



Original Article

Investigation of the Protective Effect of Garlic on Acrylamide-Induced Neurotoxicity via the Apoptotic Pathway in Male Wistar Rats

Hoorā Eyvazloo¹ , Farzad Kahrizi¹ , Jamshid Tabeshpour^{1*}

¹ Department of Pharmacology, Da.C., Islamic Azad University, Damghan, Iran

*Corresponding author: Jamshid Tabeshpour, Department of Pharmacy, Da.C., Islamic Azad University, Damghan, Iran. Email: jamshid.tabeshpour@iau.ac.ir

DOI: [10.22034/nkums.18.1.16](https://doi.org/10.22034/nkums.18.1.16)

How to Cite this Article:

Eyvazloo H, Kahrizi F, Tabeshpour J. Investigation of the Protective Effect of Garlic on Acrylamide-Induced Neurotoxicity via the Apoptotic Pathway in Male Wistar Rats. J North Khorasan Univ Med Sci. 2026;18(1): 16-24
DOI: 10.22034/nkums.18.1.16

Received: 11 June 2025

Accepted: 04 November 2025

Keywords:

Acrylamide
Garlic
Oxidative stress
Neurotoxicity
Rat cerebral cortex

Abstract

Introduction: Acrylamide, a neurotoxic compound, enters human life through various sources. Garlic, with its antioxidant properties, protects the nervous system. This study aimed to investigate the effect of garlic on reducing acrylamide-induced neurotoxicity in male Wistar rats by evaluating the apoptosis pathway and measuring the levels of BAX, Bcl-2, and caspase-3 proteins.

Methods: Male Wistar rats were divided into seven groups (n=6 per group): Group 1 received normal saline, Group 2 received acrylamide (50 mg/kg), Groups 3–5 received acrylamide + garlic (100, 200, and 400 mg/kg, respectively), Group 6 received only garlic (200 mg/kg), and Group 7 received acrylamide + vitamin E (200 mg/kg). Intraperitoneal injections were administered for 11 days. Subsequently, the rats' cerebral cortex was extracted and analyzed via Western blot. The densitometric data for protein bands are expressed as mean ± standard deviation (Mean ± SD). Intergroup comparisons were performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test. All statistical analyses were conducted using GraphPad Prism software (version 9.4.1). A P-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results: The findings revealed that acrylamide alone increased the levels of caspase-3 and Bcl-2. Garlic at 100 mg/kg significantly elevated Bcl-2, compared to the normal and acrylamide-only groups; however, it did not significantly affect caspase-3 levels. The 400 mg/kg garlic dose showed the highest increase in Bcl-2 levels. Vitamin E also reduced caspase-3 and increased Bcl-2, though no significant difference was observed, compared to the 100 mg/kg garlic group.

Conclusions: Intraperitoneal injection of acrylamide in male Wistar rats induced apoptosis. However, Western blot results demonstrated that treatment with different doses of garlic prevented apoptosis and reduced neural damage.



بررسی تأثیر سیر در سمیت عصبی ناشی از آکريلامید در رت‌های ویستار نر از

طریق مسیر آپوتوز

حورا عیوضلو^۱، فرزاد کهریزی^۱، جمشید تابش‌پور^{۱*}

^۱ گروه داروسازی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

* نویسنده مسئول: جمشید تابش‌پور، گروه داروسازی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران. ایمیل: jamshid.tabeshpour@iau.ac.ir

