

# Experimental Animal Biology

Open Access

## ORIGINAL ARTICLE

### Anti-inflammatory Effects of Yttrium Oxide Nanoparticles on Liver Fibrosis in Rats

Fatemeh Danesh Pajooh<sup>1</sup>, Shahrbanoo Oryan<sup>1,2\*</sup>, Ramesh Ahmadi<sup>3</sup>, Pejman Mortazavi<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

<sup>2</sup>Department of Animal Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.

<sup>3</sup>Department of Animal Sciences, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University of Qom, Qom, Iran.

<sup>4</sup>Department of Pathology, Faculty of Specialized, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

#### Correspondence

Shahrbanoo Oryan

Email: [dr.f.daneshpajoo@gmail.com](mailto:dr.f.daneshpajoo@gmail.com)

#### ABSTRACT

Liver fibrosis is a reversible disease that can be caused by various causes of liver damage and ultimately lead to severe complications such as cirrhosis, liver cancer or even death. Traditional treatments have several limitations, including insufficient therapeutic effects and side effects. Since the internalization, penetration and delivery of drugs have been facilitated with the help of nanomedicine, therefore, the use of nanotechnology in targeted drug delivery to improve liver fibrosis seems to be a suitable option. Male Wistar rats weighing 200-250 g were randomly divided into 5 groups of 8: control (healthy rats), sham (healthy rats + K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), CCL<sub>4</sub> (liver fibrosis model rats), Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30 (healthy rats + 30 mg/kg Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) and CCL<sub>4</sub>+ Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30 (fibrotic rats + 30 mg/kg Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). After induction of liver fibrosis by CCL<sub>4</sub>, rats received Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> once daily for four weeks. At the end, the rats were anesthetized and blood was taken from the heart. A part of the liver samples was kept in 10% formalin and another part was kept at -80°C. Finally, oxidative stress markers (CAT, GPX, SOD and MDA) and liver enzyme levels (AST, ALT, ALP and GGT) were measured using ELISA method. Also, the expression of TGF-β and α-SMA genes in the liver was investigated by Real Time RT-PCR method. The use of 30 mg/kg of Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs did not have a favorable effect on regulating the levels of CAT, SOD, GPX, TGF-β and α-SMA, as well as MDA, AST, ALT, ALP and GGT in fibrotic rats. However, a significant improvement was observed in reducing liver tissue inflammation in CCL<sub>4</sub>+ Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30 group rats. The dose of 30 mg/kg of Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles did not have a favorable effect on the antioxidant and biochemical indices of the liver in order to reduce liver fibrosis. But its favorable effects were observed in the fibrotic liver tissue of mice treated with Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30, especially the reduction of inflammation.

#### KEY WORDS

Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs, Liver fibrosis, CCl<sub>4</sub>, TGF-β, α-SMA, nano particle, Ethereum oxide.

#### How to cite

Danesh Pajooh, F., Oryan, Sh., Ahmadi, R., & Mortazavi, P. (2023). Anti-inflammatory Effects of Yttrium Oxide Nanoparticles on Liver Fibrosis in Rats. *Experimental Animal Biology*, 12(45), 21-32.

نشریه علمی

## ژیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

### اثرات ضد التهابی نانوذرات اکسید ایتریوم بر فیبروز کبدی در موش صحرایی

فاطمه دانش‌پژوه<sup>۱</sup>، شهربانو عربان<sup>۱\*۲</sup>، رامش احمدی<sup>۳</sup>، پژمان مرتضوی<sup>۴</sup>

#### چکیده

از آنجایی که امروزه به کمک نانوپیزشکی درونی سازی، نفوذ و تحویل دارو تسهیل شده است به همین سبب استفاده از نانوتکنولوژی در داروسانی هدفمند جهت بهبود فیبروز کبدی گزینه مناسبی به نظر می‌رسد. موش‌های نر نژاد ویستان با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم به طور تصادفی به ۵ گروه ۸ تایی تقسیم شدند: کنترل (موش سالم)، شم (موش سالم + K3PO4)، CCL4، (موش‌های مدل فیبروز کبدی)، ۳۰ Y2O3 (موش سالم + ۳۰ میلی گرم/کیلوگرم Y2O3) و ۳۰ CCL4+ Y2O3 (موش فیروتیک + ۳۰ میلی گرم/کیلوگرم Y2O3). پس از القا فیبروز کبدی توسط CCL4، موش‌ها Y2O3 را یک بار در روز به مدت چهار هفته دریافت کردند. در پایان موش‌ها بیهوش شدند و خون‌گیری از قلب انجام شد. بخشی از نمونه‌های کبد در فرمالین ۱۰٪ و بخشی دیگر در دمای -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در نهایت، نشانگرهای استرس اکسیداتیو (CAT، GPX، SOD و MDA) و سطوح آنزیم‌های کبدی (AST، ALT و GGT) با استفاده از روش الایزا اندازه‌گیری شدند. همچنین بیان ژن‌های TGF- $\beta$  و  $\alpha$ -SMA در کبد نیز توسط روش Real Time RT-PCR بررسی گردید. استعمال دوز ۳۰ میلی گرم/کیلو گرم از Y2O3 NPs اثر مطلوبی بر تنظیم سطوح CAT، GPX، SOD، MDA، AST، ALP و GGT داشت. اما بهبودی SMA، و همچنین گرم از Y2O3 NPs تأثیر مطلوبی بر شاخص‌های آنتی اکسیدانی و بیوشیمیابی کبد در قابل توجهی در جهت کاهش التهاب در بافت کبد موش‌های گروه ۳۰ CCL4+ Y2O3 مشاهده شد. دوز ۳۰ میلی گرم/کیلوگرم نانوذره Y2O3 تأثیر مطلوبی بر شاخص‌های آنتی اکسیدانی و بیوشیمیابی کبد در جهت کاهش فیبروز کبدی نداشت. اما اثرات مطلوبی از آن در بافت کبد فیبروزی موش‌های تحت درمان با Y2O3 ۳۰ به ویژه کاهش التهاب مشاهده شد.

#### واژه‌های کلیدی

Y2O3 NPs، فیبروز کبدی، CCl4،  $\alpha$ -SMA، TGF- $\beta$ ، مدل فیبروز کبدی، نانوذره، اکسید ایتریوم.

نویسنده مسئول:

شهربانو عربان

ریالاتمه: dr.f.daneshpajoo@gmail.com

استناد به این مقاله:

دانش‌پژوه، فاطمه، عربان، شهربانو، احمدی، رامش و مرتضوی، پژمان (۱۴۰۲). اثرات ضد التهابی نانوذرات اکسید ایتریوم بر فیبروز کبدی در موش صحرایی. فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی، ۱۲(۴۵)، ۲۱-۳۲.

