

## اثر نانوفیتوزوم هسپرتین بر التهاب حاد القاء شده با کاراژینان در موش کوچک آزمایشگاهی: یک مطالعه تجربی

سیمین صادقی محلی<sup>۱</sup>، اکبر حاجی زاده مقدم<sup>۲</sup>، صدیقه خانجانی جلودار<sup>۳</sup>، وحید حسن تبار<sup>۴</sup>

دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۸/۰۳ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۱۴۰۴/۱۰/۰۷ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۱۴۰۵/۰۲/۱۶ پذیرش مقاله: ۱۴۰۵/۰۲/۲۰

### چکیده

**زمینه و هدف:** التهاب، پاسخی بیولوژیکی است که استرس اکسیداتیو در پیشرفت آن نقش دارد. فیتوزومها، نانوحاملهای لیپیدی هستند که می توانند فعالیت آنتی اکسیدانی پلی فنول ها نظیر هسپرتین را ارتقاء دهند. هدف این مطالعه، تعیین اثر ضدالتهابی نانوفیتوزوم هسپرتین در مدل التهاب حاد القاء شده با کاراژینان در موش های آزمایشگاهی کوچک بود.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی، ۳۵ موش کوچک آزمایشگاهی نر به پنج گروه هفت تایی تقسیم شدند: گروه کنترل هیچ دارویی دریافت نکردند. گروه دوم که برای ۱۴ روز نانوفیتوزوم هسپرتین را با دوز ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم به صورت خوراکی و حلال کاراژینان را به صورت تزریق در کف پا دریافت کرد. گروه سوم، کاراژینان ۱ درصد به صورت تزریقی در زیر پوست کف پا دریافت کرد. گروه چهارم و پنجم که ۱۴ روز پس از دریافت خوراکی هسپرتین و نانوفیتوزوم آن، کاراژینان را به صورت تزریق در کف پا دریافت کردند. جهت بررسی وضعیت التهابی از آزمون صفحه داغ استفاده شد. فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و نیز میزان گلوکاتایون و MDA اندازه گیری شد. داده ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey تجزیه و تحلیل شد.

**یافته ها:** نانوفیتوزوم هسپرتین کاهش تأخیر در پاسخ به درد را در مقایسه با کاراژینان افزایش داد. هسپرتین و نانوفیتوزوم آن توانستند موجب کاهش سطح MDA و افزایش سطح گلوکاتایون و افزایش فعالیت آنزیم های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز، در مقایسه با گروه دریافت کننده کاراژینان شوند ( $P<0/05$ ).

**نتیجه گیری:** مطالعه حاضر نشان داد احتمالاً نانوفیتوزوم هسپرتین اثرات ضد التهابی خود را از طریق تعدیل مسیر استرس اکسیداتیو اعمال کرده است.

**واژه های کلیدی:** التهاب، کاراژینان، هسپرتین، موش کوچک آزمایشگاهی، نانوفیتوزوم، استرس اکسیداتیو

**ارجاع:** صادقی محلی س، حاجی زاده مقدم ا، خانجانی جلودار ص، حسن تبار و. اثر نانوفیتوزوم هسپرتین بر التهاب حاد القاء شده با کاراژینان در موش کوچک آزمایشگاهی: یک مطالعه تجربی. سال ۱۴۰۵، دوره ۲۵، شماره ۲، صفحات: ۱۱۶-۱۰۳.

۱- کارشناسی ارشد فیزیولوژی، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

۲- (نویسنده مسئول) استاد گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

تلفن: ۰۱۱-۳۵۳۰۲۴۵۳، پست الکترونیکی: a.hajizadeh@umz.ac.ir

۳- استادیار گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

۴- دکتری شیمی پلیمر، گروه پلیمر، دانشکده شیمی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

## مقدمه

کاراژینان (Carrageenan; CRG) یک پلی ساکارید طبیعی به دست آمده از جلبک‌های قرمز است که به عنوان عامل ژل ساز برای پردازش مواد غذایی در صنعت مورد استفاده قرار می‌گیرد. کاراژینان به عنوان مواد زیستی برای اهداف مختلف دارویی مورد استفاده قرار گرفته است و فرمول دارویی را بهبود می‌بخشد و برای استفاده بالقوه از آن در برنامه‌های زیست پزشکی گسترده‌تر آزمایش شده است (۱، ۲). با این وجود، محققان هم‌چنین دریافته‌اند که این دسته از پلی ساکاریدها ممکن است اثرات بیولوژیکی نامطلوبی روی سیستم زنده مانند تحریک پاسخ‌های ایمنی ناخواسته، التهاب و جلوگیری از انعقاد خون ایجاد کند (۲). علائم اصلی التهاب، مانند ادم و پردردی بلافاصله پس از تزریق کاراژینان به پنجه عقب موش آزمایشگاهی، در نتیجه اثر عوامل پیش التهابی مانند برادی‌کینین، هیستامین، پروستاگلاندین‌ها، ترومبوسکان‌ها، اکسیژن فعال و غیره ایجاد می‌شوند که می‌تواند در محل آسیب یا با نفوذ به سلول‌ها ایجاد شود. واکنش‌های التهابی، عفونت‌ها یا آسیب بافتی باعث سنتز پروتئین‌های فاز حاد مانند پروتئین واکنشی C می‌شود که این ماده عمدتاً در کبد سنتز شده، اما ممکن است توسط سلول‌های التهابی موضعی در ناحیه آسیب بافتی نیز سنتز شود (۳). ادم پنجه ناشی از کاراژینان به عنوان شایع‌ترین مدل در تعیین فاز حاد التهاب استفاده می‌شود. حجم پنجه به عنوان شاخص اولیه التهاب در مطالعات انجام شده با کاراژینان ارزیابی می‌شود. مطالعات قبلی گزارش دادند که ادم پنجه، ۳-۴ ساعت پس از تزریق CRG به حداکثر رسیده است (۴). در پاتوفیزیولوژی بسیاری از فرآیندهای التهابی اختلالات اکسیداتیو از طریق تولید سیتوکاین‌های پیش التهابی و سرکوب سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی نقش دارد (۵). در اختلالات التهابی،

مالون دی آلدئید (Malondialdehyd; MDA) تولید شده توسط پراکسیداسیون لیپیدی، نشان‌گر مهم استرس اکسیداتیو است که در ایجاد التهاب دخیل می‌باشد (۶). در حالی که عوامل اصلی سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی نظیر سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون اثرات مفیدی در درمان ادم پنجه ناشی از کاراژینان دارند (۴). فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (Superoxid Dismutase; SOD) و سایر عوامل آنتی اکسیداتیو آنزیمی در شرایط شدید التهابی و استرس اکسیداتیو کاهش می‌یابد. علاوه بر این، گلوکاتایون (Glutation; GSH) به عنوان یک مولکول کاهنده غیر آنزیمی که رادیکال‌های آزاد را به دام می‌اندازد و از آسیب اکسیداتیو جلوگیری می‌کند نیز، در شرایط التهابی کاهش می‌یابد. نتایج مطالعات گذشته نشان می‌دهد که افزایش قابل توجهی در سطح MDA و هم‌چنین کاهش قابل توجهی در سطوح SOD و GSH در موش‌های تزریق شده با کاراژینان رخ می‌دهد (۵).