DOI: 10.22034/nkums.18.1.16

چکیده	تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۱۳
واژگان کلیدی: آکريلامید سیر استرس اکسیداتیو سمیت عصبی کورتکس مغز رت	
مقدمه: آکريلامید، سمی که به سیستم عصبی آسیب می‌رساند، از منابع مختلف وارد زندگی انسان می‌شود. سیر با خواص آنتی‌اکسیدانی خود از سیستم عصبی محافظت می‌کند. این مطالعه با هدف بررسی اثر سیر در کاهش سمیت عصبی آکريلامید در رت‌های ویستار نر، از طریق ارزیابی مسیر آپوتوز و اندازه‌گیری پروتئین‌های BAX، Bcl2 و کاسپاز ۳ انجام شد. روش کار: رت‌های نر ویستار به هفت گروه شش‌تایی تقسیم شدند: گروه اول نرمال‌سالین، گروه دوم آکريلامید (۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)، گروه‌های سوم تا پنجم آکريلامید + سیر (۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)، گروه ششم فقط سیر (۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و گروه هفتم آکريلامید + ویتامین E (۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم). تزریق‌ها به مدت یازده روز داخل‌صفاقی انجام شد. سپس، کورتکس مغز رت‌ها استخراج و با وسترن‌بلات آنالیز شد. داده‌های حاصل از سنجش تراکم باندهای پروتئینی به صورت میانگین \pm انحراف معیار (Mean \pm SD) گزارش شدند. برای مقایسه میانگین‌ها بین گروه‌های مختلف از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه \pm انحراف معیار (One-way ANOVA) به همراه تست تعقیبی Tukey استفاده شد. تمامی تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism (نسخه ۹.۴.۱) انجام گرفت. سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. یافته‌ها: نتایج نشان داد آکريلامید به‌تنهایی باعث افزایش کاسپاز ۳ و Bcl2 شد. سیر با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، Bcl2 را به‌طور معناداری در مقایسه با گروه‌های نرمال و آکريلامید تنها افزایش داد، اما تأثیر قابل‌توجهی بر کاسپاز ۳ نداشت. دوز ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم سیر بیشترین افزایش Bcl2 را نشان داد. ویتامین E نیز کاسپاز ۳ را کاهش و Bcl2 را افزایش داد، اما تفاوت معناداری با گروه سیر ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نداشت. نتیجه‌گیری: تزریق داخل‌صفاقی آکريلامید در رت‌های نر ویستار موجب القای آپوتوز می‌شود، اما نتایج وسترن‌بلات نشان داد که تیمار با دوزهای مختلف سیر از بروز آپوتوز جلوگیری می‌کند و آسیب عصبی را کاهش می‌دهد.	

مقدمه

آسیب به DNA یا استرس اکسیداتیو در جهت تعادل میان تکثیر و مرگ سلولی مطرح است و در نگاه دیگر، مرگ برنامه‌ریزی‌شده‌ای است که در مراحل زندگی فرد، نقش مهمی دارد [۱]. آپوتوز از طریق دو مسیر خارجی و داخلی انجام می‌شود. مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی آپوتوز به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین مسیرهای آپوتوز شناخته می‌شود. با تغییر در پتانسیل غشای میتوکندری سلول‌ها، نفوذپذیری آن‌ها افزایش و سیتوکروم C از میتوکندری به داخل سیتوپلاسم انتقال می‌یابد. سپس، به پروتئینی به نام APAF-1 (Apoptotic Peptidase Activating Factor 1) متصل می‌شود و کمپلکس پروتئینی آپوتوزوم را تشکیل می‌دهد که باعث فعال شدن کاسپازها می‌شود. این فرایندها با پروتئین‌های Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) تنظیم می‌شود [۲].

پروتئین BAX به‌عنوان پروتئین شروع‌کننده آپوتوز شناخته و در زمانی که استرس به سلول وارد می‌شود، به جدار خارجی میتوکندری

آکريلامید نوعی مادهٔ محلول در آب است که به‌عنوان مونومر برای آماده‌سازی پلیمرها و کوپلیمرها استفاده می‌شود [۱]. آکريلامید به‌صورت گسترده در صنعت بازیابی نفت خام و پساب‌های صنعتی، صنعت کاغذ، رنگ‌سازی، پوشش‌های صنعتی و آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شود [۲]. فرایند سرخ کردن، کباب کردن یا پختن غذاهای غنی از کربوهیدرات در دمای بالای ۱۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد و در شرایط با رطوبت کم یا مصرف تنباکو، مقدار قابل توجهی از آکريلامید را وارد بدن افراد می‌کند [۳]. آکريلامید به‌عنوان عامل شیمیایی، عوارض سمیت عصبی دارد و می‌تواند نورویاتی‌های محیطی و مرکزی ایجاد کند [۴]. در مطالعات مختلف اثبات شده است که آکريلامید می‌تواند باعث بروز تغییراتی در رفتارهای عصبی مانند عدم تعادل و تغییرات پاتولوژیکی در مغز و نخاع مانند تورم و احتقان در سیستم عصبی در رت شود [۵].