به طور کلی از مکانیسم‌های رفع فیبروز کبدی می‌توان به حذف عوامل آسیب‌رسان که باعث آسیب مزمن کبدی می‌شوند (Wang *et al.*, 2022)، حذف یا غیرفعال شدن میوفیبروبلاست‌ها، غیرفعال کردن پاسخ التهابی و القای مسیرهای ضد التهابی/ترمیمی (Shan *et al.*, 2022) و تخریب ماتریکس خارج سلولی (Ortiz *et al.*, 2021) اشاره نمود. فعال شدن سلول‌های ستاره‌ای کبدی (HSC) و مرگ سلول‌های کبدی و همچنین آزادسازی سایتوکین‌ها، کموکاین‌ها و التهاب، از دلایل اصلی فیبروز کبدی می‌باشند (Li *et al.*, 2021) که می‌تواند از طریق مسیرهای وابسته به Smad یا غیر Smad واسطه گری شود (Frangogiannis, 2020). افزایش تولید فاکتور رشد مبدل بتا (TGF- $\beta$ ) بیان آلفا اکتین عضله صاف ( $\alpha$ -SMA) و کلائزن 1  $\alpha$  را نیز افزایش می‌دهد (Li *et al.*, 2021) و می‌تواند باعث رسوب الیاف کلائزن و در نهایت فیبروز کبدی شود (Zhao *et al.*, 2020). امروزه، نانوذرات معدنی (NPs) به دلیل داشتن خواص فیزیکوشیمیایی منحصر به فرد خود، در زیست پژوهشی به رسمیت شناخته شده‌اند (Tee *et al.*, 2019) و تجویز نانوذاروها با میلیارد‌ها دوز در سراسر جهان به شیوه‌ای این روش رشد است (Athanasopoulou *et al.*, 2023). با توجه به این که اثرات درمانی بالقوه نانوذرات اکسید ایتریوم ( $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs) بر نارسایی شدید کبدی ثابت شده است از جمله اینکه گزارش شده است فعالیت ضد التهابی آن به واسطه مهار گونه‌های فعال اکسیژن سلولی می‌باشد (Song *et al.*, 2019). بنابراین استفاده از  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs در این پژوهش گزینه مناسبی به نظر می‌رسد. پژوهش تحقیقاتی حاضر به منظور ارزیابی اثرات  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs بر آنژیم‌های آتشی اکسیدانی، بیان ژن TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ -SMA، و بررسی میزان التهاب در کبد موش‌های فیبروزی ناشی از  $\text{CCl}_4$  انجام شد.

## مواد و روش‌ها

### مواد مورد نیاز

$\text{CCL}_4$  (سیگما-آلدریچ، ایالات متحده امریکا)،  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs (ایلیا صنعت آسان، ایران)، GPx (زل بایو، آلمان)، GGT (بایو رکس، فارس، ایران)، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، مالون دی آلدئید (CAT)، MDA و SOD، Zist Chem ALP و ALT (ایران)، آسپارتات ترانس آمیناز، آلانین ترانس آمیناز، و آکالالین فسفاتاز (به ترتیب AST، RNA و SYBR Green Real-Time cDNA؛ PCR Master Mix (همه از پارس طوس زیست فناور، ایران) و

### مقدمه

فیبروز کبدی یک پاسخ غیر طبیعی ترمیم زخم است که در اثر انواع آسیب‌های مزمن کبدی ایجاد می‌شود که با رسوب بیش از حد ماتریکس خارج سلولی (ECM) و هایپرپلازی غیرعادی بافت همبند مشخص می‌شود و در نهایت ممکن است به نارسایی، سیروز و یا سرطان کبد منجر شود (Tan *et al.*, 2021). این عارضه می‌تواند به دلایلی نظیر مصرف الكل، استاتوھپاتیت غیر الكلی (NASH)، هپاتیت ویروسی (HBV)، هپاتیت خود ایمنی، بیماری کبد چرب (NAFLD) غیر الكلی و بیماری‌های کبدی کلستاتیک ایجاد شود (Aydin & Akçalı, 2018). اگرچه قبلًا تصور می‌شد که فیبروز یک فرآیند برگشت ناپذیر است، اما امروزه شواهد به طور قانع کننده‌ای رفع فیبروز را با از بین رفتن علت آسیب در اندام‌های مختلف نشان می‌دهند (Tanaka *et al.*, 2021). بهبود فیبروز و بازگشت به ساختار طبیعی کد (Satilmis *et al.*, 2023) به دلیل توانایی بازسازی بالای این ارگان حیاتی می‌باشد (Miyajima, 2016 &) (Caligiuri *et al.*, 2020). در واقع افزایش ماتریکس فیبروتیک نتیجه عدم تعادل سنتر و تخریب ماتریکس خارج سلولی (ECM) است. یکی از مهم‌ترین اجزای کبدی، سلول‌های کوپفر (ماکروفاژهای ساکن کبد) هستند. از جمله ظایاف اصلی آنها می‌توان به پاکسازی ذرات، کمپلکس‌های ایمنی، گلبول‌های قرمز پیر و اندوتوكسین‌ها اشاره نمود. علاوه بر این، سلول‌های کوپفر در پاسخ ایمنی ذاتی نیز نقش دارند و سایتوکین‌های پیش التهابی مانند اینترلوکین ۱ و ۶ IL-1 و IL-6، فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا- (TNF- $\alpha$ ) و اینترفرون‌ها را تولید می‌کنند (Tanwar *et al.*, 2020)، به همین سبب افزایش تعداد سلول‌های کوپفر را می‌توان یکی از نشانه‌های التهاب در بافت کبد دانست. از طرف دیگر در مطالعات *in vivo* گزارش شده تحریک طولانی مدت سایتوکین‌های التهابی به دنبال قرار گرفتن مداوم در معرض مواد سمی کبدی، نظیر تراکلرید کرین (CCl<sub>4</sub>) می‌تواند سلول‌های ستاره‌ای کبدی (HSCs) را فعال کند (Guyot *et al.*, 2006). HSC‌ها سلول‌های فیبروبلاست اولیه تولید کننده ماتریکس خارج سلولی هستند که با آسیب مزمن کبدی برای تمایز به میوفیبروبلاست‌ها (MFs) فعال می‌شوند و مقادیر زیادی از پروتئین‌های ECM به ویژه کلائزن I، II و III، فیبرونکتین و پروتئوگلیکان‌ها را ترشح می‌کنند. میوفیبروبلاست‌ها با بیان اکتین ماهیچه صاف-آلfa ( $\alpha$ -SMA) مشخص می‌شوند (Hermansyah *et al.*, 2021).

سانتی گراد گرمادیده شد. سپس رسوب توسط سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ دور در دقیقه) جدا شد و در آون ۶۰ درجه به مدت ۲۴ ساعت خشک شد. در نهایت غلظت ۳۰ میلی گرم / کیلوگرم در سالین برای تزریق آماده شد.

### القای فیبروز کبدی در موش‌ها

فیبروز کبدی در موش‌های صحرایی با تزریق داخل صفاقی (IP) از  $\text{CCl}_4$  به مقدار ۲ دو میلی لیتر بر کیلوگرم (ریق شده در روغن زیتون؛ نسبت ۱:۱) دو بار در هفته به مدت چهار هفته ایجاد شد.

### گروه‌های آزمایشی

موش‌ها به طور تصادفی انتخاب و به پنج گروه مساوی ( $n=8$ ) تقسیم شدند. گروه کنترل به مدت چهار هفته به یک رژیم غذایی عادی دسترسی داشتند.

