مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۲۵، اردیبهشت ۱۴۰۵، ۱۱۶-۱۰۳

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

سیمین صادقی‌محلی[۱]، اکبر حاجی‌زاده مقدم[۲]، صدیقه خانجانی‌جلودار[۳]، وحید حسن‌تبار[۴]

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 می‌توانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنول‌ها نظیر هسپرتین را ارتقاء دهند. هدف این مطالعه، تعیین اثر ضدالتهابی نانوفیتوزوم هسپرتین در مدل التهاب حاد القاء شده با کاراژینان در موش‌های آزمایشگاهی کوچک بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۳۵ موش کوچک آزمایشگاهی نر به پنج گروه هفت‌تایی تقسیم شدند: گروه کنترل هیچ دارویی دریافت نکردند. گروه دوم که برای ۱۴ روز نانوفیتوزوم هسپرتین را با دوز ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت خوراکی و حلال کاراژینان را به صورت تزریق در کف پا دریافت کرد. گروه سوم، کاراژینان ۱ درصد به‌صورت 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 آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و نیز میزان گلوتاتیون و MDA اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: 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 گلوتاتیون و افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز، در مقایسه با گروه دریافت کننده کاراژینان شوند ($P<۰/۰۵$).

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

واژه‌های کلیدی: التهاب، کاراژینان، هسپرتین، موش کوچک آزمایشگاهی، نانوفیتوزوم، استرس اکسیداتیو

ارجاع: صادقی محلی س، حاجی‌زاده مقدم ا، خانجانی جلودار ص، حسن‌تبار 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) استادگروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
تلفن: ۳۵۳۰۲۴۵۳-۰۱۱، پست الکترونیکی: a.hajizadeh@umz.ac.ir
۳- استادیارگروه 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 پلی‌ساکارید طبیعی به‌دست آمده از جلبک‌های قرمز است که به عنوان عامل ژل‌ساز 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 (۲، ۱). با این وجود، محققان هم‌چنین دریافته‌اند که این دسته از پلی‌ساکاریدها 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، ترومبوکسان‌ها، 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 آنتی‌اکسیدانی نقش دارد (۵). در اختلالات التهابی، مالون دی آلدهید (Malondialdehid; MDA) تولید شده توسط پراکسیداسیون لیپیدی، نشان‌گر مهم استرس اکسیداتیو است که در ایجاد التهاب دخیل می‌باشد (۶). در حالی‌که عوامل اصلی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی نظیر سوپراکسید دیسموتاز وگلوتاتیون اثرات مفیدی در درمان ادم پنجه ناشی از کاراژینان دارند (۴). فعالیت سوپراکسیددیسموتاز (Superoxid Dismutase; SOD) و سایر عوامل آنتی‌اکسیداتیو آنزیمی در شرایط شدید التهابی و استرس اکسیداتیو کاهش می‌یابد. علاوه بر این، گلوتاتیون (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 نعناء یافت می‌شود (۷). یافته‌های پیش بالینی و بالینی نشان می‌دهد که هسپریدین، هسپرتین و متابولیت‌های آنها دارای فعالیت‌های مختلف فیزیولوژیکی از جمله آنتی‌اکسیدان، ضدالتهاب، کاهش چربی خون، ضد فشارخون، عروق محافظ و ضد آترواسکلروتیک هستند (۸).

عوامل متعددی مانند حلالیت 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 پلی‌فنول‌ها را محدود می‌کند. بیشتر ترکیبات زیست فعال گیاهی مانند ترپنوئیدها، فلاونوئیدها،

CCBY-NC.4.0 DEED

گلیکوزیدهای فنولی و آنتوسیانین‌ها دارای طبیعت آبدوست هستند. این ماهیت مانع زیادی در جذب دارو ایجاد می‌کند، زیرا غشاء اجازه عبور مواد بسیار محلول درآب 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. فیتوزوم ها به‌واسطه تشکیل کمپلکس مناسب با لیپیدها می توانند این فراهم 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 کاراژینان 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.UMZ.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 کاراژینان: به منظور القاء التهاب، در ناحیه کف پا در پنجه عقبی چپ موش‌ها تزریق کاراژینان ۱ درصد صورت گرفت. هسپرتین + کاراژینان: هسپرتین ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را به مدت ۱۴ روز به صورت خوراکی دریافت کردند و در پایان کاراژینان ۱ درصد در ناحیه کف پا در پنجه عقبی چپ هر موش تزریق شد. نانوفیتوزوم‌هسپرتین + کاراژینان: نانوفیتوزوم هسپرتین ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را به مدت ۱۴ روز به صورت خوراکی دریافت کردند و در پایان کاراژینان 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).