آپوتوز به‌عنوان نوعی فرایند انتخابی در حذف و مرگ سلول‌ها با

کاهش عوارض آکریلامید از طریق مداخلات تغذیه‌ای طبیعی است. با توجه به شیوع مواجهه با آکریلامید از طریق منابع غذایی و صنعتی و عوارض عصبی شناخته‌شده آن، یافتن راهکارهای محافظتی طبیعی و کم‌عارضه اهمیت زیادی دارد. اگرچه مطالعات متعددی آثار محافظتی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی را در برابر سمیت آکریلامید بررسی کرده‌اند (مانند ویتامین E، روغن زیتون و ...)، مطالعات کمتری به‌طور خاص به نقش سیر و دوزهای مختلف آن در تعدیل مسیر آپوپتوز در بافت عصبی پرداخته‌اند. بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی آثار محافظتی دوزهای مختلف سیر در سمیت عصبی ناشی از آکریلامید از طریق ارزیابی نشانگرهای کلیدی آپوپتوز در کورتکس مغز رت‌های ویستار نر طراحی شد.

روش کار

این تحقیق از نوع مطالعات تجربی آزمایشگاهی است که با هدف بررسی آثار محافظتی سیر در سمیت عصبی القا شده با آکریلامید در بافت کورتکس مغزی رت‌های نر نژاد ویستار انجام شد. رت‌ها از انستیتو پاستور رازی خریداری شدند. رت‌ها در قفس‌های پلی‌کربناتی با تهویه مناسب، در چرخه نوری دوازده‌ساعته تاریکی - روشنایی، دمای 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد، با دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد نگهداری شدند. فهرست مواد شیمیایی و دستگاه‌های مورد استفاده در پژوهش به ترتیب در جدول‌های ۱ و ۲ آورده شده است. به‌منظور القای سمیت عصبی، آکریلامید با دوز ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم به‌مدت یازده روز متوالی به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. رت‌ها به‌صورت تصادفی به هفت گروه تقسیم شدند که هر گروه شامل شش رت به شرح زیر بود:

۱. کنترل منفی: نرمال سالین (داخل صفاقی، ۱۱ روز)؛

۲. آکریلامید با دوز ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم [۱۶]؛

۳. آکریلامید با دوز ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم (داخل صفاقی، ۱۱ روز)

[۱۶] به‌همراه سیر با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم (گاوژ، ۱۰ روز) [۱۷]؛

۴. آکریلامید با دوز ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم (داخل صفاقی، ۱۱ روز)

[۱۶] به‌همراه سیر با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم (گاوژ، ۱۰ روز) [۱۷]؛

۵. آکریلامید با دوز ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم (داخل صفاقی، ۱۱ روز)

[۱۶] به‌همراه سیر با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم (گاوژ، ۱۰ روز) [۱۷]؛

۶. سیر به‌تنهایی با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم (گاوژ، ۱۰ روز)

[۱۷]؛

۷. کنترل مثبت: آکریلامید با دوز ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم

(داخل صفاقی، ۱۱ روز) [۱۶] به‌همراه ویتامین E با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم

در کیلوگرم (داخل صفاقی، ۱۱ روز، یک روز در میان) [۱۶].

