود گزارش تاثیر ویتامین E در جلوگیری از پیشرفت کاتاراکت (۱۸) و قدرت آنتی اکسیدانی بالای سیلیمارین نسبت به ویتامین E به نظر می رسد که سلیمارین در جلوگیری از پیشرفت کاتاراکت بهتر از ویتامین E عمل می کند.

سیلیمارین به عنوان یک عامل جلوگیری کننده از بیماری های کبدی مانند هپاتیت و کبد چرب بکار گرفته شده است، همچنین سیلیمارین جهت جلوگیری از نفریت تجربی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۰).

سیلیمارین یک داروی نامحلول در آب می باشد و به صورت کپسول تجویز می گردد. جذب آن پس از تجویز خوراکی نسبتا پایین است و حداکثر غلظت پلاسمایی آن در طی ۴ تا ۶ ساعت حاصل می گردد. هم در انسان و هم در حیوانات مسیر اصلی دفع سیلیمارین از طریق صفرا و به مقدار کمتر از طریق ادرار می باشد (۱۱).

هدف از این تحقیق بررسی اثرات جلوگیری کننده و درمانی سیلیمارین خوراکی بدنبال القای کاتاراکت در

خرگوش ها به وسیله اولتراسونوگرافی و اسلیت لامپ بیومیکروسکوپ می باشد.

روش کار:

دوازده سر خرگوش نژاد مخلوط ایرانی از هر دو جنس بدون در نظر گرفتن بلوغ جسمی به وزن های ۷۰۰ تا ۱۵۰۰ گرم از یک مرکز نگهداری و پرورش خرگوش در تهران تهیه گردیدند سپس خرگوش ها به پلی کلینیک حیوانات خانگی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران انتقال داده شدند، و در آنجا هر یک از خرگوش‌ها مورد معاینه بالینی قرار گرفته و توزین شده و تجویز داروی ضد انگل و تکمیل اطلاعات فردی در فرم های ویژه هر کدام از خرگوش ها صورت گرفت. جهت تشخیص بلوغ جسمانی از خرگوش ها رادیوگرافی به عمل آمد که از این دوازده سر خرگوش دو سر آنها که وزن شان زیر ۷۰۰ گرم بودند نابالغ و بقیه بالغ بودند. خرگوش ها به مدت دو هفته در قفسه های جداگانه نگهداری شدند، در این مدت خرگوش ها با جیره هویج، سیب و نان تغذیه می شدند. پس از سپری شدن دو هفته و تجدید معاینات بالینی، جهت حصول اطمینان از سلامت چشمی خرگوش‌ها معاینات چشم پزشکی شامل افتالموسکوپی، مشاهده چشم با استفاده از دستگاه اسلیت لامپ بیومیکروسکوپی مجهز به دوربین دیجیتالی در مرکز تحقیقات چشم پزشکی بیمارستان فارابی تهران و همچنین اولتراسونوگرافی چشم ها در پلی کلینیک حیوانات خانگی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران برای اطمینان از سالم بودن چشم‌ها انجام گردید. پس از حصول اطمینان از سالم بودن چشم ها، از طریق اولتراسونوگرافی اندازه طبیعی عدسی‌ها و سایر ساختارهای چشمی بررسی گردید، بررسی های اولتراسونوگرافی بدون نیاز به بیهوشی و بدون استفاده از بی حسی های چشمی فقط با مقید کردن فیزیکی انجام گردید. اولتراسونوگرافی با استفاده از مقادیر کافی ژل اولتراسونوگرافی و با قرار دادن ترانس دیوسر بر روی قرنیه انجام گردید تمام اندازه گیری ها توسط یک نفر و بر روی تصاویری که قرنیه، کپسول قدامی، کپسول خلفی، دیسک بینایی در یک راستا بودند و اندازه گیری ها ثبت گردید. در مرحله بعد سلنیت سدیم۹۹/۳ درصد ساخت کارخانه مرک با دوز یک میلی گرم بازای هر کیلوگرم وزن بدن (از محلولی که ۰/۵ گرم سلنیت سدیم را در پانصد سی سی نرمال سالین قابل تزریق حل کرده بوریم بنابراین هر سی سی از این محلول حاوی یک میلی گرم سلنیت سدیم بود) به صورت زیر جلدی تزریق گردید و تزریق مجدد به همین میزان به فواصل چهل و هشت ساعت یکبار تا دو بار تکرار گردید و مجموع دوز دریافتی سه میلی گرم بازای هر کیلوگرم وزن بدن در نظر گرفته شد.