CCBY-NC.4.0 DEED

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, Germenia) 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 اندازه گیری 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 ۰/۰۱۸ گرم اتیلن دی امین ترا استیک اسید (Ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA) و ۰/۰۰۳ 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 گلوتاتیون پراکسیداز با از روش Hritcoاستفاده 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 گلوتاتیون احیاء شده ۴ میلی‌مولار به کار گرفته شد. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه (Memert, Germenia) 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).

CCBY-NC.4.0 DEED

برای انجام این آزمون، مخلوط واکنشی شامل ۲۰۰ میکرولیتر سوپرناتانت از بافت هموژن، ۱ میلی‌لیتر محلول ۶۷ درصد تری باربیوتریک اسید (Barbituric acid; TBA) و ۰/۵ میلی‌لیتر تری کلرواسیتیک اسید (Trichloroacetic acid; TCA) بود که با هم ترکیب شدند و به مدت ۶۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از بن‌ماری 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).

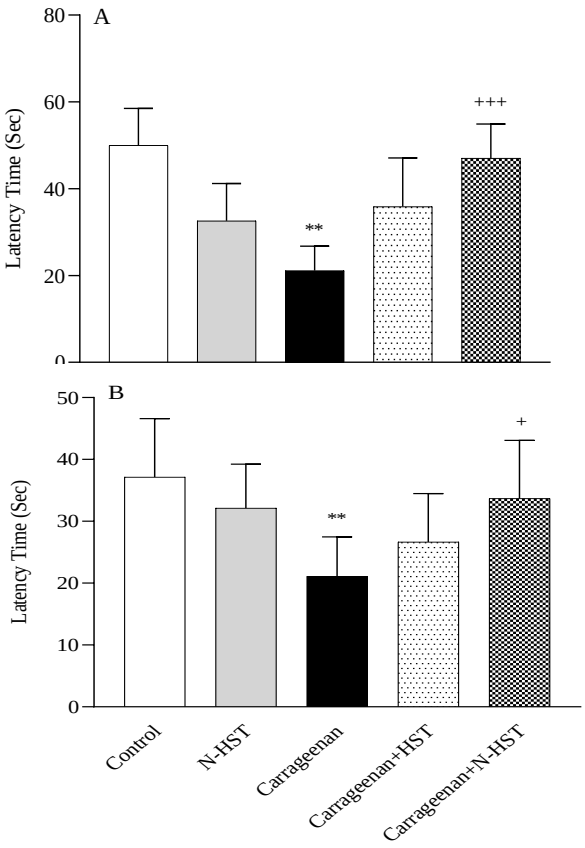
۲۰۰ میکرولیتر از هر غلظت گلوتاتیون با ۱۳۰ میکرولیتر DTNB ((5,5′-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) ۰/۴ درصد و ۱۱۰۰ میکرولیتر بافر سدیم فسفات ۰/۲۵ مولار (pH=۷/۴) با آب مقطر به حجم نهایی ۱۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد. با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۴۱۲ نانومتر، منحنی استاندارد تهیه شد. براساس شیب خط غلظت گلوتاتیون احیاء شده تعیین گردید (۱۸).

داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Prism نسخه ۸ تجزیه و تحلیل شد. نتایج به‌صورت "انحراف معیار ± 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 یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey انجام شد. سطح معنی‌داری 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 معنی‌داری نشان داد (P=۰/۰۰۵). این تأخیر در پاسخ در گروه دریافت‌کننده نانوفیتوزوم هسپرتین بصورت معنی داری در مقایسه با گروه کاراژینان افزایش یافت (P<۰/۰۰۱).

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 (P۰/۰۰۷). در حالی‌که گروه دریافت‌کننده نانوفیتوزوم هسپرتین در مقایسه با گروه کاراژینان افزایش قابل توجهی (P=۰/۰۴۰) در مدت زمان تأخیر از خود نشان داد.