منتقل و باعث رهاسازی سیتوکروم C به درون سیتوپلاسم و ایجاد آپوپتوز می‌شود که می‌توان با سنجیدن مقدار موجود آن، میزان آپوپتوز سلولی را اندازه‌گیری کرد. در حالی که پروتئین Bcl-2 به استحکام و ثبات غشای میتوکندری کمک می‌کند و زنده‌ماندن سلول، به‌خصوص در مراحل اولیه آپوپتوز، مقدار زیادی به تعادل بین پروتئین‌های ضد آپوپتوز و شروع‌کننده آپوپتوز از خانواده Bcl-2 وابسته است [۸]. تغییرات بیوشیمیایی در مسیر آپوپتوز، با خانواده‌ای از پروتئین‌های سیستمی داخل‌سلولی به نام کاسپازها انجام می‌گیرد. از چهارده عدد کاسپاز شناخته‌شده، یازده مورد از آن‌ها در ژنوم انسان قرار دارد. کاسپازها شامل دو دسته کاسپازهای آغازکننده و کاسپازهای عمل‌کننده هستند. سیگنال‌های آپوپتوتیک از مسیر خارجی و میتوکندریایی به ترتیب سبب فعال‌شدن کاسپازهای آغازکننده ۸ و ۹ می‌شوند. این کاسپازها پس از فعال‌شدن، کاسپازهای عمل‌کننده را فعال می‌کنند. کاسپازهای عمل‌کننده مانند کاسپازهای ۳، ۶ و ۷ پروتئین‌های محافظت‌کننده سلول از آپوپتوز را شکسته و غیرفعال می‌کنند [۹]. شواهد بیانگر این است که میزان فعالیت کاسپاز ۳ در سیتوپلاسم سلول، رابطه مستقیمی با آپوپتوز سلولی دارد. بنابراین، القای آپوپتوز با مسیر فعال‌شدن کاسپاز ۳ همراه است [۶].

درباره کاهش عوارض استرس اکسیداتیو ناشی از حضور آکریلامید، تحقیقات بسیاری انجام شده است. به‌طور کلی، می‌توان گفت ترکیباتی که خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند، می‌توانند عوارض آکریلامید را کاهش دهند. برای مثال، روغن زیتون [۱۰]، روغن ماهی [۱۱]، آلیسین [۱۲]، کروسین [۱۳]، ویتامین E [۱۴] و ... توانسته‌اند از طریق مهار مسیر آپوپتوز و ایجاد آثار آنتی‌اکسیدانی، سمیت سلولی آکریلامید را کاهش دهند. سیر یکی دیگر از ترکیباتی است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد. سیر از ترکیبات متنوع آلی، معدنی و ویتامین‌ها تشکیل شده است. بخش آلی آن عمدتاً شامل کربوهیدرات‌هاست، درحالی‌که سولفور عمدتاً جزء معدنی آن را تشکیل می‌دهد. بیشتر ترکیبات سولفوری شامل آلیسین، دی‌آلیل‌دی‌سولفید و دی‌آلیل‌تری‌سولفید است که خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی دارند و طعم تند سیر را ایجاد می‌کنند. همچنین، فیتوالکسین، ترکیبی غیرسولفوری و ناپایدار با ساختار گاما‌پیرون، آثار آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد توموری دارد [۱۵]. آنتی‌اکسیدان‌های موجود در سیر با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد قادرند آن‌ها را به مولکول‌های بی‌ضرر تبدیل کنند و در نتیجه، به کاهش آسیب اکسیداتیو و آپوپتوز منجر شوند [۱۵]. با توجه به خطرهای جدی آکریلامید و قابلیت‌های محافظتی سیر، در این پژوهش به بررسی تأثیرات دوزهای مختلف عصاره سیر در مقابله با سمیت عصبی ناشی از آکریلامید پرداخته شد. هدف نهایی یافتن راهکارهای مؤثر و ایمن در

جدول ۱. فهرست مواد شیمیایی مورد استفاده در پژوهش

کشور	شرکت سازنده	نام ماده
آلمان	مرک	بافر RIPA
آلمان	مرک	KH2PO4
آلمان	مرک	KCL
آلمان	مرک	Na2HPO4
آلمان	مرک	NaCL
آلمان	مرک	H3PO4
آلمان	مرک	Acrylamide
آلمان	مرک	n-butanol

Methanol	مرک	آلمان
Liquid nitrogen	اکسیژن مطمئن	ایران
Vitamin E	داروپخش	ایران
Normal saline	سامن	ایران
Allium Sativum	دینه	ایران
Goat anti-human IgG	مرک	آلمان
C12H25NaO4S	مرک	آلمان
(C3H5NO)n	مرک	آلمان
Bcl2	مرک	آلمان
CaS3	مرک	آلمان
BAX	مرک	آلمان
B-Actin	مرک	آلمان