اولتراسونوگرافی، افتالموسکوپی و معاینه با اسلیت لامپ بیومیکروسکوپی به صورت روزانه انجام گردید تا زمانی که شروع کاتاراکت توسط اسلیت لامپ تایید گردید. پس از تایید کاتاراکت توسط اسلیت لامپ بیومیکروسکوپی خرگوش ها به صورت اتفاقی به دو گروه شاهد و مطالعه تقسیم شدند که هر گروه شامل شش سر خرگوش بود. به خرگوش های گروه مطالعه میزان ۱۴۰ میلی گرم بازای هر کیلوگرم وزن بدن سیلیمارین به نام تجاری میک تستیل ساخت کارخانه Holland and Barret از طریق خوراکی به شکل روزانه بعد از تایید کاتاراکت خورانده شد و گروه شاهد دارویی دریافت نکردند.

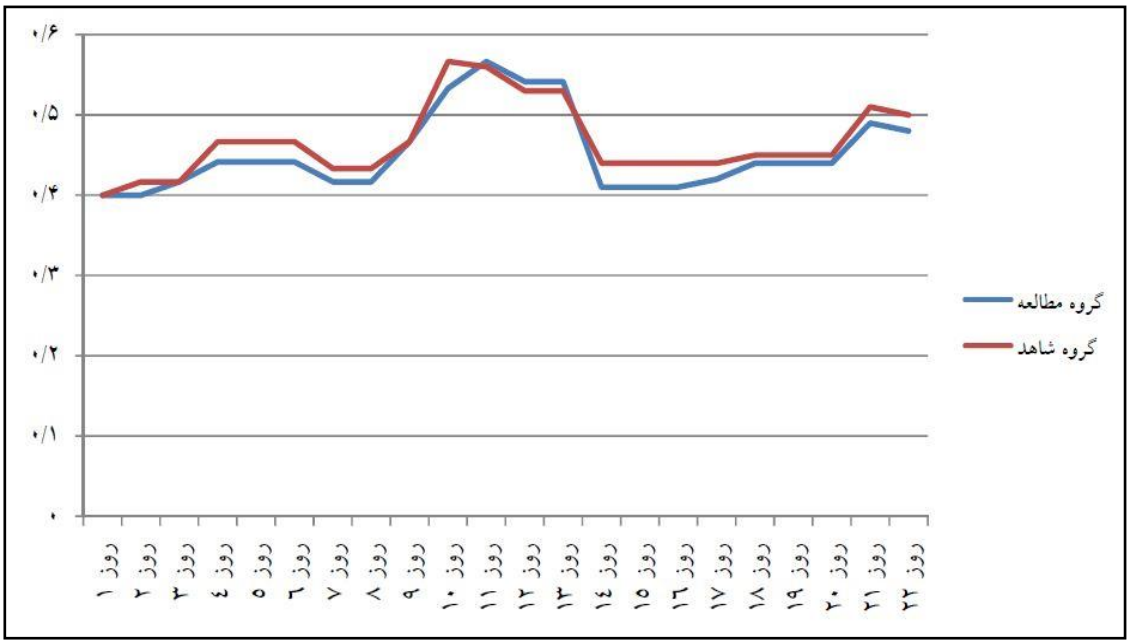
اولتراسونوگرافی و افتالموسکوپی تا دو هفته پس از تایید تشخیص کاتاراکت به صورت روزانه و معاینه با اسلیت لامپ بیومیکروسکوپی از روز اول نگهداری خرگوش ها هر چهار روز یکبار انجام گردید. پس از سپری شدن دوره بیست و دو روزه با رعایت شرایط استعلام شده از سازمان حمایت از حیوانات مراحل مرگ بدون درد خرگوش صورت پذیرفت و نکروپسی جهت خروج عدسی چشم برای خرگوش ها صورت پذیرفت، عدسی های مذکور در فرمالین ۱۰ درصد داخل ظروف شماره گذاری شده با رعایت عدم اطلاع از گروه بندی نمونه ها به بخش آسیب شناسی ارسال گردیده و مراحل تشخیص آسیب شناسی از طریق تهیه لام و رنگ آمیزی به شیوه هماتوکسیلین – ائوزین صورت گرفت و سپس نتایج آسیب شناسی در فرم ها ویژه اطلاعاتی هر یک از نمونه ها ثبت گردید.