هسپرتین (۳،۷،۵-تری‌هیدروکسی-۴-متوکسی فلاوانون) عضوی از زیرگروه فلاونوئیدهای فلاوانون است و به میزان زیادی در مرکبات از جمله پرتقال و گریپ فروت و گوجه فرنگی و برخی گیاهان معطر مانند نعنا یافت می‌شود (۷). یافته‌های پیش بالینی و بالینی نشان می‌دهد که هسپرتین، هسپرتین و متابولیت‌های آنها دارای فعالیت‌های مختلف فیزیولوژیکی از جمله آنتی اکسیدان، ضد التهاب، کاهش چربی خون، ضد فشارخون، عروق محافظ و ضد آترواسکلروتیک هستند (۸).

عوامل متعددی مانند حالیت ضعیف در چربی، اندازه مولکولی نامناسب، تخریب در روده، پراکندگی زیاد در بدن، نیمه عمر پلاسمایی کمتر، پایداری ضعیف و ناکارآمدی برای رسیدن به بافت هدف، فعالیت زیستی پلی فنول‌ها را محدود می‌کند. بیشتر ترکیبات زیست فعال گیاهی مانند ترپنوئیدها، فلاونوئیدها،

گلیکوزیدهای فنولی و آنتوسیانین‌ها دارای طبیعت آبدوست هستند. این ماهیت مانع زیادی در جذب دارو ایجاد می‌کند، زیرا غشاء اجازه عبور مواد بسیار محلول در آب را از خود نمی‌دهد و در نهایت منجر به فراهمی زیستی ضعیف می‌شود. هسپرتین یک ماده فعال با حلالیت ضعیف در آب و فراهمی زیستی کم است. تشکیل پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی منجر به حلالیت ضعیف می‌شود که یکی از مهم‌ترین پارامترهای مؤثر بر فراهمی زیستی دارو است. علاوه بر این، حلقه C هسپرتین توسط آنزیم‌های باکتری روده تجزیه می‌شود. دلایل فوق دسترسی زیستی هسپرتین را کاهش داده و کاربرد بالینی آن را محدود می‌کند. بنابراین، افزایش حلالیت هسپرتین در آب، افزایش میزان جذب روده ای آن و بهبود فراهمی زیستی ضروری است. فیتوزوم‌ها به واسطه تشکیل کمپلکس مناسب با لیپیدها می‌توانند این فراهمی زیستی ضعیف را بهبود بخشیده و سبب جذب بهتر دارو شوند در مقایسه با سایر سامانه‌های نانودارورسانی، نانوفیتوزوم‌ها به دلیل تشکیل کمپلکس پایدار میان ترکیبات پلی‌فنولی و فسفولیپیدها، از زیست‌سازگاری مناسب، سمیت پایین، سهولت تهیه و توانایی بهبود جذب و فراهمی زیستی ترکیبات گیاهی برخوردار هستند (۹).

با توجه به خواص متعدد هسپرتین و نانوفیتوزوم در مقایسه با سایر سامانه‌های نانودارورسانی، در این مطالعه برای اولین بار شکل فرآوری شده هسپرتین به صورت فیتوزوم در مدل التهاب به منظور اثرات آنتی‌اکسیدانی آن بررسی می‌گردد. در واقع مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر نانوفیتوزوم هسپرتین بر التهاب حاد القاء شده با کارائینان در موش کوچک آزمایشگاهی انجام شد.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، تعداد ۳۵ موش آزمایشگاهی نر با وزن ۲۰ تا ۳۵ گرم از پژوهشکده انستیتو پاستور آمل تهیه و به حیوان‌خانه گروه زیست‌شناسی دانشگاه مازندران منتقل گردیدند. حیوانات در شرایط استاندارد شامل دمای ثابت ۲۴ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۵۰ درصد و چرخه نوری ۱۲ ساعته (روشنایی/تاریکی) و دسترسی آزاد به آب و غذای کافی نگهداری شدند. به منظور ایجاد سازگاری با شرایط جدید، آزمایش‌ها یک هفته پس از انتقال موش‌ها آغاز گردید. تمامی مراحل این پژوهش در سال ۱۴۰۱ بر اساس دستورالعمل کمیته اخلاق زیستی معاونت پژوهشی دانشگاه مازندران و با کد اخلاق IR.U.M.Z.REC.1401.003 اجرا شد.

حیوانات به پنج گروه هفت‌تایی تقسیم شدند. گروه کنترل: موش‌ها در این گروه هیچ‌گونه تیماری دریافت نکردند. گروه نانوفیتوزوم هسپرتین: نانوفیتوزوم هسپرتین دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را به مدت ۱۴ روز به صورت خوراکی دریافت کردند. گروه کارائینان: به منظور القاء التهاب، در ناحیه کف پا در پنجه عقبی چپ موش‌ها تزریق کارائینان ۱ درصد صورت گرفت. هسپرتین + کارائینان: هسپرتین ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را به مدت ۱۴ روز به صورت خوراکی دریافت کردند و در پایان کارائینان ۱ درصد در ناحیه کف پا در پنجه عقبی چپ هر موش تزریق شد. نانوفیتوزوم هسپرتین + کارائینان: نانوفیتوزوم هسپرتین ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را به مدت ۱۴ روز به صورت خوراکی دریافت کردند و در پایان کارائینان ۱ درصد در ناحیه کف پا در پنجه عقبی چپ هر موش تزریق شد. دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم هسپرتین و نانوفیتوزوم هسپرتین بر اساس مطالعات پیشین و نتایج حاصل از بررسی‌های قبلی که اثربخشی و ایمنی این دوز را نشان داده بودند، انتخاب شد (۱۰).

در ادامه به منظور بررسی پاسخ به درد و حرارت در پنجه عقبی پا، آزمون صفحه داغ انجام شد. دستگاه صفحه داغ شامل یک صفحه آلومینیومی است که با استفاده از جریان الکتریسیته تا دمای ثابت ۵۵ درجه سانتی‌گراد گرم می‌شود. برای اطمینان از حضور حیوانات در ناحیه گرم‌شده از یک استوانه شیشه‌ای استفاده گردید، با این حال حیوانات امکان حرکت آزادانه در فضای داخلی آن را داشتند. واکنش حرارتی به درد با ثبت زمان بلند کردن پا اندازه‌گیری شد و حداکثر زمان مجاز آزمون ۵۰ ثانیه در نظر گرفته شد. این آزمون برای هر حیوان به ترتیب در یک و سه ساعت پس از تزریق کاراژینان انجام شد (۱۱).