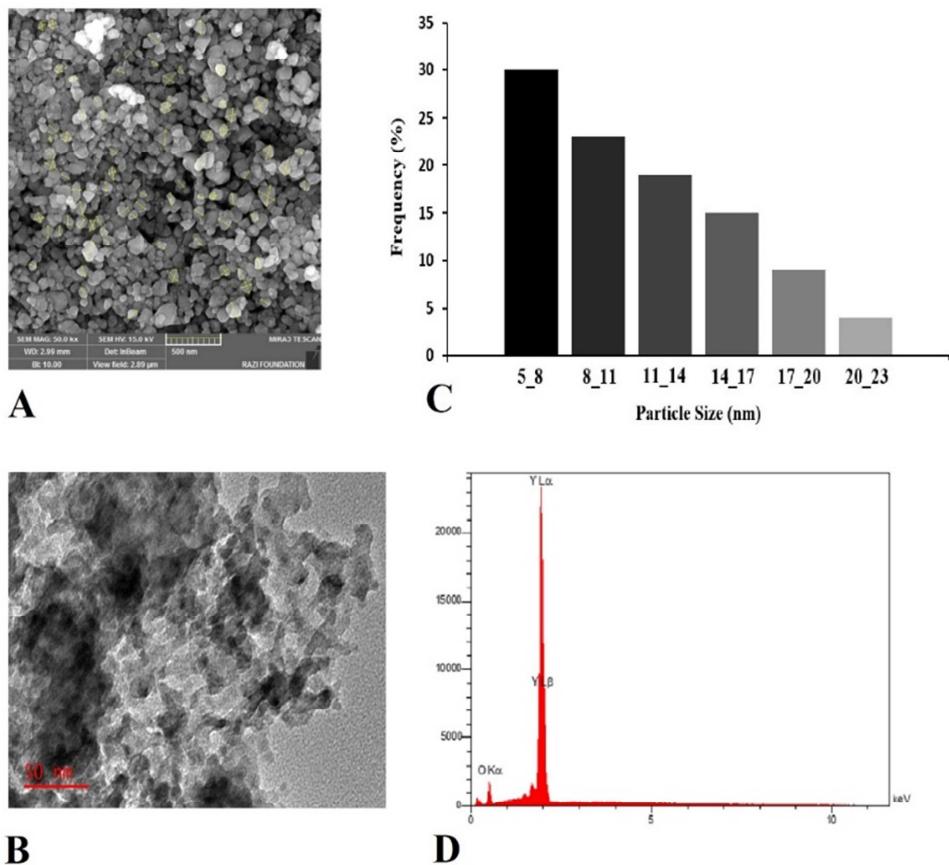
پرایمرهای (GAPDH، TGF- $\beta$ ،  $\alpha$ -SMA، پیشگام تهران، ایران) (پیشگام تهران).

### حیوانات

در این مطالعه از موش‌های صحرایی  $g\ 200-220$  گرمی ویستار ۸ تا ۱۰ هفته‌ای که از انستیتوی پاستور ایران (تهران) خریداری شدند استفاده شد. موش‌ها در شرایط استاندارد با دمای ۲۱ درجه سانتیگراد در ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی با دسترسی آزاد به غذا و آب به مدت دو هفته سازگار شدند. نگهداری و کار با جوانات مطابق با دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران انجام شد.

### $\text{Y}_2\text{O}_3$ NPs طرز تهیه

ابتدا ۱۰ گرم از  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs به ۵۰۰ میلی لیتر  $\text{K}_3\text{PO}_4$  با غلظت ۲۰ درصد اضافه شد و به مدت ۶ ساعت در دمای ۸۰ درجه



شکل ۱. ویژگی‌های  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs از تصاویر SEM و (C) توزیع اندازه NPs Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> مربوطه (D).

انجام شد. رونویسی معکوس RNA کل به DNA مکمل (cDNA) مطابق با پروتوكول کیت ستنت RT-PCR انجام شد. سپس جهت به دست آوردن اعداد CT برای محاسبه بیان ژن‌ها و واکنش‌های کمی Real-time RT-PCR از کیت مستر میکس ریل تایم حاوی رنگ سایبرگرین مطابق با دستورالعمل شرکت مذکور استفاده شد. در این آزمایش GAPDH به عنوان ژن هاسکبینگ و گروه کنترل بود. در نهایت، محاسبه نتایج بر اساس روش  $\Delta\Delta^{CT}$ -2 انجام شد.

**جدول ۱.** پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه برای تجزیه و تحلیل واکنش PCR

Gene	Size (bp)	Forward Sequence	Reverse Sequence
$\alpha$ -SMA	334	GTTTGAGACCTTCAATGTCCC	CGATCTCACGCTCAGCAGTGA
TGF- $\beta$	239	GACTCTCCACCTGCAAGACC	GGACTGGCGAGCCTAGTTT
GAPDH	234	GATGCTGGTGTGAGTATGTCG	GTGGTCAGGATGCATTGCTGA

### رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) و تری کروم ماسون (MTC)

جهت بررسی‌های هیستوپاتولوژیک بافت کبد، پس از انجام مراحل فیکس بافت، نمونه‌ها در سیدهای مخصوص به صورت محصور در پارافین قالب‌گیری شدند. پس از برش گیری نمونه‌ها توسط دستگاه میکروتوم، بر روی لام‌ها قرار گرفتند. در نهایت لام‌ها مطابق با دستورالعمل‌های رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و تری کروم ماسون رنگ آمیزی شدند. نهایتاً بافت‌های کبدی رنگ آمیزی شده توسط یک آسیب‌شناس متخصص در آزمایش با استفاده از میکروسکوپ نوری Leica DM500 (ایالات متحده آمریکا) مورد مطالعه قرار گرفت.

### تجزیه و تحلیل آماری

تمامی نتایج عددی با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۰، ۲۰۲۰) و نتایج بافتی توسط نرم افزار ImageJ 1.52v مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای تجزیه تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یکطرفه ANOVA و پس آزمون توکی استفاده شد. داده‌های کمی به دست آمده به صورت مقادیر Mean $\pm$ SE ارائه داده شد. سطح معنی‌داری نتایج P $<$ 0.05 در نظر گرفته شد. ترسیم نمودارها توسط نرم افزارهای Microsoft Excel 2013 انجام شد.

موش‌های گروه شم ۱ میلی‌لیتر از محلول K3PO4، به صورت داخل صفاقی روزانه به مدت چهار هفته دریافت کردند. گروه CCL4 شامل مدل فیبروز کبدی بود. گروه Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30 NPs Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs به مدت چهار هفته تزریق داخل صفاقی از CCL4+Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30 (۳۰ میلی گرم / کیلوگرم) دریافت کردند. گروه Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs از (۳۰ میلی گرم / کیلوگرم) نیز بعد از الفا فیبروز کبدی به صورت روزانه و به مدت چهار هفته تزریق داخل صفاقی از Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs (۳۰ میلی گرم / کیلوگرم) دریافت کردند. ۲۴ ساعت پس از آخرین درمان، موش‌ها با کاتامین ۱۰ درصد و زایلازین ۱ درصد بیهوش شدند. نمونه خون جمع‌آوری شده از قلب، به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاهی نگهداری و سپس سانتریفیوژ شد (با دور ۵،۰۰۰، ۱۵ دقیقه). برای اندازه‌گیری سطح آنزیم کبدی، سرم جمع‌آوری شد. کبدها بعداً برداشته شدند و با آب نمک شسته شدند. جهت انجام مطالعات بافت‌شناسی، یک تکه از کبد در فرمالین ۱۰٪ نگهداری شد و سپس بقیه در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد برای تجزیه و تحلیل پیش‌رفته منجمد شد.

### سنجهش شاخص‌های استرس اکسیداتیو

پس از همگن سازی بافت‌های کبد منجمد، مخلوط به دست آمده با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد تا مایع رویی به دست آید. سپس سطوح شاخص‌های استرس اکسیداتیو، از جمله کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX)، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و مالون دی الید (MDA)، طبق پروتوكل توصیه شده توسط Zellbio ELISA reader (آلمان) اندازه‌گیری شد.

### سطح آنزیم‌های کبدی

سطح ALT و AST با استفاده از آتوانالایزر (هیتاجی ۹۱۷، ژاپن) و آنزیم GGT توسط کیت Biorex (فارس، ایران) مطابق با دستورالعمل‌های ارائه شده توسط سازنده اندازه‌گیری شد.