نتایج:

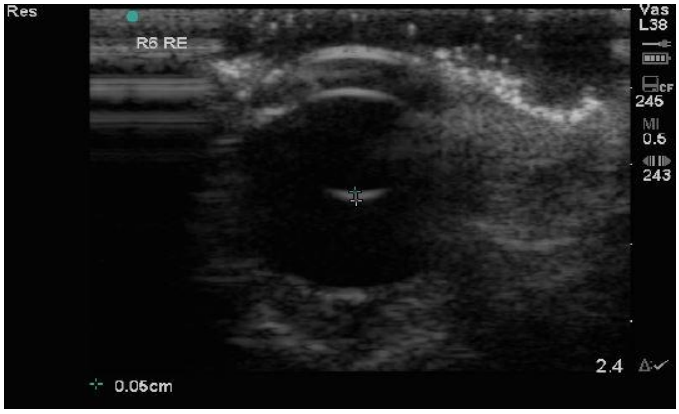
در این تحقیق با تزریق یک میلی گرم بازای هر کیلوگرم وزن بدن به فاصله هر ۴۸ ساعت برای ۳ بار در خرگوش ها سبب کاتاراکت شد.

نتایـج بدست آمـده از اولتراسونوگـرافی، اسلیت لامپ بیومیکروسکوپی و آسیب شناسی به شرح زیر است:

نمودار ۱ نتایج اولتراسونوگرافی در دو گروه شاهد و مطالعه را نشان می دهد. اندازه ضخامت کپسول خلفی در روز اول ۰/۴ میلیمتر بود و تا روز نهم این اندازه از ۰/۵ میلی متر بیشتر نشد. در روز نهم و دهم اندازه ضخامت کپسول خلفی به حدود ۰/۶ میلی متر افزایش یافت که این افزایش ضخامت کپسول خلفی به بیش از ۰/۵ میلی متر نشان دهنده شروع کاتاراکت زیر کپسول خلفی در خرگوش تلقی گردید، افزایش ضخامت تا روز دوازدهم ادامه داشت (نگاره ۱) . از روز سیزدهم اندازه ضخامت کپسول خلفی در هر دو گروه شاهد و مطالعه به حدود ۰/۴ میلیمتر کاهش یافت و تا روز بیستم و دوم تغییری نکرد.

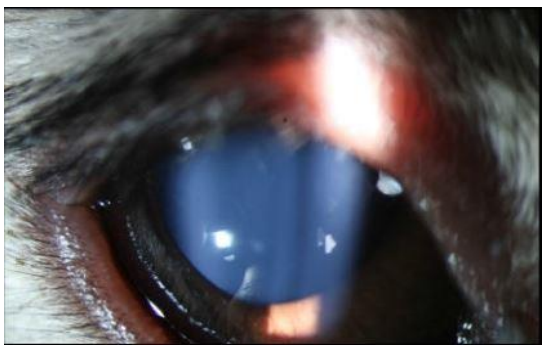


نمودار ۱ : مقایسه ضخامت کپسول خلفی در دو گروه شاهد و مطالعه با استفاده از اولتراسونوگرافی