پس از اتمام آزمون‌های رفتاری، حیوانات سربریده شده و سپس بافت پنجه پای آن‌ها برای انجام آنالیزهای بیوشیمیایی جدا شد. نمونه‌ها تا پایان فرآیند برداشت در تانک نیتروژن مایع نگهداری شدند و پس از تکمیل جمع‌آوری، در فریزر درجه سانتی‌گراد ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردیدند. نمونه پنجه پای هر موش به همراه ۱ میلی‌لیتر بافر هموژن در میکروتیوب ریخته شد و با دستگاه هموژنایزر (IK- T18, Ultra Turrax, USA) همگن گردید. سپس نمونه‌ها در دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ (Sigma, Germeria) قرار گرفتند. در پایان، مایع شفاف رویی (سوپرناتانت) به دست آمده برای سنجش‌های بیوشیمیایی جدا شد (۱۲).

برای تعیین میزان غلظت پروتئین، آزمون برادفورد استفاده شد که میزان جذب نور در طول موج ۵۲۹ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر (PG Instrument, Germania) خوانده شد. برای ترسیم منحنی استاندارد از آلبومین سرم گاوی استفاده شد. میزان جذب نوری هر غلظت در طول موج ۵۹۵ نانومتر ثبت گردید و بر

اساس داده‌ها منحنی استاندارد ترسیم و شیب خط محاسبه شد (۱۳).

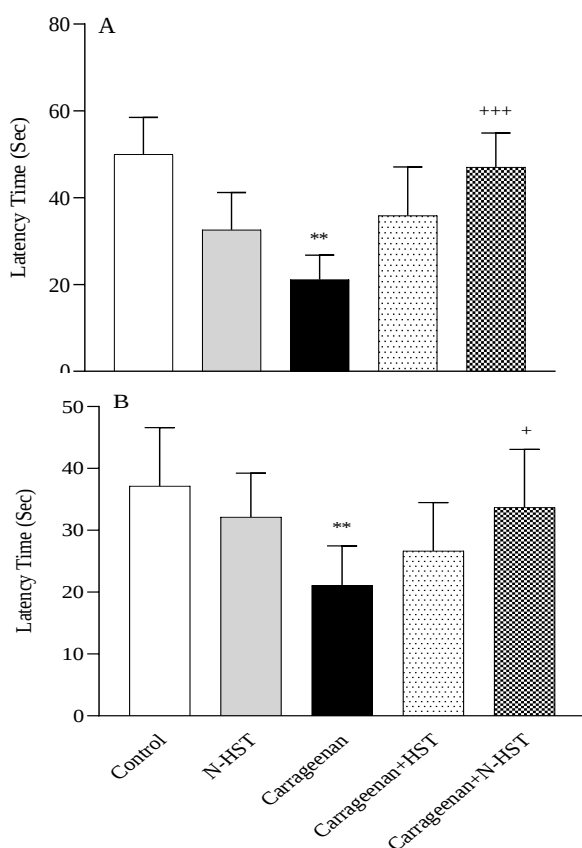
روش ایبی برای اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز مورد استفاده قرار گرفت. از مخلوط بافر سدیم فسفات (pH=۷) و غلظت ۵۰ میلی-مولار) با ۱۰ میلی‌مولار  $H_2O_2$  محلول واکنش تهیه شد. سپس ۶۰ میکرولیتر از سوپرناتانت به ۷۴۰ میکرولیتر محلول واکنش افزوده گردید و تغییر جذب نوری در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد (۱۴).

مطابق روش جنت، محلول بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) با ۰/۱۸ گرم اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (Ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA) و ۰/۰۳ گرم پیروگالول آماده شد. سپس به ۷۴۰ میکرولیتر از این محلول، ۶۰ میکرولیتر سوپرناتانت اضافه گردید و تغییر جذب نوری در طول موج ۴۲۰ نانومتر طی مدت ۲ دقیقه ثبت شد. فعالیت SOD بر اساس توانایی آن در مهار اکسیداسیون خودبه‌خودی پیروگالول محاسبه شد (۱۵).

برای اندازه‌گیری فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز با از روش Hritco استفاده شد. برای این منظور، مخلوط واکنشی شامل ۲۰۰ میکرولیتر سوپرناتانت، ۱ میلی‌لیتر سدیم آزید ۵ میلی‌مولار، ۱ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۰/۴ مولار با pH=۷، ۰/۴ میلی‌مولار EDTA و ۱ میلی‌لیتر بافر گلوکاتایون احیاء شده ۴ میلی‌مولار به کار گرفته شد. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه (Memert, Germeria) و سپس ۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۴ میلی‌مولار به مخلوط افزوده شد. پس از گذشت ۱ دقیقه، جذب نوری محلول برای مدت ۲ دقیقه ثبت گردید (۱۶).

دریافت کننده نانوفیتوزوم هسپرتین بصورت معنی داری در مقایسه با گروه کاراژینان افزایش یافت ( $P < 0.001$ ).

مطابق با نمودار ۱ (B)، مدت زمان تأخیر در پاسخ به درد در گروه کاراژینان پس از سه ساعت تزریق در مقایسه با کنترل کاهش قابل توجهی داشت ( $P = 0.007$ ). در حالی که گروه دریافت کننده نانوفیتوزوم هسپرتین در مقایسه با گروه کاراژینان افزایش قابل توجهی ( $P = 0.040$ ) در مدت زمان تأخیر از خود نشان داد.



نمودار ۱- بررسی مدت زمان تأخیر در آزمون صفحه داغ یک ساعت (A) و سه ساعت (B) پس از تزریق کاراژینان

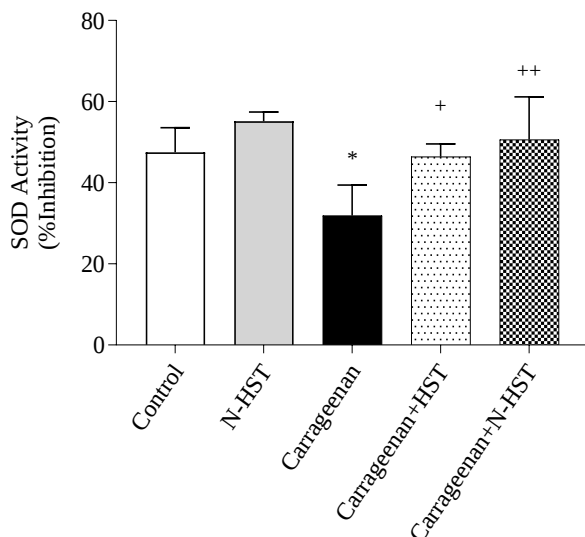
داده‌ها در هر ستون به صورت انحراف معیار  $\pm$  میانگین نمایش داده شده است. \*  $P < 0.01$  در مقایسه با گروه کنترل، +  $P < 0.05$  و \*\*\*  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه کاراژینان. (Control=کنترل، Carrageenan=کاراژینان، HST=هسپرتین ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم، N-HST=نانوفیتوزوم هسپرتین ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم).