### سنجهش بیان ژن‌های TGF- $\beta$ و $\alpha$ -SMA و توسط Time RT-PCR

برای جداسازی RNA کل، از معرف YTzol مطابق با پروتکل سازنده کیت (پرستو زیست فناور) استفاده شد. سپس روش کمی سازی بر روی نمونه‌های استخراج شده توسط اسپکتروفوتومتر Thermo Scientific NanoDrop 2000C (ایالات متحده)

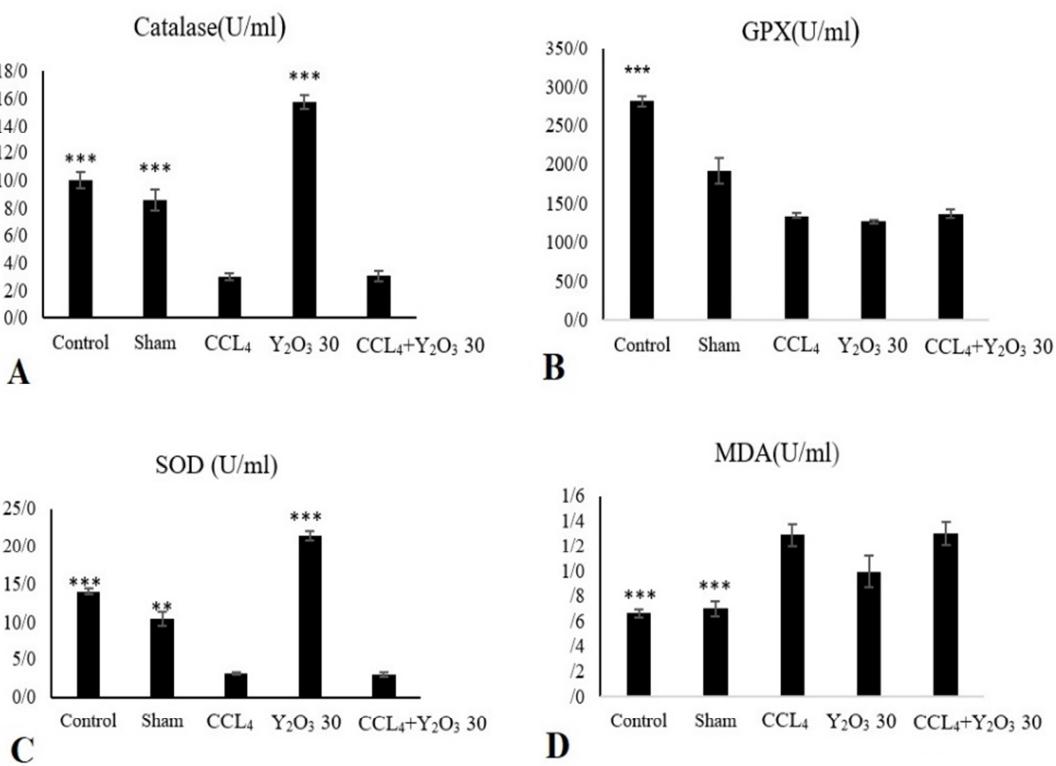
### آنالیز بیوشیمیایی سطوح سرمی آنزیم‌های AST، ALT و GGT

فعالیت AST، ALT و GGT به طور قابل ملاحظه‌ای در گروه CCL<sub>4</sub> در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت ( $P<0.05$ ) و به ترتیب، شکل ۳، A و D). فعالیت ALT، AST و GGT به طور قابل ملاحظه‌ای در گروه CCL<sub>4</sub> در مقایسه با گروه شم افزایش یافت ( $P<0.001$ ) و به ترتیب، شکل ۳، B و C). کاهش سطوح ALT، AST و GGT در موش‌های Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30 نسبت به گروه CCL<sub>4</sub> مشخص شد ( $P<0.05$ ) و به ترتیب، شکل ۳، A و C). اما تفاوت معنی‌داری بین سطوح ALT، AST و GGT بین گروه CCL<sub>4</sub> و Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30 مشاهده نشد (شکل ۳، D). همچنین کاهش معنی دار سطوح ALT، AST و GGT در گروه Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30 نسبت 30 CCL<sub>4</sub>+Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> مشاهده شد ( $P<0.05$ ) و به ترتیب، شکل ۳، A و C ( $P<0.001$ ).

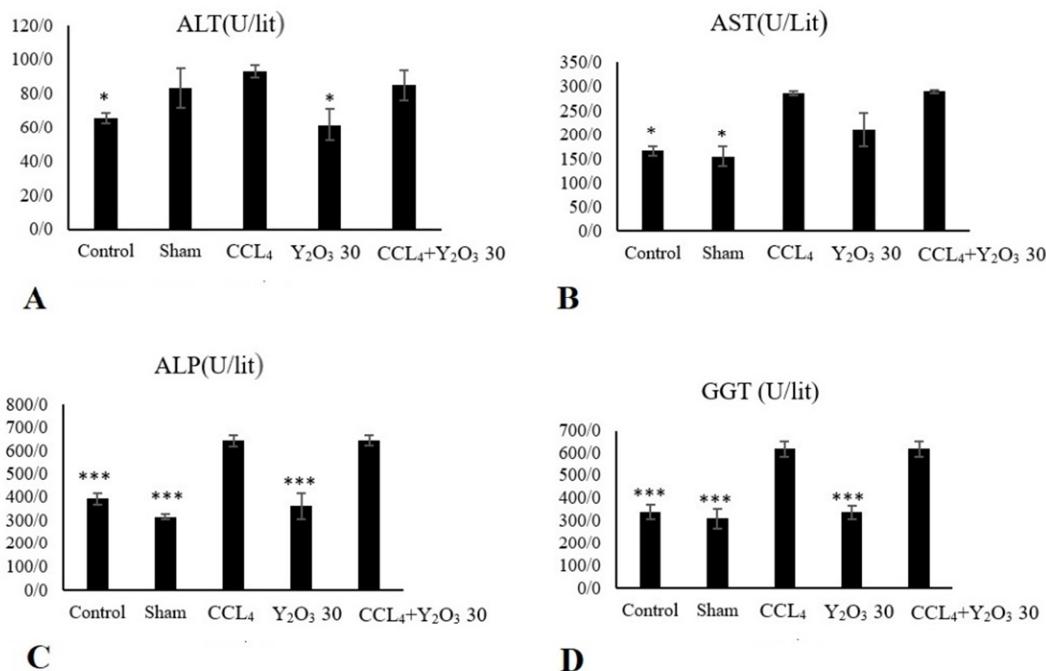
### نتایج

#### تجزیه و تحلیل استرس اکسیداتیو کبدی

فعالیت CAT، SOD و GPX به طور قابل ملاحظه‌ای در گروه CCL<sub>4</sub> در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت ( $P<0.001$ ) (شکل ۲، A و C). همچنین فعالیت SOD و GPX به طور قابل ملاحظه‌ای در گروه CCL<sub>4</sub> در مقایسه با گروه شم کاهش یافت ( $P<0.01$  و  $P<0.001$ ) (شکل ۲، B و D). افزایش در سطوح CAT، SOD و GPX در موش‌های Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30 نسبت به گروه CCL<sub>4</sub> مشخص شد ( $P<0.001$ ) (شکل ۲، A و C). اما تفاوت معنی‌داری بین سطوح GPX بین گروه Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30 و CCL<sub>4</sub>+Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30 موس‌ها نیز در مشاهده نشد. علاوه بر این، سطح سرمی MDA نسبت به گروه CCL<sub>4</sub> در مقایسه با گروه کنترل و شم افزایش یافت ( $P<0.001$ ). از سویی سطح سرمی MDA موش‌های CCL<sub>4</sub>+Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30 و Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30 معنی دار نبود (شکل ۲).