جدول ۲. فهرست دستگاه‌های مورد کاربرد در پژوهش

نام دستگاه	مدل دستگاه	کشور سازنده
Electrophoresis Device	Olympus	Germany
Centrifuge	Heittich	Germany
Guillotine	Ara teb fan	Iran
Freezer	Alborz	Iran
Sampler	Brand	Germany
UV-Vis Spectrophotometer	Jenway 6105 uv/vis	England
PH meter	Metrohm	Switzerland
Hotplate magnetic stirrer	Shimifann	Iran
Ice maker	Scotsman AF-80	Italy
Homogenizer	Kinematica	Switzerland
V	VTX-3000, Scientifica	Japan
Scale	Sartorius	Germany

شد. در نهایت، شدت باندهای پروتئین هدف، نرمالایز شده در برابر باندهای پروتئین β -Actin و مقادیر نسبی حاصل بین گروه‌های مختلف، مقایسه شد. آنالیز کمی باندهای وسترن بلات با استفاده از نرم‌افزار Imager Gel انجام شد.

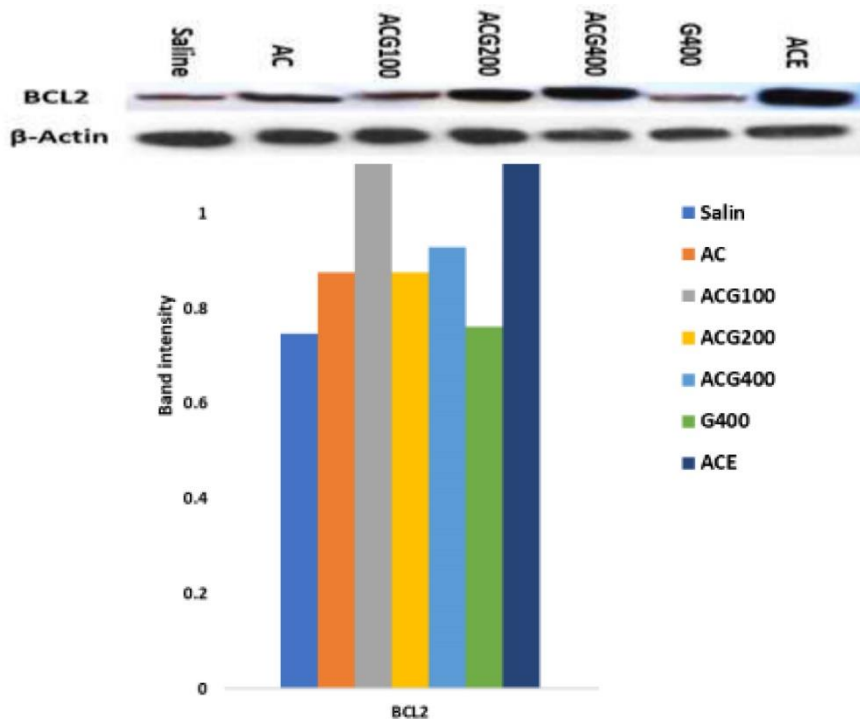
داده‌های حاصل از سنجش تراکم باندهای پروتئینی به صورت میانگین \pm انحراف معیار (Mean \pm SD) گزارش شدند. برای مقایسه میانگین‌ها بین گروه‌های مختلف از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) به همراه تست تعقیبی Tukey استفاده شد. تمامی تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism (نسخه 9.4.1) انجام گرفت. سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