برای انجام این آزمون، مخلوط واکنشی شامل ۲۰۰ میکرولیتر سوپرناتانت از بافت هموژن، ۱ میلی لیتر محلول ۶۷ درصد تری باربیتوریک اسید (Barbituric acid; TBA) و ۰/۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید (Trichloroacetic acid; TCA) بود که با هم ترکیب شدند و به مدت ۶۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی گراد با استفاده از بن ماری حرارت دیدند. پس از خنک شدن مخلوط برای ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد و سپس میزان جذب نوری در طول موج ۵۳۵ نانومتر توسط اسپکتوفتومتر ثبت گردید (۱۷). ۲۰۰ میکرولیتر از هر غلظت گلوکاتیون با ۱۳۰ میکرولیتر DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) ۰/۴ درصد و ۱۱۰۰ میکرولیتر بافر سدیم فسفات ۰/۲۵ مولار ( $pH=7.4$ ) با آب مقطر به حجم نهایی ۱۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد. با اندازه گیری جذب نوری در طول موج ۴۱۲ نانومتر، منحنی استاندارد تهیه شد. براساس شیب خط غلظت گلوکاتیون احیاء شده تعیین گردید (۱۸).

داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Prism نسخه ۸ تجزیه و تحلیل شد. نتایج به صورت "انحراف معیار  $\pm$  میانگین" گزارش شده است. به منظور ارزیابی نرمال بودن توزیع متغیرهای کمی مورد بررسی از آزمون Shapiro-Wilk استفاده شد. مقایسه بین میانگین گروه‌ها توسط آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey انجام شد. سطح معنی داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

## نتایج

بر اساس نمودار ۱ (A)، مدت زمان تأخیر در پاسخ به درد در گروه کاراژینان پس از یک ساعت نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری نشان داد ( $P = 0.005$ ). این تأخیر در پاسخ در گروه

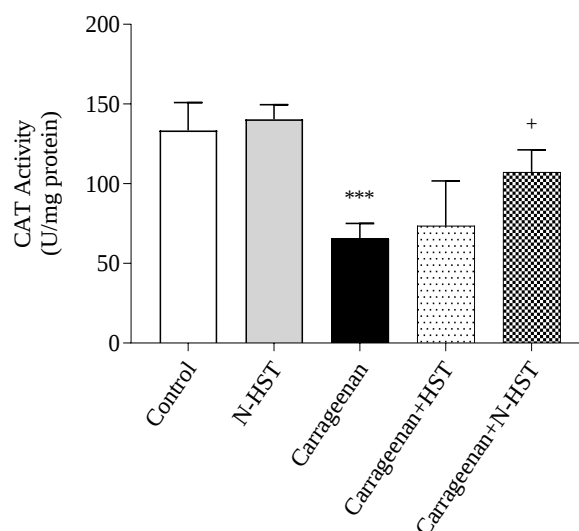


نمودار ۳- بررسی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بافت پنجه پای موش

داده‌ها در هر ستون به صورت انحراف معیار  $\pm$  میانگین نمایش داده شده است.  $P < 0.01$  \* در مقایسه با گروه کنترل،  $P < 0.05$  + و  $P < 0.01$  ++ در مقایسه با گروه کاراژینان. (Control=کنترل، Carrageenan=کاراژینان، HST=هسپرتین ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم، N-HST=نانوفیتوزوم هسپرتین ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم).

بر اساس نمودار ۴، فعالیت گلووتاتیون پراکسیداز در گروه کاراژینان کاهش قابل توجهی نسبت به گروه کنترل نشان داد ( $P < 0.01$ ). اما در فعالیت این آنزیم در گروه دریافت کننده نانوفیتوزوم هسپرتین در مقایسه با گروه کاراژینان افزایش معنی داری مشاهده شد ( $P < 0.01$ ). از طرفی دیگر، افزایش معنی داری در فعالیت این آنزیم در گروه دریافت کننده نانوفیتوزوم هسپرتین نسبت به گروه هسپرتین مشاهده گردید ( $P < 0.01$ ).

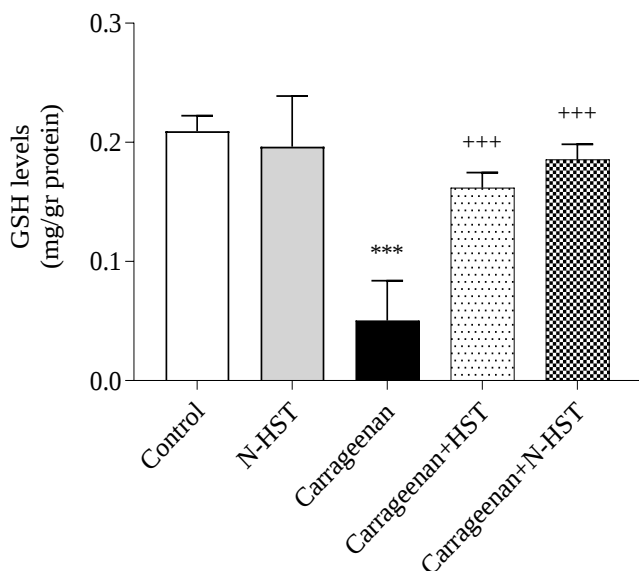
براساس نمودار ۲، فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه کاراژینان نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی داری داشت ( $P < 0.01$ ), در حالی که گروه دریافت کننده نانوفیتوزوم هسپرتین با  $P = 0.025$  افزایش قابل توجهی در فعالیت این آنزیم نشان داد.



نمودار ۲- بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت پنجه پای موش

داده‌ها در هر ستون به صورت انحراف معیار  $\pm$  میانگین نمایش داده شده است.  $P < 0.01$  \*\*\* در مقایسه با گروه کنترل،  $P < 0.05$  + در مقایسه با گروه کاراژینان. (Control=کنترل، Carrageenan=کاراژینان، HST=هسپرتین ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم، N-HST=نانوفیتوزوم هسپرتین ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم).