شکل ۲. نمودارهای بررسی فعالیت شاخص‌های آنتی اکسیدانی (A)، CAT (B)، GPX (C)، SOD (D) و MDA (E) در بافت کبد موش در گروه‌های مختلف. گروه‌های آزمایشی شامل کنترل (موس سالم)، گروه شم (موس سالم Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30+ K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> میلی گرم/کیلوگرم)، CCL<sub>4</sub> (موس مدل فیبروز کبدی)، Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30 (موس سالم Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30+ میلی گرم/کیلوگرم). نمودار مقادیر SE ± mean را نشان می‌دهد ( $n=8$ ).  $P<0.01^{***}$  در مقایسه با گروه CCL<sub>4</sub>+Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30 و  $P<0.001^{***}$  در مقایسه با گروه CCL<sub>4</sub>.



**شکل ۳.** آنالیز بیوشیمیایی سطوح سرمی آنزیم‌های (A)، ALT (B)، ALP (C) و GGT (D) در گروههای مختلف. گروههای آزمایش شامل کنترل (موس سالم)، گروه شم (موس سالم K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>+)، CCL<sub>4</sub> (موس مدل فیبروز کبدی)، Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30 (موس سالم میلی گرم بر کیلوگرم)، CCL<sub>4</sub>+Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30 (موس مدل فیبروز کبدی 30+ میلی گرم بر کیلوگرم). نمودار مقادیر در مقایسه با گروه CCL<sub>4</sub> و P<0.001\*\*\* در مقایسه با گروه CCL<sub>4</sub> و P<0.05\* در مقایسه با گروه Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30. SE ± mean

مطالعه قرار گرفتند. در کبد موس‌های بیمار، تغییرات مورفولوژیکی شدیدی نظیر مشاهده بافت کبد به حالت جوز هندی، بالونینگ سلول‌های هپاتوسیت و افزایش سلول‌های کوپفر در سینوزوئیدها (فلش‌های سیاه) در مقایسه با حیوانات سالم به وضوح مشاهده شد (شکل ۵، C-M). در نمونه‌های بافتی کبد موس‌های گروه کنترل و شم ورید پورت، ورید مرکز لوبولی، سینوزوئیدها و هپاتوسیت‌ها به حالت نرمال بودند، همچنین تجمعی از سلول‌های التهابی مشاهده نشد (شکل ۵، A-L). در گروهی که در گروه ۳۰ NPs Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30 دریافت کرده بودند فضای داخلی سینوزوئیدها تاحدودی کاهش یافته بود اما التهاب و نارسایی خاصیدر بافت کبد مشاهده نشد (شکل ۵، D-N). نهایتاً اینکه نمونه‌های کبد موس‌های گروه CCL<sub>4</sub>+Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30 بهبودی بیشتری نسبت گروه CCL<sub>4</sub> داشتند، به طوری که ساختار سینوزوئیدها به حالت طبیعی نزدیک تر شده بود و همانطور که در تصویر مشخص شده میزان التهاب (به واسطه کاهش تعداد سلول‌های کوپفر) کمتر شده است (شکل ۵، E-O).

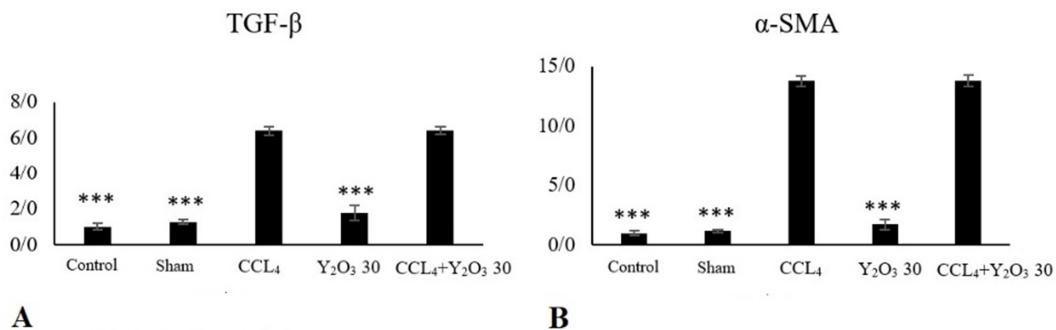
### تجزیه و تحلیل بیان mRNA ژن‌های α-SMA و TGF-β

#### کبدی

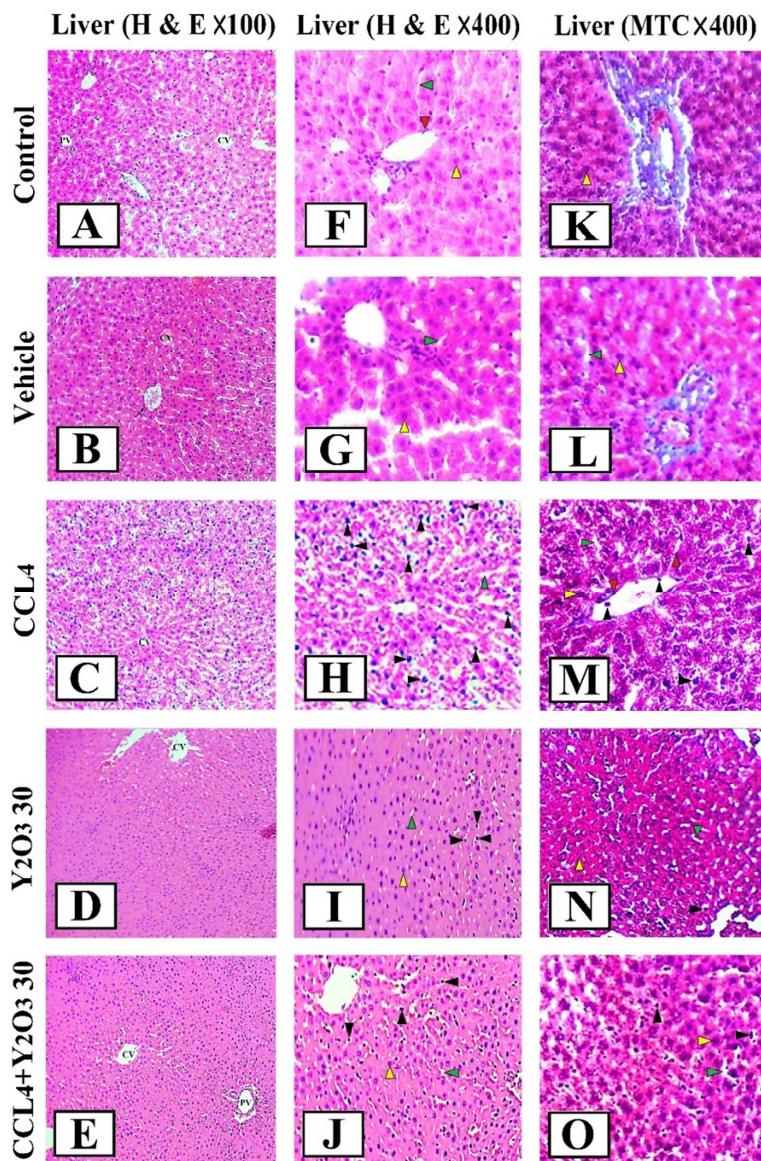
در این روش میزان بیان mRNA ژن‌های α-SMA و TGF-β به روش Real Time RT-PCR در بافت کبد مورد سنجش قرار گرفت. بررسی‌ها نشان دادند فعالیت α-SMA به طور قابل ملاحظه‌ای در گروه CCL<sub>4</sub> در مقایسه با گروه کنترل و شم افزایش یافت (P<0.001، شکل ۴، A و B). کاهش سطوح TGF-β و α-SMA در موس‌های Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30 نسبت به گروه CCL<sub>4</sub> مشخص شد (P<0.001، شکل ۴، A و B). همچنین کاهش معنی دار سطوح α-SMA و TGF-β در گروه Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30 نسبت CCL<sub>4</sub>+Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30 مشاهده شد (P<0.001، شکل ۴، A و B). اما تفاوت معنی داری بین سطوح CCL<sub>4</sub>+Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 30 و α-SMA و TGF-β مشاهده نشد (شکل ۴، A و B).