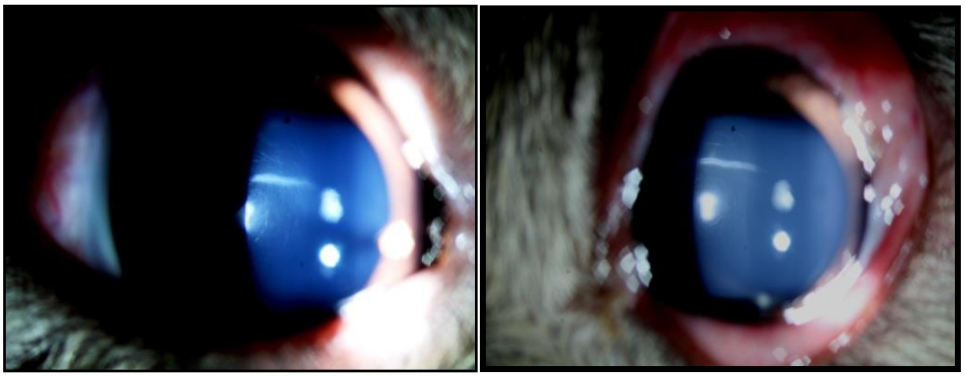


نگاره ۱: سونوگرام چشم خرگوش ها در روز دوازدهم

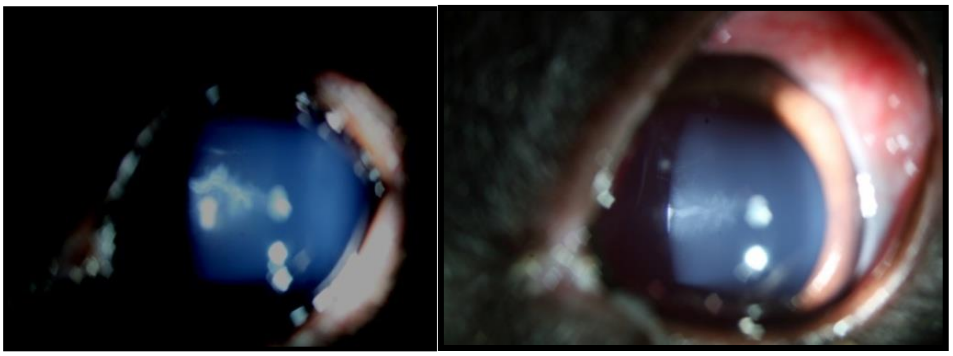
هیچگونه تغییر مورفولوژیک مانند افزایش اکوژنسیته در نواحی مرکزی (هسته) و یا قشری عدسی که دال بر وجود انواع دیگر کاتاراکت تعریف شده باشد مشاهده نگردید. تغییرات ثبت شده توسط اولترا- سونوگرافی توانست ایجاد کاتاراکت را از روز نهم به بعد نشان دهد ولی این روش قادر به نمایش تفاوت معنی دار در روند ایجاد کاتاراکت در گروه شاهد و مطالعه تا روز بیست و دوم نبود. در طول انجام مطالعه، تغییر اندازه عدسی در دو گروه شاهد و مطالعه مشاهده نگردید، همچنین تغییرات غیر طبیعی سونوگرافی در هیچیک از ساختارهای چشمی مشاهده نشد.در تصاویر تهیه شده توسط دستگاه اسلیت لامپ بیومیکروسکوپ در دو گروه شاهد و مطالعه نشانی دال بر وجود کاتاراکت تا روز هشتم بعد از تزریق سلنیت سدیم مشاهده نشد (نگاره ۲). در روز نهم بعد از تزریق، کاتاراکت زیر کپسول خلفی و کاتاراکت قشری خطی به صورت خفیف در تمامی خرگوش‌های گروه های شاهد و مطالعه مشاهده گردید که روند پیشرفت کاتاراکت تا روز سیزدهم ادامه یافت و یکباره نشانه های کاتاراکت کاهش یافت این کاهش تا روز بیست و دوم در هر دو گروه مشاهده گردید ولی میزان کاهش نشانه های کاتاراکت در گروه مطالعه بیشتر از گروه شاهد بود (نگاره ۳ و ۴).



نگاره ۲:اسلیت لامپ بیومیکروسکوپی چشم در خرگوش های مورد مطالعه



نگاره ۳: اسلیت لامپ بیومیکروسکوپی چشم در خرگوش های گروه مطالعه؛ تصویر سمت چپ در روز دوازدهم و تصویر سمت راست در روز بیست و دوم



نگاره ۴: اسلیت لامپ بیومیکروسکوپی چشم در خرگوش های گروه شاهد؛ تصویر سمت چپ در روز دوازدهم و تصویر سمت راست در روز بیست و دوم

به روش اسلیت لامپ بیومیکروسکوپی امکان بررسی کمی، کاهش یا افزایش کاتاراکت به دلیل خفیف بودن نشانه های کاتاراکت وجود نداشت و بررسی کاتاراکت تنها با رویت میزان رشته های کدر ایجاد شده در سطح کپسول خلفی و در ناحیه قشری صورت می پذیرفت.