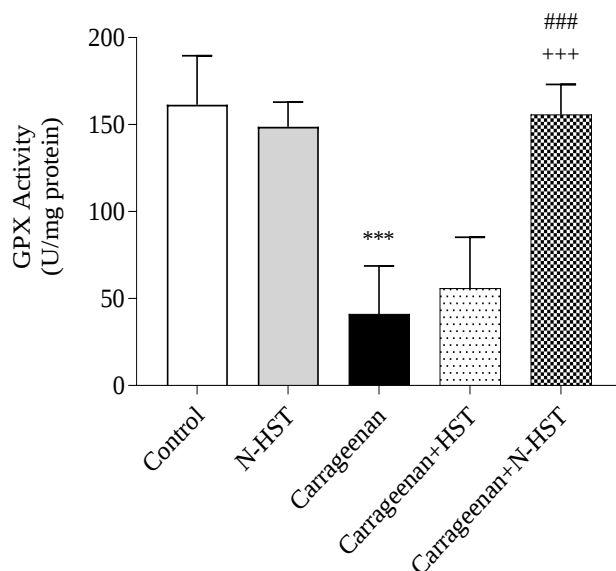
براساس نمودار ۳، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در گروه کاراژینان نسبت به گروه کنترل با کاهش قابل توجهی همراه بوده است ( $P = 0.030$ ). در حالی که در گروه دریافت کننده هسپرتین و نانوفیتوزوم هسپرتین فعالیت این آنزیم به ترتیب با ( $P = 0.040$ ) و ( $P = 0.008$ ) در مقایسه با گروه کاراژینان افزایش قابل توجهی نشان داد.



نمودار ۵- بررسی سطوح گلوکوتاتیون در بافت پنجه پای موش

داده‌ها در هر ستون به صورت انحراف معیار  $\pm$  میانگین نمایش داده شده است.  $P < 0.01$  \*\*\* در مقایسه با گروه کنترل،  $P < 0.01$  \*\*\* در مقایسه با گروه کاراژینان. (Control=کنترل، Carrageenan=کاراژینان، HST=هسپرتین ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم، N-HST=نانوفیتوزوم هسپرتین ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم).

براساس نمودار ۵، کاراژینان توانست سطح MDA را بطور معنی داری ( $P = 0.040$ ) نسبت به کنترل افزایش دهد، در حالی که سطح این فاکتور اکسیدانی در گروه دریافت کننده نانوفیتوزوم هسپرتین نسبت به گروه کاراژینان کاهش قابل توجهی یافت ( $P = 0.030$ ). علاوه بر این، گروهی که نانوفیتوزوم هسپرتین دریافت کردند نسبت به گروهی که هسپرتین دریافت کردند کاهش بارزتری نشان دادند ( $P = 0.020$ ).



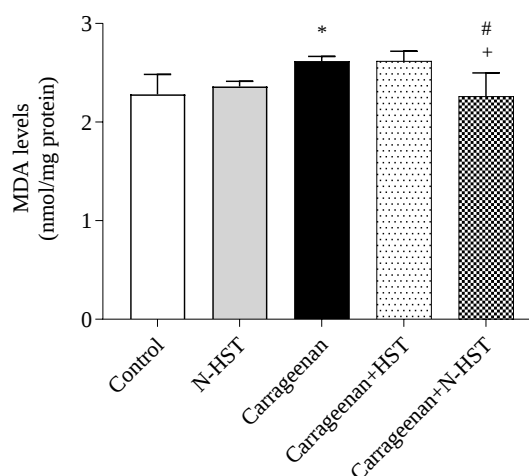
نمودار ۴- بررسی فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز در بافت پنجه پای موش

داده‌ها در هر ستون به صورت انحراف معیار  $\pm$  میانگین نمایش داده شده است.  $P < 0.01$  \*\*\* در مقایسه با گروه کنترل،  $P < 0.01$  \*\*\* در مقایسه با گروه کاراژینان،  $P < 0.01$  ### در مقایسه با گروه HST. (Control=کنترل، Carrageenan=کاراژینان، HST=هسپرتین ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم، N-HST=نانوفیتوزوم هسپرتین ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم).

براساس نمودار ۵، سطوح گلوکوتاتیون در گروه کاراژینان کاهش قابل توجهی نسبت به گروه کنترل داشت ( $P < 0.01$ ), در حالی که در هر دو گروه دریافت کننده هسپرتین و نانوفیتوزوم هسپرتین، سطوح گلوکوتاتیون با ( $P < 0.01$ ). در مقایسه با گروه کاراژینان با افزایش قابل توجهی همراه بوده است.

مدل التهاب کاراژینان دارای ماهیت دوفازی است که در مرحله نخست با آزادسازی هیستامین و سروتونین و در مرحله دوم با افزایش پروستاگلاندین‌ها، برادی‌کینین و تولید گونه‌های فعال اکسیژن / گونه‌های فعال نیتروژن (Reactive Oxygen Species / Reactive Nitrogen Species; ROS/RNS) مشخص می‌شود (۶). یافته‌های حاضر، به‌ویژه بهبود شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش MDA، نشان می‌دهد که هسپرتین و نانوفیتوزوم آن احتمالاً عمدتاً در فاز دوم التهاب از طریق مهار استرس اکسیداتیو و تعدیل مسیرهای وابسته به ROS/RNS نقش خود را اعمال می‌کنند. اگرچه مسیرهای مولکولی در این مطالعه به‌طور مستقیم بررسی نشدند، اما بر اساس شواهد پیشین می‌توان استنباط کرد که اثرات مشاهده‌شده با مهار مسیر NF- $\kappa$ B و سرکوب بیان COX-2 و iNOS و همزمان فعال‌سازی مسیر Nrf2/HO-1 مرتبط باشد؛ مکانیسم‌هایی که به کاهش تولید واسطه‌های التهابی و تقویت دفاع آنتی‌اکسیدانی منجر می‌شوند.

براساس نتایج حاصل از این بررسی رفتاری، نشان داده شده که کاراژینان مسبب کاهش مدت زمان تأخیر در پاسخ درد در این آزمون شده است که نشان دهنده ایجاد التهاب در پای موش‌ها تحت آزمایش می‌باشد. این در حالی است که هسپرتین و نانوفیتوزوم هسپرتین هردو با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با کاراژینان به میزان چشمگیری باعث افزایش مدت زمان تأخیر در آزمون رفتاری صفحه‌داغ شده و به نوعی توانایی خوبی در تحمل درد ناشی از التهاب از خود نشان داده‌اند که احتمالاً نشان دهنده کاهش التهاب و ادم در بافت پا می‌باشد. همسو با مطالعه حاضر نشان داده شد که تجویز کاراژینان می‌تواند سبب التهاب و پردردی گردد که به‌وسیله درمان‌های گیاهی و محصولات طبیعی از جمله هسپرتین این درد کاهش یافت. به‌عنوان مثال، مطالعه Baradaran و همکاران نشان داد که تزریق کاراژینان موجب کاهش مدت زمان تأخیر در آزمون صفحه‌داغ می‌شود.



#### نمودار ۶- بررسی سطوح MDA در بافت پنجه پای موش

داده‌ها در هر ستون به صورت انحراف معیار  $\pm$  میانگین نمایش داده شده است. \*  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه کنترل، +  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه کاراژینان، #  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه HST، (Control=کنترل، Carrageenan=کاراژینان، HST=هسپرتین ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، N-HST=نانوفیتوزوم هسپرتین ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم).