### تجزیه و تحلیل رنگ‌آمیزی H&E و تری کروم ماسون

تمامی نمونه‌ها توسط پاتولوژیست بررسی شدند و مورد



شکل ۴. آنالیز بیان ژن‌های (A) TGF- $\beta$  و (B)  $\alpha$ -SMA mRNA در بافت کبد موش‌های گروه‌های آزمایشی شامل کنترل (موش سالم)، گروه شم (موش سالم  $K_3PO_4+$  موش مدل فیبروز کبدی)،  $Y_2O_3$  30 (موش سالم  $Y_2O_3$  30+ گرم بر کیلوگرم)،  $CCL_4+Y_2O_3$  30 (موش مدل فیبروز کبدی  $Y_2O_3$  30+ گرم بر کیلوگرم). نمودار مقادیر SE  $\pm$  mean در مقایسه با گروه  $CCL_4$  گرم بر کیلوگرم. نمودار مقادیر  $P<0.001^{***}$ . (n=8).



شکل ۵. رنگ‌آمیزی نمونه بافت‌های کبد به روش هماتوکسیلین-اوزین (H & E) و تری کروم ماسون (MTC) ( $10\times$  و  $40\times$ ) در گروه‌های مختلف. ورید مرکز لوبولی (CV)، ورید پورت (PV)، سینوزوئید (فلش سبز)، سلول‌های اندوتلیال دیواره عروق (فلش قرمز)، سلول‌های هپاتوسیت (فلش زرد)، سلول‌های کوپفر (فلش سیاه).

هاپرترووفی و سمیت کبدی از منظر بیولوژیکی از جمله مهم‌ترین دلایل افزایش آنزیم‌های کبدی ALT و ALP هستند (Sakboonyarat *et al.*, 2023). در مطالعه *in vivo* *in vitro* تا به امروز، اثرات افزایش ترنس آمینازها و ترنسفراز ارتباط مستقیمی با فیروز کبدی ناشی از تجویز  $\text{CCl}_4$  دارد. در واقع افزایش آنزیم‌های بیوشیمیایی پتانسیل  $\text{CCl}_4$  را برای القای فیروز کبدی پس از تزریق نشان داده است (Zhang *et al.*, 2019; Abdelghffar *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2019). اخیراً، گزارش‌هایی مبنی بر تنظیم آنزیم‌های کبدی به جهت استعمال  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs گزارش شده است، که نشان دهنده اثرات محافظتی این نانوذره به عنوان یک مهار کننده رادیکال‌های آزاد، آنتی اکسیدان و عامل ضد آپوپتوز است (Song *et al.*, 2019). در نتیجه می‌توان گفت کاهش فعالیت آنزیم‌ها آسیب سلول‌های کبدی، فیروز و واکنش‌های التهابی را معکوس می‌کند (Moosavy *et al.*, 2023). بر اساس نتایج مطالعه حاضر، سطح سرمی آنزیم‌های ALT و GGT در گروه دریافت کننده  $\text{Y}_2\text{O}_3$  کاهش معنی‌داری نشان داد. اما تعییر معنی‌داری در سطوح آنزیم‌های AST، ALP و  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs و GGT بین گروه‌های فیروز کبدی دریافت کننده  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs و گروه مشاهده نشود. این مشاهدات اثرات نجات سلولی ناشی از دریافت دوز ۳۰ میلی گرم/کیلوگرم  $\text{Y}_2\text{O}_3$  را در مدل فیروز کبدی رد کرد.

شواهد تأکید کرده‌اند که سیگنال دھی<sub>3</sub>/SMAD<sub>3</sub> TGF- $\beta$ 1/SMA با افزایش مکرر  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs بهبود آنژیومیک را در مدل موش  $\text{CCl}_4$  با خاصیت آنتی اکسیدانی در سطوح بالای  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs با خاصیت آنتی اکسیدانی در سطوح می‌توان اینگونه استنباط نمود (Sun *et al.*, 2019). یافته‌های ما نشان دادند که فیروز کبدی ناشی از  $\text{CCl}_4$  با افزایش قابل توجه بیان TGF- $\beta$  و  $\alpha$ -SMA و  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs می‌تواند نشان دهنده عدم اثر مهاری بر توانمندی را نداشت، که می‌تواند نشان دهنده عدم اثر مهاری بر فیروز کبدی موش‌های صحرایی گروه  $\text{CCl}_4$  باشد. فیروز TGF- $\beta$  کبدی ناشی از  $\text{CCl}_4$  را می‌توان با سرکوب سیگنالینگ  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs بهبود بخشید (Sun *et al.*, 2019). نشان داده شده است که  $\text{Y}_2\text{O}_3$  به عنوان عامل سازگار با سلول، آنتی اکسیدان و ضد التهاب است، همچنین می‌توانند استرس اکسیداتیو، پاسخ التهابی و متعاقباً آسیب کبدی را کاهش دهد (Ribera *et al.*, 2019). اما یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs نمی‌تواند برای تعدیل بیان TGF- $\beta$  و  $\alpha$ -SMA در فیروز کبد با این دوز تاثیر گذار باشد.

## بحث و نتیجه‌گیری

بسیاری از مطالعات *in vitro* و *in vivo* تا به امروز، اثرات بیولوژیکی  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs، از جمله فعالیت آنتی اکسیدانی (Kassem *et al.*, 2022) ضد آپوپتوزیک (Ghaznavi *et al.*, 2015)، ضد التهابی (Tang, 2021)، ضد باکتری (Rajakumar *et al.*, 2021) و همچنین کاهش استرس اکسیداتیو را گزارش کرده‌اند (Khaksar *et al.*, 2017). مطالعه حاضر برای اولین بار به بررسی اثرات درمانی  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs بر فیروز کبد در موش‌های صحرایی می‌پردازد. CAT، SOD و GPX به عنوان شاخص‌های مهم سیستم‌های آنتی اکسیدانی درون زا و مسئول از بین بردن رادیکال‌های آزاد در نظر گرفته می‌شوند (Gusti *et al.*, 2021). با توجه به نتایج پژوهش حاضر، کاهش قابل توجهی در فعالیت CAT، SOD و GPX در موش‌ها مشاهده شد، که نشان دهنده آسیب جدی در بافت کبد ناشی از اثر  $\text{CCl}_4$  است (Mahmoodzadeh *et al.*, 2017). بررسی‌های ما همچنین اثرات فعالیت آنتی اکسیدانی را در موش‌های دریافت کننده  $\text{Y}_2\text{O}_3$  با افزایش قابل توجهی در فعالیت CAT و SOD نشان داد. این در حالی بود که، بهبودی معنی‌داری در سطوح آنژیومیک CAT، SOD و GPX پس از تجویز ۳۰ میلی گرم/کیلوگرم  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs در موش‌های صحرایی فیروزیک مشاهده نشد. بنابراین این می‌توان اینگونه استنباط نمود  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs با دوز ۳۰ میلی گرم/کیلوگرم خاصیت آنتی اکسیدانی چشمگیری در جهت بهبود آنژیومیک را در موش‌های مبتلا به فیروز کبدی را نداشت. هم راستا با نتایج مطالعه حاضر Kassem *et al.* (2022) فعالیت آنتی اکسیدانی قوی  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs در برابر رادیکال‌های هیدروکسیل و اکسیژن و همچنین کاهش غلظت پراکسید هیدروژن، نجات اثر آسیب ROS و کاهش غلظت MDA در گروه‌های تحت استرس محیطی را نشان دادند (Kassem *et al.*, 2022).