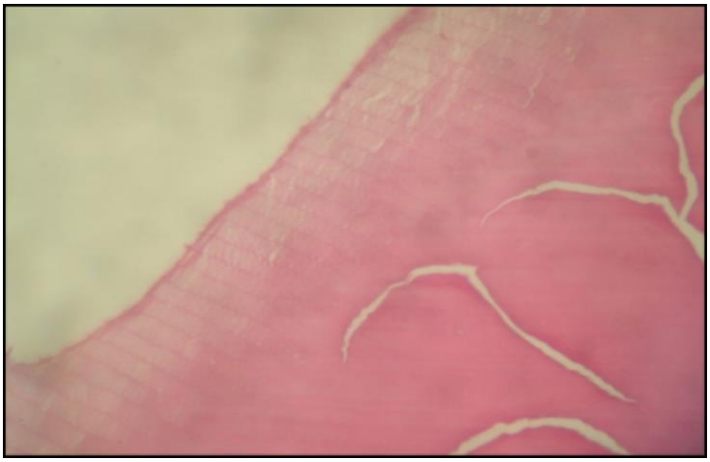
نتایج آسیب شناسی:

بررسی آسیب شناسی نمونه ها نشان داد که تمامی آنها در هر دو گروه شاهد و مطالعه دارای نشانه های کاتاراکت بودند (نگاره ۵ و ۶). این نشانه ها عبارتند از:

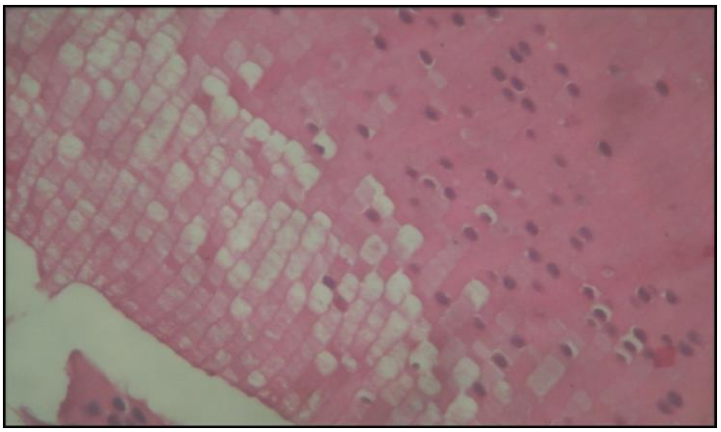
۱- مهاجرت سلول های اپی تلیال زیر کپسولی به قسمت کپسول خلفی

۲- رشته های زیر اپی تلیوم هسته دار شده و متورم به نظر می رسند این نشانه حاکی از وجود دژنراسیون در رشته های مذکور بوده و این رشته های هسته دار متورم را سلول بادکنکی یا Bladder Cell می نامند.

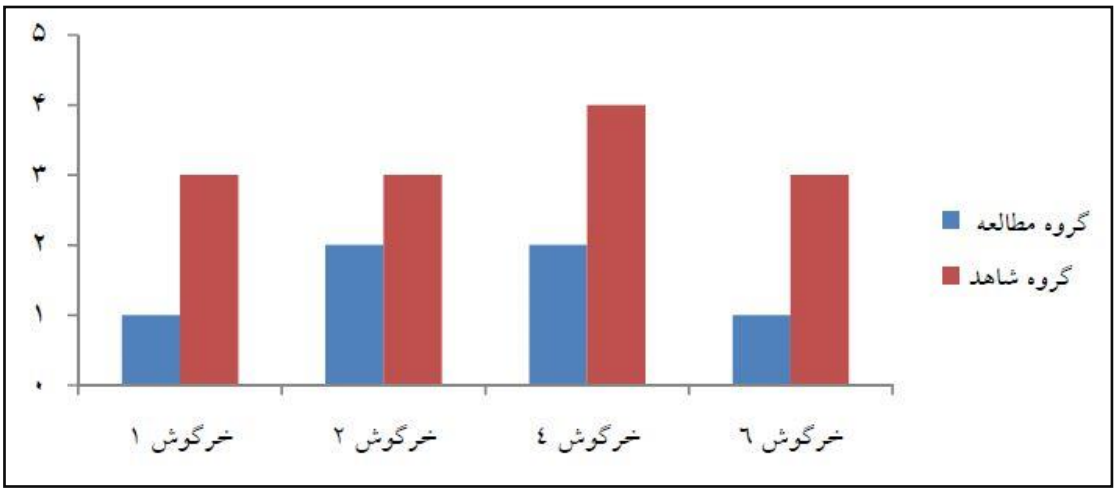
بر مبنای وجود سلول های بادکنکی و پرولیفراسیون سلول های اپی تلیال و فیبروز متاپلازیا، کاتاراکت در نمونه ها از یک مثبت تا چهار مثبت درجه بندی گردید.