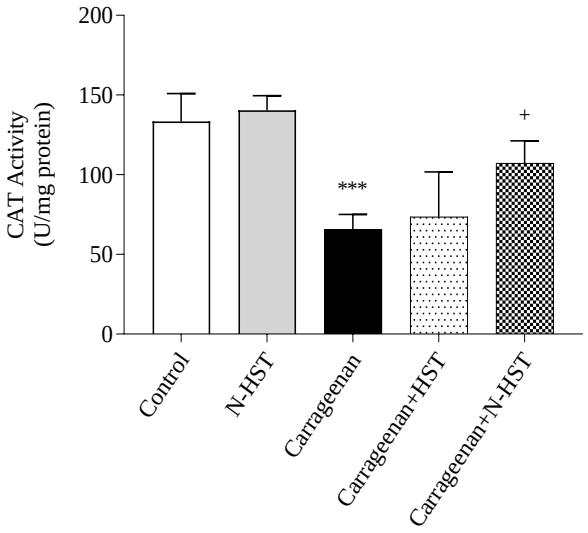


نمودار ۱- بررسی مدت زمان تأخیر در آزمون صفحه داغ یک ساعت (A) و سه ساعت (B) پس از تزریق کاراژینان

داده‌ها در هر ستون به صورت انحراف معیار ± میانگین نمایش داده شده است. ** P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه کنترل، + P<۰/۰۵ و +++ P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه کاراژینان. (Control=کنترل، Carrgeenan=کاراژینان، HST=هسپرتین ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، N-HST=نانوفیتوزوم هسپرتین ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم).

CCBY-NC.4.0 DEED

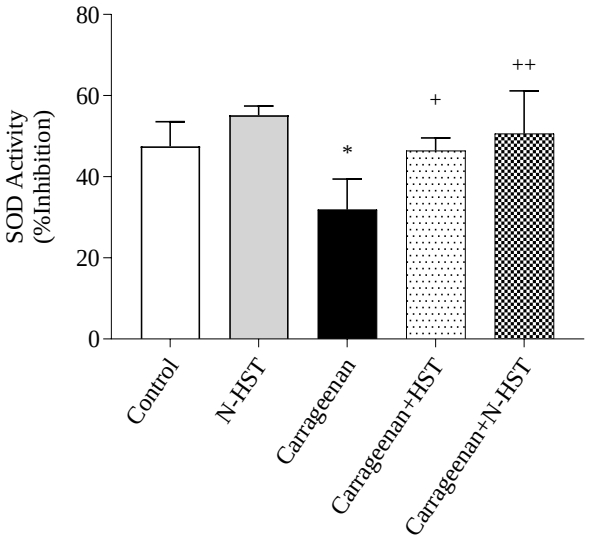
براساس نمودار ۲، فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه کاراژینان نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۰۱)، در حالی‌که گروه دریافت‌کننده نانوفیتوزوم هسپرتین با P=۰/۰۲۵ افزایش قابل توجهی در فعالیت این آنزیم نشان داد.



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

داده‌ها در هر ستون به صورت انحراف معیار ± میانگین نمایش داده شده است. *** P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه کنترل، + P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کاراژینان. (Control=کنترل، Carrgeenan=کاراژینان، HST=هسپرتین ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، N-HST=نانوفیتوزوم هسپرتین ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم).

براساس نمودار ۳، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در گروه کاراژینان نسبت به گروه کنترل با کاهش قابل توجهی همراه بوده است (P=۰/۰۳۰). در حالی‌که در گروه دریافت‌کننده هسپرتین و نانوفیتوزوم هسپرتین فعالیت این آنزیم به ترتیب با (P=۰/۰۴۰) و (P=۰/۰۰۸) در مقایسه با گروه کاراژینان افزایش قابل توجهی نشان داد.

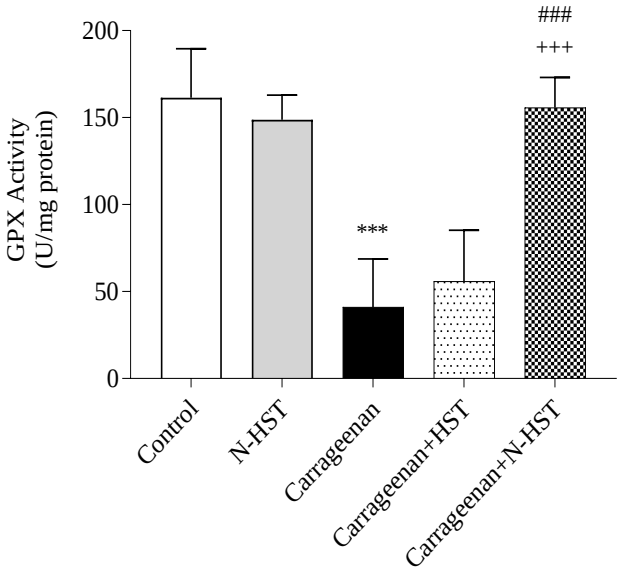


نمودار ۳- بررسی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بافت پنجه پای موش

داده‌ها در هر ستون به صورت انحراف معیار ± میانگین نمایش داده شده است. * P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه کنترل، + P<۰/۰۵ و ++ P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه کاراژینان. (Control=کنترل، Carrgeenan=کاراژینان، HST=هسپرتین ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، N-HST=نانوفیتوزوم هسپرتین ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم).