مطالعه حاضر افزایش قابل توجهی در غلظت MDA با تجویز  $\text{CCl}_4$  در موش‌ها نشان داد. در این راستا شوahد قابل توجهی نشان می‌دهند که تجویز  $\text{CCl}_4$  منجر به سطوح بالای آسیب اکسیداتیو کبد و همچنین افزایش قابل توجه تولید ROS و غلظت MDA در کبد می‌شود (Sergazy *et al.*, 2023). یافته‌های ما نشان دادند که سطوح سرمی MDA در موش‌های CCL4 تحت درمان با  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs به میزان قابل توجهی کاهش نیافت و در واقع دوز ۳۰ میلی گرم/کیلوگرم موثر نبود.

(Navaei-Nigjeh *et al.*, 2020). مطابق با یافته‌های هیستولوژیک می‌توان دریافت که  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs بر خلاف سایر داده‌های به دست آمده از این پژوهش می‌تواند در سطح بافتی موجب کاهش التهاب در بافت کبد فیبروزی موش‌ها شود، این مسئله می‌تواند به واسطه این باشد که اثرات ضدالتهابی  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs احتمالاً از طریق سایر فاکتورهای ضد التهابی واسطه گری شده باشد. بنابراین با توجه به نتایج مطلوب بافت شناسی و عدم سمیت  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs بر روی کبد در این آزمایش و سایر نتایج مطالعه مذکور احتمالاً استفاده از دوزهای بالاتر این دارو جهت بهبود التهاب و سایر پیامدهای ناشی از فیبروز کبدی موثر خواهد بود.

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که اثرات ۳۰ میلی گرم/کیلوگرم  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs در موش‌های فیبروزی ناشی از  $\text{CCL}_4$ ، توانمندی تنظیم سطوح فاکتورهای آنتی اکسیدانی، آنزیم‌های کبدی و بیان ژن‌های  $\text{TGF-}\beta$  و  $\alpha\text{-SMA}$  را در جهت بهبود و کاهش التهاب بافت کبد نداشت. اما شایان ذکر است استعمال  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs نه تنها هیچ سمیت بافتی در موش‌های سالم نداشت بلکه موجب کاهش التهاب و بهبودی بافت کبد موش‌های فیبروزی شد. به این ترتیب، مطالعات بیشتر جهت روشن شدن مکانیسم‌های دقیق‌تر با دوزهای بالاتر توصیه می‌شود.

## تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافعی توسط نویسنندگان وجود ندارد.

## REFERENCES

- Abdelghffar, E. A., Obaid, W. A., Alamoudi, M. O., Mohammedsaleh, Z. M., Annaz, H., Abdelfattah, M. A., & Sobeh, M. (2022). Thymus fontanesii attenuates  $\text{CCL}_4$ -induced oxidative stress and inflammation in mild liver fibrosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 148, 112738.
- Athanasiopoulou, F., Manolakakis, M., Vernia, S., & Kamaly, N. (2023). Nanodrug delivery systems for metabolic chronic liver diseases: advances and perspectives. *Nanomedicine*, 18(1), 67-84.
- Aydin, M. M., & Akçalı, K. C. (2018). Liver fibrosis. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 29(1), 14.
- Caligiuri, A., Gentilini, A., Pastore, M., Gitto, S., & Marra, F. (2021). Cellular and molecular mechanisms underlying liver fibrosis regression. *Cells*, 10(10), 2759.

بررسی‌های بافت شناسی این پژوهش نشان دادند که در موش‌های گروه  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs هیچ یک از حالات بالونینیگ، بافت جوز هندی و افزایش چشمگیر تعداد ماکروفازهای التهابی مشاهده نشد. هم راستا با این نتایج طی یک مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۹ با هدف بررسی اثرات سمی  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs به صورت خوراکی به مدت ۲۸ روز بر روی موش‌های آزمایشگاهی انجام شد مشخص شد که استفاده از دوز ۳۰ میلی گرم/کیلوگرم هیچ سمیتی در رت‌ها ایجاد نکرد (Panyala *et al.*, 2019). به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که استفاده این دوز می‌تواند برای سایر مطالعات بیولوژیک *in vivo* در رابطه با سایر بیماری‌ها کاربرد داشته باشد زیرا تا کنون سمیت کبدی بافتی از آن گزارش نشده است.

آنالیز نمونه‌های بافتی کبد بهبودی چشمگیری که گروه درمان ۳۰  $\text{CCL}_4 + \text{Y}_2\text{O}_3$  نسبت به گروه بیمار  $\text{CCL}_4$  داشتند را به خوبی نشان داد. در همین راستا کاهش سمیت چندین اندام توسط استعمال نانوذرات اکسید ایتریوم بر آسیب اکسیداتیو بافت‌های ناشی از دیازینون نیز گزارش شده است. مطابق با یافته‌های این پژوهش استفاده از  $\text{Y}_2\text{O}_3$  NPs به مدت دو هفته موجب تنظیم سطوح نشانگرهای استرس اکسیداتیو، نظریر گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، پراکسیداسیون لیپیدی (LPO)، مولکول‌های تیول کل (TTM) و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل شد. اندازه‌گیری نشانگرهای ذکر شده در مغز، قلب، ریه، کلیه، کبد و طحال نشان داد که تجویز این نانوذرات می‌تواند استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون را به میزان قابل توجهی کاهش دهد.

- Frangogiannis, N. G. (2020). Transforming growth factor- $\beta$  in tissue fibrosis. *Journal of Experimental Medicine*, 217(3).
- Ghaznavi, H., Najafi, R., Mehrzadi, S., Hosseini, A., Tekyemaroof, N., Shakeri-Zadeh, A., ... & Sharifi, A. M. (2015). Neuro-protective effects of cerium and yttrium oxide nanoparticles on high glucose-induced oxidative stress and apoptosis in undifferentiated PC12 cells. *Neurological research*, 37(7), 624-632.
- Gusti, A. M., Qusti, S. Y., Alshammary, E. M., Toraih, E. A., & Fawzy, M. S. (2021). Antioxidants-Related Superoxide Dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione-S-transferase (GST), and nitric oxide synthase (NOS) gene variants analysis in an obese population: A preliminary case-control study. *Antioxidants*, 10(4), 595.