نگاره ۵: مقاطع بافتی نمونه های گروه مطالعه در روز چهلم (رنگ آمیزی با هماتوکسیلین- ائوزین)



نگاره ۶: مقاطع بافتی نمونه های گروه شاهد در روز چهلم (رنگ آمیزی با هماتوکسیلین- ائوزین)



نمودار ۲: مقایسه نتایج آسیب شناسی در دو گروه شاهد و مطالعه

بحث:

تاکنون گزارش های مختلفی برای پیشگیری از کاتاراکت به روش غیر جراحی توسط محققین گزارش گردیده است. درمان کاتاراکت به روشی غیر از جراحی به صورت تجربی توسط تجویز مواد مختلف در موش و خرگوش گزارش شده است (۳، ۵، ۱۲ و ۱۸).

ادعاهایی در ارتباط با درمان کاتاراکت یا کاهش سرعت روند آن وجود دارد (۹ و ۲۰). یکی از موادی که تصور می شود به دلایل علمی در جلوگیری از ایجاد کاتاراکت موثر می باشد آنتی اکسیدان ها می باشند و تاکنون آنتی اکسیدان هایی مانند ویتامین E و اناستیل کارنوزین برای پیشگیری از کاتاراکت به کار رفته است (۴، ۵، ۹ و ۱۲).

برای ایجاد کاتاراکت در خرگوش ها، محلول سلنیت سدیم ۰/۱ درصد به میزان ۱ میلی گرم بازای هر کیلوگرم وزن بدن به خرگوش های بالغ و نابالغ بیش از ۷۰۰ گرم به صورت زیر جلدی تزریق شد و این مقدار هر ۴۸ ساعت یکبار برای دو بار دیگر تزریق شد (مجموعا ۳ بار و ۳ میلی گرم)، این میزان تزریق باعث شد که خرگوش ها زنده بمانند و کاتاراکت ایجاد شده به روش افتالموسکوپی و اسلیت لامپ بیومیکروسکوپی بررسی گردید. در همین روز دهم، افتالموسکوپی و اسلیت لامپ بیومیکروسکوپی شروع کاتاراکت را در چشم خرگوش ها تایید نمود این کاتاراکت از نوع کاتاراکت زیر کپسولی خلفی و کاتاراکت قشری خطی بود.

در این تحقیق پس از تایید کاتاراکت به روش افتالموسکوپی و اولتراسونوگرافی و اسلیت لامپ بیومیکروسکوپی، خرگوش ها به دو گروه تقسیم شدند. افزایش نشانه های کاتاراکت تا روز سیزدهم در هر دو گروه شاهد و مطالعه ادامه داشت که این وضعیت دلیل بر پیشرونده بودن کاتاراکت ایجاد شده در اثر تزریق زیر جلدی سلنیت سدیم می باشد.

از روز سیزدهم تا بیست و دوم کاهش روند کاتاراکت در هر دو گروه مطالعه و شاهد مشاهده گردید که به روش اولتراسونوگرافی این کاهش قابل تفسیر نبود ولی اسلیت لامپ بیومیکروسکوپی به طریق کیفی توانست تاثیر سیلیمارین را در کاهش روند کاتاراکت نسبت به گروه مطالعه را نشان دهد. این استدلال بر مبنای رویت انعکاس های خطی و تعداد آنها در گروه شاهد و مطالعه بود. بررسی های آسیب ایجاد کاتاراکت را در تمام خرگوش ها تایید نمود و توانست تفاوت قابل ملاحظه ای را بین گروه مطالعه و شاهد نشان دهد (نمودار ۲) ولی به علت کم بودن تعداد نمونه ها در هر گروه، معنی دار این اختلاف قابل توجه نبود.