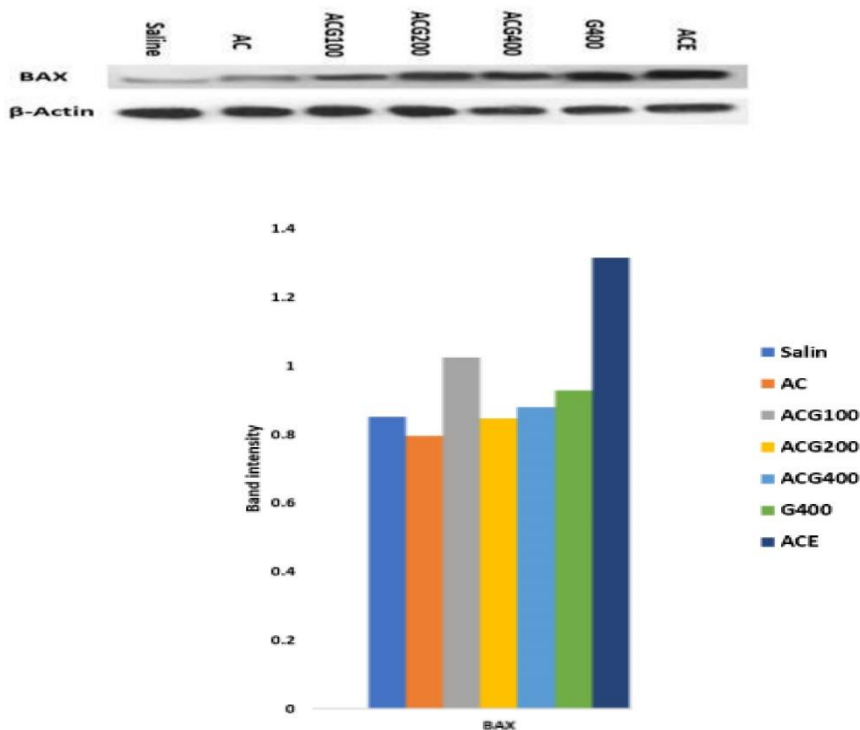
تجویز آکرلامید به تنهایی سبب افزایش بیان پروتئین‌های کاسپاز ۳ و Bcl-2 در مقایسه با گروه دریافت‌کننده نرمال‌سالین شد ($P < 0.001$). باین‌حال، میزان بیان BAX بین این دو گروه تفاوت معنی‌داری نداشت (نمودارهای ۱ تا ۳). تیمار رت‌ها با آکرلامید و سیر دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم سبب افزایش معنی‌دار بیان پروتئین Bcl-2 در مقایسه با گروه آکرلامید به تنهایی شد ($P < 0.001$) (نمودار ۱). باین‌حال، همین تیمار افزایش میزان BAX را نیز به‌طور معنی‌دار درباره این دو گروه نشان داد ($P < 0.001$) (نمودار ۲). میزان کاسپاز ۳ در گروه دریافت‌کننده سیر دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در مقایسه با گروه دریافت‌کننده آکرلامید تفاوت معنی‌داری نداشت، اما با اختلاف از گروه دریافت‌کننده نرمال‌سالین بیشتر بود ($P < 0.001$) (نمودار ۳).

پس از پایان دوره تیمار، حیوانات با کتامین (۸۷ میلی‌گرم در کیلوگرم) و زایلازین (۱۳ میلی‌گرم در کیلوگرم) بیهوش و سپس با قطع سر کشته شدند. بافت کورتکس مغز استخراج، شسته و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای بررسی اثر حفاظتی سیر و ارزیابی آثار آن بر میزان پروتئین‌های دخیل در آپوپتوز شامل Bcl-2، BAX، کاسپاز ۳ و β -Actin (به‌عنوان کنترل) در کورتکس مغز رت‌ها، از وسترن بلات به‌روش Pool استفاده شد [۱۸]. برای این منظور، بافت‌های جمع‌آوری‌شده از گروه‌های مختلف، که قبلاً شرح داده شده است، با بافر RIPA لیز شدند. لیزات‌های سلولی با سانتریفیوژ (۱۴۰۰۰ دور در دقیقه، ۲۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد) برداشت شدند. غلظت پروتئین با کیت BCA Protein Quantification برطبق دستورالعمل کیت تعیین شد.