- Guyot, C., Lepreux, S., Combe, C., Doudnikoff, E., Bioulac-Sage, P., Balabaud, C., & Desmoulière, A. (2006). Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo) fibroblastic cell subpopulations involved. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(2), 135-151.
- Hermansyah, D., Putra, A., Muhar, A. M., Wirastuti, K., & Dirja, B. T. (2021). Mesenchymal stem cells suppress TGF- $\beta$  release to decrease  $\alpha$ -SMA expression in ameliorating CCl4-induced liver fibrosis. *Medical Archives*, 75(1), 16.
- Kassem, S., Arafa, M. M., Yehya, M. M., & Soliman, M. A. (2022). In vivo study of dose-dependent antioxidant efficacy of functionalized core-shell yttrium oxide nanoparticles. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 395(5), 593-606.
- Kassem, S., Arafa, M. M., Yehya, M. M., & Soliman, M. A. (2022). In vivo study of dose-dependent antioxidant efficacy of functionalized core-shell yttrium oxide nanoparticles. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 395(5), 593-606.
- Khaksar, M. R., Rahimifard, M., Baeeri, M., Maqbool, F., Navaei-Nigjeh, M., Hassani, S., ... & Abdollahi, M. (2017). Protective effects of cerium oxide and yttrium oxide nanoparticles on reduction of oxidative stress induced by subacute exposure to diazinon in the rat pancreas. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 41, 79-90.
- Li, J., Zhang, J., Zhang, B., Chen, L., Chen, G., Zhu, D., ... & Duan, Y. (2021). rSjP40 inhibited the activity of collagen type I promoter via ets-1 in HSCs. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 765616.
- Li, X., Zhang, Q., Wang, Z., Zhuang, Q., & Zhao, M. (2022). Immune and Metabolic Alterations in Liver Fibrosis: A Disruption of Oxygen Homeostasis?. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 802251.
- Mahmoodzadeh, Y., Mazani, M., & Rezagholizadeh, L. (2017). Hepatoprotective effect of methanolic Tanacetum parthenium extract on CCl4-induced liver damage in rats. *Toxicology reports*, 4, 455-462.
- Moosavy, S. H., Eftekhar, E., Davoodian, P., Nejatizadeh, A., Shadman, M., Zare, S., & Nazarnezhad, M. A. (2023). AST/ALT ratio, APRI, and FIB-4 compared to FibroScan for the assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B in Bandar Abbas, Hormozgan, Iran. *BMC gastroenterology*, 23(1), 1-7.
- Navaei-Nigjeh, M., Daniali, M., Rahimifard, M., & Khaksar, M. R. (2020). Multi-organ toxicity attenuation by cerium oxide and yttrium oxide nanoparticles: Comparing the beneficial effects on tissues oxidative damage induced by subacute exposure to diazinon. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 8(3), 225-238.
- Ortiz, C., Schierwagen, R., Schaefer, L., Klein, S., Trepat, X., & Trebicka, J. (2021). Extracellular matrix remodeling in chronic liver disease. *Current tissue microenvironment reports*, 2, 41-52.
- Panyala, A., Chinde, S., Kumari, S. I., Rahman, M. F., Mahboob, M., Kumar, J. M., & Grover, P. (2019). Comparative study of toxicological assessment of yttrium oxide nano-and microparticles in Wistar rats after 28 days of repeated oral administration. *Mutagenesis*, 34(2), 181-201.
- Rajakumar, G., Mao, L., Bao, T., Wen, W., Wang, S., Gomathi, T., ... & Zhang, X. (2021). Yttrium oxide nanoparticle synthesis: an overview of methods of preparation and biomedical applications. *Applied Sciences*, 11(5), 2172.
- Ribera, J., Rodriguez-Vita, J., Cordoba, B., Portoles, I., Casals, G., Casals, E., ... & Morales-Ruiz, M. (2019). Functionalized cerium oxide nanoparticles mitigate the oxidative stress and pro-inflammatory activity associated to the portal vein endothelium of cirrhotic rats. *PLoS One*, 14(6), e0218716.
- Sakboonyarat, B., Pooviang, J., Lertsakulbunlue, S., Jongchedchootrakul, K., Srisawat, P., Mungthin, M., & Rangsin, R. (2023). Association between raised blood pressure and elevated serum liver enzymes among active-duty Royal Thai Army personnel in Thailand. *BMC Cardiovascular Disorders*, 23(1), 1-11.
- Satilmis, B., Akbulut, S., Sahin, T. T., Dalda, Y., Tuncer, A., Kucukakcali, Z., ... & Yilmaz, S. (2023). Assessment of Liver Regeneration in Patients Who Have Undergone Living Donor Hepatectomy for Living Donor Liver Transplantation. *Vaccines*, 11(2), 244.
- Sergazy, S., Shulgau, Z., Kamyshanskiy, Y., Zhumadilov, Z., Krivyh, E., Gulyayev, A., & Aljofan, M. (2023). Blueberry and cranberry extracts mitigate CCL4-induced liver damage, suppressing liver fibrosis, inflammation and oxidative stress. *Helijon*, 9(4).
- Shan, L., Wang, F., Zhai, D., Meng, X., Liu, J., & Lv, X. (2022). New drugs for hepatic fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 874408.
- Song, X., Shang, P., Sun, Z., Lu, M., You, G., Yan, S., ... & Zhou, H. (2019). Therapeutic effect of yttrium oxide nanoparticles for the treatment of fulminant hepatic failure. *Nanomedicine*, 14(19), 2519-2533.

- Song, X., Shang, P., Sun, Z., Lu, M., You, G., Yan, S., ... & Zhou, H. (2019). Therapeutic effect of yttrium oxide nanoparticles for the treatment of fulminant hepatic failure. *Nanomedicine*, 14(19), 2519-2533.
- Sun, X., Huang, X., Zhu, X., Liu, L., Mo, S., Wang, H., ... & Lin, J. (2019). HBOA ameliorates CCl4-induced liver fibrosis through inhibiting TGF- $\beta$ 1/Smads, NF- $\kappa$ B and ERK signaling pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 115, 108901.
- Sun, Y., Liu, B., Xie, J., Jiang, X., Xiao, B., Hu, X., & Xiang, J. (2022). Aspirin attenuates liver fibrosis by suppressing TGF- $\beta$ 1/Smad signaling. *Molecular Medicine Reports*, 25(5), 1-10.
- Tan, Z., Sun, H., Xue, T., Gan, C., Liu, H., Xie, Y., ... & Ye, T. (2021). Liver fibrosis: therapeutic targets and advances in drug therapy. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 730176.
- Tanaka, M., & Miyajima, A. (2016). Liver regeneration and fibrosis after inflammation. *Inflammation and Regeneration*, 36(1), 1-6.
- Tang, K.S. (2021). Antioxidant and anti-inflammatory properties of yttrium oxide nanoparticles: new insights into alleviating diabetes. *Current diabetes reviews*, 17(4), 496-502.
- Tanwar, S., Rhodes, F., Srivastava, A., Trembling, P.M., & Rosenberg, W.M. (2020). Inflammation and fibrosis in chronic liver diseases including non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C. *World journal of gastroenterology*, 26(2), 109.
- Tee, J. K., Peng, F., & Ho, H. K. (2019). Effects of inorganic nanoparticles on liver fibrosis: Optimizing a double-edged sword for therapeutics. *Biochemical pharmacology*, 160, 24-33.
- Wang, F. D., Zhou, J., & Chen, E. Q. (2022). Molecular mechanisms and potential new therapeutic drugs for liver fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 787748.
- Xu, F., Liu, C., Zhou, D., & Zhang, L. (2016). TGF- $\beta$ /SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 64(3), 157-167.
- Yang, L., Chen, L., Chang, Y., Wang, S., & Yang, C. (2016). Serological diagnosis of liver fibrosis by quantitative estimation of serum biomarkers using Luminex xMAP assay. *Int J Clin Exp Med*, 9(6), 11299-11305.
- Zhang, L., Liu, C., Yin, L., Huang, C., & Fan, S. (2023). Mangiferin relieves CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Scientific Reports*, 13(1), 4172.
- Zhao, F., Zhou, N., Wang, J. L., Zhou, H., Zou, L. Q., Zhong, W. X., ... & Wang, Y. X. J. (2020). Collagen deposition in the liver is strongly and positively associated with T1rho elongation while fat deposition is associated with T1rho shortening: an experimental study of methionine and choline-deficient (MCD) diet rat model. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 10(12), 2307.