بر اساس نمودار ۴، فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز در گروه کاراژینان کاهش قابل توجهی نسبت به گروه کنترل نشان داد (P<۰/۰۰۱). اما در فعالیت این آنزیم در گروه دریافت‌کننده نانوفیتوزوم هسپرتین در مقایسه با گروه کاراژینان افزایش معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). از طرفی دیگر، افزایش معنی‌داری در فعالیت این آنزیم در گروه دریافت‌کننده نانوفیتوزوم هسپرتین نسبت به گروه هسپرتین مشاهده گردید (P<۰/۰۰۱).

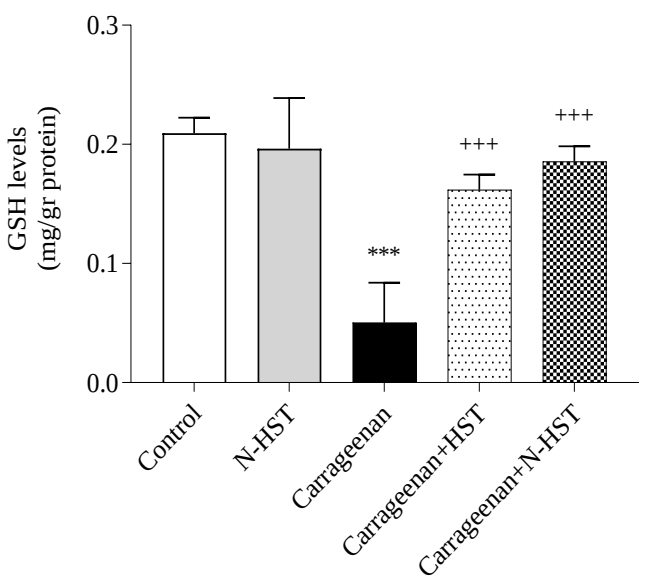
CCBY-NC.4.0 DEED



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

داده‌ها در هر ستون به صورت انحراف معیار ± میانگین نمایش داده شده است. *** P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه کنترل، +++ P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه کاراژینان، ### P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه HST. (Control=کنترل، Carrgeenan=کاراژینان، HST=هسپرتین ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، N-HST=نانوفیتوزوم هسپرتین ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم).

براساس نمودار ۵، سطوح گلوتاتیون در گروه کاراژینان کاهش قابل توجهی نسبت به گروه کنترل داشت (P<۰/۰۰۱)، در حالی که در هر دو گروه دریافت‌کننده هسپرتین و نانوفیتوزوم هسپرتین، سطوح گلوتاتیون با (P<۰/۰۰۱). در مقایسه با گروه کاراژینان با افزایش قابل توجهی همراه بوده است.

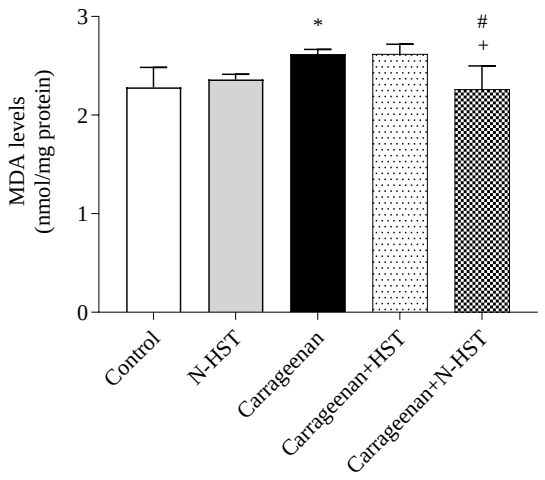


نمودار ۵- بررسی سطوح گلوتاتیون در بافت پنجه پای موش

داده‌ها در هر ستون به صورت انحراف معیار ± میانگین نمایش داده شده است. *** P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه کنترل، +++ P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه کاراژینان. (Control=کنترل، Carrgeenan=کاراژینان، HST=هسپرتین ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، N-HST=نانوفیتوزوم هسپرتین ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم).

براساس نمودار ۵، کاراژینان توانست سطح MDA را بطور معنی‌داری (P=۰/۰۴۰) نسبت به کنترل افزایش دهد، در حالی‌که سطح این فاکتور اکسیدانی در گروه دریافت‌کننده نانوفیتوزوم هسپرتین نسبت به گروه کاراژینان کاهش قابل توجهی یافت (P=۰/۰۳۰). علاوه بر این، گروهی که نانوفیتوزوم هسپرتین دریافت کردند نسبت به گروهی که هسپرتین دریافت کردند کاهش بارزتری نشان دادند (P=۰/۰۲۰).