#### بحث

نتایج رفتاری و بیوشیمیایی پژوهش حاضر نشان داد که نانوفیتوزوم هسپرتین قادر است پردردی و استرس اکسیداتیو القاء شده توسط کاراژینان را به‌طور معنی‌داری کاهش دهد. کاهش مدت زمان تأخیر پاسخ درد در آزمون صفحه‌داغ پس از تجویز کاراژینان، مؤید القاء التهاب حاد در پای موش‌ها است، در حالی که درمان با هسپرتین و به‌ویژه نانوفیتوزوم هسپرتین در دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم موجب افزایش معنی‌دار تحمل درد شد که احتمالاً بازتابی از کاهش التهاب و ادم بافتی می‌باشد. التهاب به‌عنوان یک پاسخ دفاعی طبیعی، معمولاً با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن، آزادسازی واسطه‌های التهابی و فعال‌سازی مسیرهای آنزیمی نظیر سیکلوکسیژناز و نیتریک اکسید سنتتاز همراه است که این عوامل از طریق کاهش آستانه تحریک پایانه‌های عصبی درد، در ایجاد هیپرآلرژی نقش کلیدی دارند (۱۹-۲۲).

همچنین، تجویز خوراکی کورکومین و نانوفیتوزوم آن موجب افزایش مدت زمان تأخیر در این آزمون می شود (۲۳). همچنین، مطالعه Syed و همکاران بر روی نوروپاتی دیابتی نشان داد که تجویز هسپریدین با افزایش بیان و فعالیت  $SIRT_1$  که پروتئین محافظ در برابر استرس سلولی است باعث کاهش تولید ROS و تعدیل مسیرهای التهابی می شود. همچنین، درمان با هسپریدین موجب افزایش مدت زمان پاسخ به درد در تست صفحه داغ شد (۲۴). مطالعه Lee و همکارانش نشان داد که تجویز هیدروژل عصاره *Arnica montana* میزان پاسخ به درد را در آزمون صفحه داغ، در موش صحرایی مدل ادم ناشی از کاراژینان کاهش داد (۲۵). با توجه به خواص آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی مستند هسپرتین اما فراهمی زیستی محدود در فرم آزاد آن که کپسوله کردن آن در نانوفیتوزومها، پتانسیل درمانی آن را در برابر آسیب های التهابی و اکسیداتیو ناشی از کاراژینان تقویت می کند. نتایج بیوشیمیایی مطالعه حاضر نشان داد که کاراژینان موجب کاهش فعالیت آنزیم های کاتالاز، SOD و GPx و سطح GSH و افزایش MDA شده است که بیانگر بروز استرس اکسیداتیو است. در مقابل، درمان با هسپرتین و نانوفیتوزوم هسپرتین این تغییرات معکوس کرد و اثر نانوفیتوزوم در افزایش فعالیت GPx و کاهش MDA بارزتر بود. این برتری نسبی احتمالاً ناشی از بهبود زیست فراهمی و پایداری هسپرتین در قالب نانوفیتوزوم است، هرچند نبود داده های فارماکوکینتیکی مستقیم، تفسیر قطعی این مزیت را محدود می سازد. یافته های حاضر با مطالعات پیشین همسو است که نشان داده اند التهاب القاء شده با کاراژینان موجب کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می شود و ترکیبات فلاونوئیدی از جمله هسپرتین قادر به تعدیل این تغییرات هستند (۲۶).

در مطالعه Muhammad و همکاران که روی مدل حاد کلیوی القاء شده توسط لیپوپلی ساکارید انجام شد، مشخص شده است که

هسپرتین با بهبود بیان مولکول آداپتور اتصال کلسیم یونیزه ۱/پروتئین اسیدی فیبریلاری گلیال (Iba-1/GFAP) با واسطه گیرنده Toll-4 (TLR4) به طور قابل توجهی بیان سیتوکاین های التهابی را کاهش داد. به طور مشابه، هسپرتین تولید گونه های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی القاء شده توسط لیپوپلی ساکارید را کاهش داد و سطح پروتئین های آنتی اکسیدانی مانند فاکتور هسته ای اریترئوئید ۲-مرتبط با فاکتور ۲ (Nrf2) و هم-اکسیژناز (HO-1) را در مغز موش بهبود بخشید (۲۷). مطالعه Hajizadeh Moghadam و همکاران نشان داد که در گروه های بیمار تحت درمان با هسپرتین و نانوذرات هسپرتین (۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم به مدت چهار هفته به صورت خوراکی پس از تجویز کتامین)، سطوح GSH و نیز فعالیت آنزیم های کاتالاز، SOD، GRx و GPx افزایش یافته است و همچنین تجویز هسپرتین و نانوذرات آن سبب کاهش سطوح MDA نیز شد. هسپرتین و به ویژه نانوهسپرتین به دلیل اثرات آنتی اکسیدانی که از خود نشان داده اند، باعث محافظت کبدی در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از کتامین می شوند (۱۰). Polat و همکاران در مطالعه ای بر روی اثر هسپرتین بر وضعیت التهابی و اکسیداتیو در مدل کولیت تجربی القاء شده توسط تری نیتروبنزن سولفونیک اسید، نشان دادند که تجویز هسپرتین به طور قابل توجهی سطح MDA و عوامل پیش التهابی ( $TNF-\alpha$ ، IL-6 و NF- $\kappa$ B) را کاهش می دهد. همچنین، هسپرتین از طریق اثرات ضد التهابی و آنتی اکسیدانی در برابر مدل کولیت ناشی از تری نیتروبنزن سولفونیک اسید محافظت می کند (۲۸). اگرچه مدل کاراژینان به عنوان یک مدل کلاسیک التهاب محیطی شناخته می شود، اما پاسخ های التهابی می توانند منجر به فعال سازی مسیرهای درد مرکزی شوند؛ بنابراین، استفاده از آزمون Hot Plate در این مطالعه با هدف ارزیابی مؤلفه های مرکزی درد انجام شد. با این حال، عدم

ارزیابی مستقیم ادم پنجه به عنوان شاخص التهاب محیطی، یکی از محدودیت‌های مطالعه محسوب می‌شود.

با وجود این، تعمیم مستقیم نتایج این مطالعه از یک مدل التهاب حاد حیوانی به بیماری‌های التهابی مزمن انسانی باید با احتیاط انجام شود، زیرا تفاوت‌های گونه‌ای، ماهیت حاد مدل کارائینان و احتمال تجمع بافتی نانوذرات در اندام‌هایی مانند کبد و کلیه می‌توانند بر نتایج اثرگذار باشند. هم‌چنین، عدم اندازه‌گیری مستقیم سیتوکاین‌های پیش‌التهابی و نشانگرهای مولکولی مسیرهای سیگنالینگ از محدودیت‌های این پژوهش محسوب می‌شود. هم‌چنین، در این مطالعه گروه دریافت‌کننده نانوفیتوزوم خالی (فاقد هسپرتین) در طراحی آزمایش در نظر گرفته نشد؛ بنابراین، تفکیک کامل اثرات احتمالی نانوحامل از اثرات ماده مؤثره امکان‌پذیر نبود. هرچند هدف اصلی پژوهش حاضر مقایسه اثرات هسپرتین آزاد و نانوفیتوزوم هسپرتین در مدل التهاب القاشده با کارائینان بود، استفاده از گروه نانوفیتوزوم خالی در مطالعات آینده می‌تواند به تبیین دقیق‌تر سهم نانوحامل در اثرات مشاهده شده کمک کند. در مجموع، نتایج نشان می‌دهد که نانوفیتوزوم هسپرتین با تقویت اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی هسپرتین آزاد، پتانسیل بالاتری در کاهش پردردی و استرس اکسیداتیو القاء شده با کارائینان دارد، هرچند برای تبیین دقیق مکانیسم‌ها و ارزیابی قابلیت ترجمه بالینی، انجام مطالعات مولکولی، فارماکوکینتیکی و مدل‌های مزمن التهابی ضروری است.

## نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که نانوفیتوزوم هسپرتین می‌تواند به عنوان یک سامانه نوین دارورسانی با پتانسیل ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی، در کاهش آسیب‌های مرتبط با التهاب القاء شده با کارائینان مؤثر باشد. با این حال، عدم سنجش حجم ادم پنجه و فقدان ارزیابی بیومارکرهای التهابی، از جمله سیتوکاین‌ها، از

محدودیت‌های مهم این مطالعه محسوب می‌شود. علاوه بر این، عدم استفاده از گروه دریافت‌کننده نانوفیتوزوم خالی، تفسیر سهم مستقل نانوحامل در اثرات مشاهده شده را محدود می‌کند. از این‌رو، انجام مطالعات تکمیلی با بهره‌گیری از ارزیابی‌های عملکردی، بیوشیمیایی و مولکولی برای تعیین دقیق مسیرهای دخیل در اثرات زیستی نانوفیتوزوم هسپرتین و اعتبارسنجی قابلیت درمانی آن ضروری به نظر می‌رسد.

## تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از پایان‌نامه دانشجوی کارشناسی ارشد بوده است. از حمایت‌های معاونت محترم علمی پژوهشی دانشگاه مازندران صمیمانه سپاسگزاریم. هم‌چنین، نویسندگان مطالعه از دکتر فروزان صادقی محلی برای همکاری ایشان در این تحقیق تقدیر و تشکر می‌نمایند.

**تعارض در منافع:** بنا به اظهار نویسندگان این مطالعه تعارض منافع ندارد.

**حامی مالی:** نویسندگان حمایت مالی دریافت نکرده‌اند.

**ملاحظات اخلاقی (کد اخلاق):** این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه مازندران (IR.UMZ.REC.1401.003) تصویب شد.

## مشارکت نویسندگان

- طراحی ایده: اکبر حاجی زاده مقدم
- روش کار: وحید حسن تبار
- جمع‌آوری داده‌ها: سیمین صادقی
- تجزیه و تحلیل داده‌ها: صدیقه خانجانی جلودار
- نظارت: اکبر حاجی‌زاده مقدم
- مدیریت پروژه: صدیقه خانجانی جلودار
- نگارش - پیش‌نویس اصلی: سیمین صادقی
- نگارش - بررسی و ویرایش: اکبر حاجی زاده مقدم، صدیقه خانجانی جلودار

## References

1. Mirzaei A, Esmkhani M, Zallaghi M, Nezafat Z, Javanshir S. Biomedical and environmental applications of carrageenan-based hydrogels: a review. *J Polym Environ* 2023; 31(5): 1679-705.
2. Shafie MH, Kamal ML, Zulkiflee FF, Hasan S, Uyup NH, Abdullah S, et al. Application of carrageenan extract from red seaweed (Rhodophyta) in cosmetic products: a review. *J Indian Chem Soc* 2022; 99(9): 100613.
3. McCarson KE, Fehrenbacher JC. Models of inflammation: carrageenan- or complete Freund's adjuvant-induced edema and hypersensitivity in the rat. *Curr Protoc* 2021; 1(7): e202.
4. Mehrzadi S, Khalili H, Fatemi I, Malayeri A, Siahpoosh A, Goudarzi M. Zingerone mitigates carrageenan-induced inflammation through antioxidant and anti-inflammatory activities. *Inflammation* 2021; 44(1): 186-93.
5. Abd-Allah AAM, El-Deen NAMN, Mohamed WAM, Naguib FM. Mast cells and pro-inflammatory cytokines roles in assessment of grape seeds extract anti-inflammatory activity in rat model of carrageenan-induced paw edema. *Iran J Basic Med Sci* 2018; 21(1): 97-104.
6. El-Shitany NA, Eid BG. Icariin modulates carrageenan-induced acute inflammation through HO-1/Nrf2 and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Biomed Pharmacother* 2019; 120: 109567.
7. Jo SH, Kim ME, Cho JH, Lee Y, Lee J, Park YD, et al. Hesperetin inhibits neuroinflammation on microglia by suppressing inflammatory cytokines and MAPK pathways. *Arch Pharm Res* 2019; 42(8): 695-703.
8. Scoditti E. Neuroinflammation and neurodegeneration: the promising protective role of the citrus flavanone hesperetin. *Nutrients* 2020; 12(8): 2336.
9. Alharbi WS, Almomen A, Alshammari A, Alharbi KS, Alsharif AM, Alshehri S. Phytosomes as an emerging nanotechnology platform for the topical delivery of bioactive phytochemicals. *Pharmaceutics* 2021; 13(9): 1475.
10. Hajizadeh Moghadam A, Parhizkar M, Sirafi R, Khanjani Jelodar S. Therapeutic effects of hesperetin and nano-hesperetin on ketamine-induced hepatotoxicity. *J Med Plants* 2019; 18(72): 149-59.
11. Emik U, Unal Y, Arslan M, Demirel CB. The effects of memantine on recovery, cognitive