References:

۱- قهرمانی احمد، ۱۳۶۲. فلور رنگی ایران. جلد نهم. موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع.

۲- ارجمند محسن، ۱۹۹۲، کلیات چشم پزشکی، صفحات ۶-۲۰.

3-Barger, J., Kowdley, K. (2003): is silymarin hepatoprotective in alcoholic liver disease? Journal of clinical gastroenterology. 37 (4): 278-279.

4-Gritz, D. C., Srinivasan, M., Smith, S. d., kim, U., Lietman, T. M., Wilkins, J. H., Priyadharshini, B., John, R. K., et al. (2006): The antioxidants in prevention of cataracts study: effects of antioxidant supplements on cataract progression in soth india. British Journal of Ophtalmology. 90: 847-851.

5-Haque, S.E., Gilani, K.M.(2005): Efeect of ambroxol, spirulina and vitamin E in naphthalene induced cataract in female rats. Indian Journal Physiol Pharmacol. 49 (1): 57-64.

6-Hogan, M.J., Zhang, C.Y., Hess, J.L., Bunce, G.E. (1992): Biochemical Changes and cataract formation in lenses from rats receiving multiple, low doses of sodium selenite. Exp Eye Res. 55: 671-678.

7-Huang LL, Hess JL and Bunce GE. DNA damage, repair, and replication in selenite-induced cataract in rat lens. *Curr. Eye Res.* (1990) 9: 1041-1050.

8-Hurby, K., Csomos, G., Furhnan, M. (1984): Chemotherapy of amonita phalloides poisoning with intravenous silibinin. Hum. Toxicol. Appl. Pharmacol. 73: 355-362.

9-Langade, D. G., Rao, G., Grime, R.C., Patki, P.S., Bulakh, P.M. (2006): In vitro prevention by ACE inhibtors of cataract induced by glucose. 38(2): 107-110.

10-Letteron, P., Labbe, G., Degott, C. (1990): Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride- induced lipid per oxidation and hepatotosicity in mice. Biochem. Pharmacol. 39: 2027-34.

11-Luper, S. (1998): A review of plants used in treatment of liver disease. Part 1. Med. Rev. 12:410-421.

12-Maggs, D. J., Miller P. E., Orfi, R. (2008): Slatters fundamentals of veterinary ophtha-lmology. 258-276.

13-Ostadalova, M., Babicky, A. (1978): Cataract induced by administration of sodium selenite to suckling rats. Experientia. 34: 222-223.

14-Preet, A., Gupta, P.l., Yadava, P.K., Baquer, N.Z. (2005): Efficacy of lower doses of vanadium in restoring altered glucose metabolism and antioxidant status in diabetic rat lenses. Journal biosci. 30(2): 221-230.

15-Shearer, T.R., Anderson, R.S., Britton, J.L. (1983): Influence of selenite and fourteen trace elements on cataratogenesis in the rat. Invest Ophtalmol Vios Sci. 24: 417-423.

16-Shearer, T.R., David, L.L., Anderson, R.S., Azuma, M. (1992): Review of selenite cataract. Curr Eye Res. 11: 357-369.

17-Slatter, D. (2000): Fundamental of veterinary ophthalmology. 14: 381-403.

18-Thomas, R., Shearer, T.R., Hong, M.A., Chiho, F.(1997): Selenite nuclear cataract: Review of the model. Molecular Vision 3: 8-13.

19 -Wang Z, Bunce B and Hess Jl. Selenite and Ca2+ haemostasis in the rat lens: effect of Ca-atpase and passive Ca2+ transport. *Curr. Eye Res.* (1993) 12: 213-218.

20-Zhao, J., Agawal, R. (1999): Tissue distri-bution of silibinin, the major active constituent of silymarin, in mice and its association with enhancement of phase II enzymes: Implications in cancer chemoprevention. Carcinogenesis. 8:17-32.