CCBY-NC.4.0 DEED



نمودار ۶- بررسی سطوح MDA در بافت پنجه پای موش

داده‌ها در هر ستون به صورت انحراف معیار ± میانگین نمایش داده شده است. * P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل، + P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کاراژینان، # P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه HST. (Control=کنترل، Carrgeenan=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 صفحه داغ پس از تجویز کاراژینان، مؤید القاء التهاب حاد در پای موش‌ها است، در حالی‌که 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 هیپرآلژزی نقش کلیدی دارند (۲۲-۱۹).

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-κB و سرکوب بیان COX-2و 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 صفحه داغ می‌شود.

CCBY-NC.4.0 DEED

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 می‌شود. 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 آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی مستند هسپرتین اما فراهمی زیستی محدود در فرم آزاد آن که کپسوله کردن آن در نانوفیتوزوم‌ها، پتانسیل درمانی آن را در برابر آسیب‌های التهابی و اکسیداتیو ناشی از کاراژینان تقویت می‌کند.

نتایج بیوشیمیایی مطالعه حاضر نشان داد که کاراژینان موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های 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 MDAبارزتر بود. این برتری نسبی احتمالاً ناشی از بهبود زیست‌فراهمی و پایداری هسپرتین در قالب نانوفیتوزوم است، هرچند نبود داده‌های فارماکوکینتیکی مستقیم، تفسیر قطعی این مزیت را محدود می‌سازد. یافته‌های حاضر با مطالعات پیشین همسو است که نشان داده‌اند التهاب القائ شده با کاراژینان موجب کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود 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 لیپوپلی‌ساکارید 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 سیتوکاین‌های التهابی را کاهش داد. به طور مشابه، هسپرتین تولید گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی القاء شده توسط لیپوپلی‌ساکارید را کاهش داد و سطح پروتئین‌های آنتی‌اکسیدانی مانند فاکتور هسته‌ای اریتروئید 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 گروه‌های بیمار تحت درمان با هسپرتین و نانوذرات هسپرتین (۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت چهار هفته به صورت خوراکی پس از تجویز کتامین)، سطوح GSH و نیز فعالیت آنزیم‌های 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 آنتی‌اکسیدانی که از خود نشان داده‌اند، باعث محافظت کبدی در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از کتامین می‌شوند (۱۰). Polat و همکاران در مطالعه‌ای بر روی اثر هسپرتین بر وضعیت التهابی و اکسیداتیو در مدل کولیت تجربی القاء شده توسط تری‌نیتروبنزن سولفونیک اسید، نشان دادند که تجویز هسپرتین به طور قابل‌توجهی سطح MDA و عوامل پیش‌التهابی (TNF-α، IL-6 و NF-κB) را کاهش می‌دهد. هم‌چنین، هسپرتین از طریق اثرات ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی در برابر مدل کولیت ناشی از تری‌نیتروبنزن سولفونیک اسید محافظت می‌کند (۲۸). اگرچه مدل کاراژینان به‌عنوان یک مدل کلاسیک التهاب محیطی شناخته می‌شود، اما پاسخ‌های التهابی می‌توانند منجر به فعال‌سازی مسیرهای درد مرکزی شوند؛ بنابراین، استفاده از آزمون Hot Plate در این مطالعه با هدف ارزیابی مؤلفه‌های مرکزی درد انجام شد. با این حال، عدم

CCBY-NC.4.0 DEED

ارزیابی مستقیم ادم پنجه به‌عنوان 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 کاراژینان 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 کاراژینان 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 القائ شده با کاراژینان 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 کاراژینان 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: نویسندگانه حمایت مالی دریافت نکرده اند.

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:** سمین صادقی
- **نگارش – بررسی و ویرایش:** اکبر حاجی زاده مقدم، صدیقه خانجانی جلودار

CCBY-NC.4.0 DEED

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-κB 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 neurodegene_ ration: 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

CCBY-NC.4.0 DEED

functions, and pain after propofol anesthesia. *Braz J Anesthesiol* 2016; 66(5): 485-91.

12. Bigdeli MR, Rasoulian 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.

CCBY-NC.4.0 DEED

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-κB 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.

CCBY-NC.4.0 DEED

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

Simin Sadeghi Mahali[1], Akbar Hajizadeh Moghaddam[2], Sedigheh Khanjani Jelodar[3], Vahid Hasantabar[4]

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

CCBY-NC.4.0 DEED