- functions, and pain after propofol anesthesia. *Braz J Anesthesiol* 2016; 66(5): 485-91.
12. Bigdeli MR, Rasoulia B, Meratan AA. In vivo normobaric hyperoxia preconditioning induces different degrees of antioxidant enzymes activities in rat brain tissue. *Eur J Pharmacol* 2009; 611(1-3): 22-9.
  13. Olson BJ, Markwell J. Assays for determination of protein concentration. *Curr Protoc Pharmacol* 2007; 38(1): A.3A.1-A.3A.29.
  14. Antharavally BS, Mallia KA, Rangaraj P, Haney P, Bell PA. Quantitation of proteins using a dye-metal-based colorimetric protein assay. *Anal Biochem* 2009; 385(2): 342-5.
  15. Genet S, Kale RK, Baquer NZ. Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: effect of vanadate and fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). *Mol Cell Biochem* 2002; 236(1-2): 7-12.
  16. Hritcu L, Ciobica A. Intranigral lipopolysaccharide administration induced behavioral deficits and oxidative stress damage in laboratory rats: relevance for Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 2013; 253: 25-31.
  17. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In: Packer L, editor. *Methods in Enzymology*. Vol 186. New York: Academic Press; 1990. p. 407-21.
  18. Fukuzawa K, Tokumura A. Glutathione peroxidase activity in tissues of vitamin E-deficient mice. *J Nutr Sci Vitaminol* 1976; 22(5): 405-7.
  19. Zadeh-Ardabili PM, Rad SK. Anti-pain and anti-inflammation-like effects of Neptune krill oil and fish oil against carrageenan-induced inflammation in mice models. *Biotechnol Rep* 2019; 22: e00341.
  20. Mert T, Sahin E, Yaman S, Sahin M. Pain-relieving effectiveness of Co-treatment with local tramadol and systemic minocycline in carrageenan-induced inflammatory pain model. *Inflammation* 2018; 41(4): 1238-49.
  21. Rauf A, Abu-Izneid T, Rashid U, Alhumaydhi FA, Bawazeer S, Khalil AA, et al. Anti-inflammatory, antibacterial and toxicological profile of dimeric naphthoquinones from *Diospyros lotus*. *Biomed Res Int* 2020; 2020: 7942549.
  22. Kuedo Z, Sangsuriyawong A, Klaypradit W, Tipmanee V, Chonpathompikunlert P. Effects of astaxanthin from *Litopenaeus vannamei* on carrageenan-induced edema and pain behavior in mice. *Molecules* 2016; 21(3): 382.
  23. Baradaran S, Hajizadeh Moghaddam A, Khanjani Jelodar S, Moradi-Kor N. Protective effects of curcumin and its nano-phytosome on carrageenan-induced inflammation in mice model: behavioral and biochemical responses. *J Inflamm Res* 2020; 13: 45-51.

24. Syed AA, Reza MI, Yadav H, Gayen JR. Hesperidin inhibits NOX4-mediated oxidative stress and inflammation by upregulating SIRT1 in experimental diabetic neuropathy. *Exp Gerontol* 2023; 172: 112064.
25. Lee SG, Lee EB, Kim HJ, Park YS, Lee JH, Kim SJ, et al. Anti-inflammatory and pain-relieving effects of Arnica extract hydrogel patch in carrageenan-induced inflammation and hot plate pain models. *Pharmaceutics* 2025; 17(2): 171.
26. Chai J, Liu J, Tian M, Liao H, Wu J, Xie J, et al. Multiple mechanistic action of brevinin-1FL peptide against oxidative stress effects in an acute inflammatory model of carrageenan-induced damage. *Oxid Med Cell Longev* 2022; 2022: 2615178.
27. Muhammad T, Ikram M, Ullah R, Rehman SU, Kim MO. Hesperetin attenuates LPS-induced neuroinflammation, apoptosis and memory impairments by modulating TLR4/NF- $\kappa$ B signaling. *Nutrients* 2019; 11(3): 648.
28. Polat FR, Karaboga I, Polat MS, Erboga Z, Yilmaz A, Guzel S. Effect of hesperetin on inflammatory and oxidative status in trinitrobenzene sulfonic acid-induced experimental colitis model. *Cell Mol Biol* 2018; 64(11): 58-65.

# The Effect of Hesperetin Nanophytosome on Carrageenan-Induced Acute Inflammation in Mice: An Experimental Study

Simin Sadeghi Mahali<sup>1</sup>, Akbar Hajizadeh Moghaddam<sup>2</sup>, Sedigheh Khanjani Jelodar<sup>3</sup>, Vahid Hasantabar<sup>4</sup>

Received: 25/10/25

Sent for Revision: 28/12/25

Received Revised Manuscript: 06/04/26

Accepted: 10/05/26

**Background and Objectives:** Oxidative stress plays a critical role in the progression of inflammatory responses. Phytosomal delivery systems, as lipid-based nanocarriers, offer a potent strategy to augment the antioxidant activity of polyphenolic compounds like hesperetin. This study was designed and conducted to evaluate the anti-inflammatory effects of hesperetin nano-phytosome in a carrageenan-induced acute inflammation model in small laboratory mice.

**Materials and Methods:** In this experimental study, 35 male small laboratory mice were randomly divided into five groups (n=7): the control group received no treatment; the second group received hesperetin nano-phytosome orally at a dose of 20 mg/kg for 14 days and carrageenan vehicle via intraplantar injection; the third group received a subplantar injection of 1% carrageenan; and the fourth and fifth groups received oral hesperetin and hesperetin nano-phytosome for 14 days, followed by carrageenan injection. Inflammatory pain was evaluated using the hot plate test. At the end of the experiment, antioxidant enzyme activities, as well as glutathione and malondialdehyde levels, were measured. Data were analyzed using one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test.

**Results:** Hesperetin nano-phytosome significantly increased pain response latency compared with the carrageenan group. Both hesperetin and its nano-phytosome significantly reduced malondialdehyde levels and increased glutathione levels as well as the activities of catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase compared with the carrageenan-treated group ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** The results of the present study indicate that hesperetin nano-phytosome is likely to exert its anti-inflammatory effects through modulation of oxidative stress.

**Keywords:** Inflammation, Carrageenan, Hesperetin, Mice, Nanophytosome, Oxidative stress

**Funding:** This study did not receive any funds.

**Conflict of interest:** None declared.

**Ethical considerations:** This study was approved by the Ethics Committee of the University of Mazandaran, Babolsar, Iran (IR.UMZ.REC.1401.003).

**Authors' contributions:**

- **Conceptualization:** Akbar Hajizadeh Moghaddam
- **Methodology:** Vahid Hasantabar
- **Data collection:** Simin Sadeghi Mahali
- **Formal analysis:** Sedigheh Khanjani Jelodar
- **Supervision:** Akbar Hajizadeh Moghaddam
- **Project administration:** Sedigheh Khanjani Jelodar
- **Writing – original draft:** Simin Sadeghi Mahali
- **Writing – review & editing:** Akbar Hajizadeh Moghaddam, Sedigheh Khanjani Jelodar

**Citation:** Sadeghi Mahali S, Hajizadeh Moghaddam A, Khanjani Jelodar S, Hasantabar V. The Effect of Hesperetin Nanophytosome on Carrageenan-Induced Acute Inflammation in Mice: An Experimental Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2026; 25 (2): 103-16. doi: 10.66224/jrums.25.2.103. [Farsi].

1- MSc Student in Physiology, Dept. of Animal Science, Faculty of Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

2- Prof. of Physiology, Dept. of Animal Science, Faculty of Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran, ORCID: 0000-0002-0843 (Corresponding Author) Tel: (011) 35302453, E-mail: a.hajizadeh@umz.ac.ir

3- Associate Prof. of Physiology, Dept. of Animal Science, Faculty of Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

4- PhD in Polymer Chemistry, Dept. of Organic Polymer Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Mazandaran, Babolsar, Iran