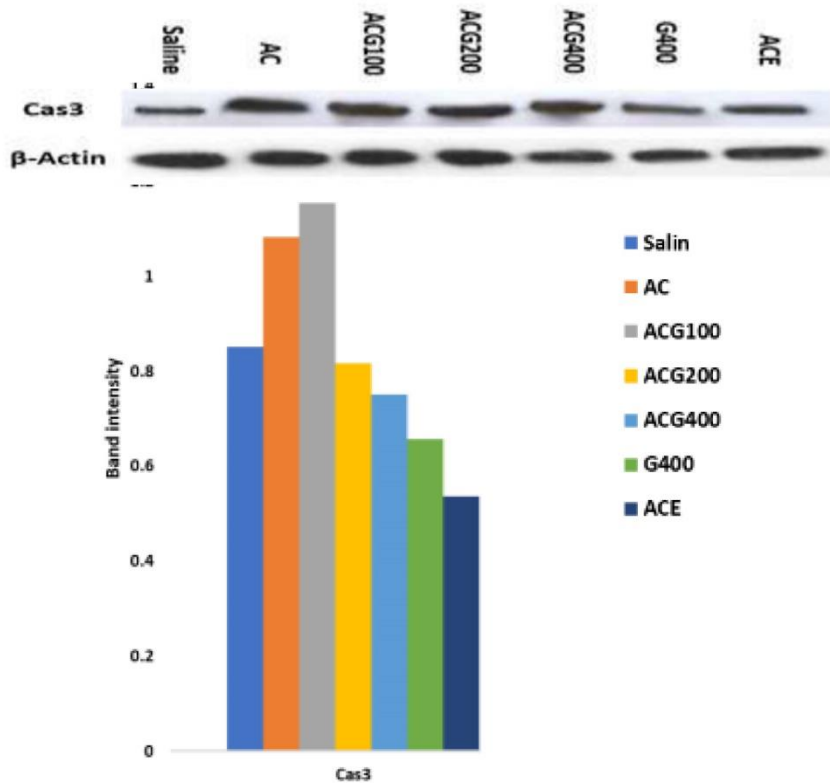
برای انجام وسترن بلات، باندهای پروتئینی موجود در لیزات‌های سلولی با الکتروفورز SDS-PAGE تفکیک و متعاقباً به غشای پلی‌وینیلیدین‌دی‌فلوراید (PVDF: Polyvinylidene Difluoride) $0.4 \mu\text{m}$ منتقل شدند. در ادامه، غشای با BSA (Bovine Serum Albumin) $5 \mu\text{g/ml}$ در ۵ درصد در ۰/۱ درصد از Tween 20 به‌مدت یک ساعت بلاک شد. غشاها با آنتی‌بادی‌های علیه Bcl-2، BAX، کاسپاز ۳ و β -Actin به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از سه بار شست‌وشو با TBS با Tween 20 (۰/۱ درصد)، غشاها با آنتی‌بادی ثانویه ضدخرگوشی، که با IgG H&L کونژوگه شده بود، انکوبه شدند. در ادامه، برای پدیدارکردن باندهای پروتئینی، از روش کمی لومینوسانس استفاده شد. غشا با سوبسترای آنزیم پراکسیداز به نام آکریدین، که خاصیت کمی لومینوسانس ارتقا یافته دارد، به‌مدت دو دقیقه انکوبه شد. بیان پروتئین با β -Actin نرمالایز شد. برای سنجش تراکم باندهای پروتئینی از نرم‌افزار Gel Analyzer 2010a استفاده



نمودار ۱. باندها و آنالیز تراکم باندهای حاصل از وسترن بلات برای بررسی بیان پروتئین Bcl-2 کورتکس مغز در گروه‌های تیمار شده مختلف. Salin: نرمال سالین، AC: آکرلامید، ACG100: آکرلامید با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به همراه سیر با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، ACG200: آکرلامید با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، ACG400: آکرلامید با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به همراه سیر با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، G400: سیر به تنهایی با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، ACE: آکرلامید با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به همراه ویتامین E با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم.



نمودار ۲. باندها و آنالیز تراکم باندهای حاصل از وسترن بلات برای بررسی بیان پروتئین BAX کورتکس مغز در گروه‌های تیمار شده مختلف. Salin: نرمال سالین، AC: آکرلامید، ACG100: آکرلامید با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به همراه سیر با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، ACG200: آکرلامید با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، ACG400: آکرلامید با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به همراه سیر با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، G400: سیر به تنهایی با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، ACE: آکرلامید با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به همراه ویتامین E با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم.



نمودار ۳. باندها و آنالیز تراکم باندهای حاصل از وسترن بلات برای بررسی بیان پروتئین کاسپاز ۳ کورتکس مغز در گروه‌های تیمار شده مختلف. Salin: نرمال سالین، AC: آکرلامید، ACG100: آکرلامید با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به همراه سیر با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، ACG200: آکرلامید با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به همراه سیر با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، ACG400: آکرلامید با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به همراه سیر با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، G400: سیر به تنهایی با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، ACE: آکرلامید با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به همراه ویتامین E با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، Cas3: کاسپاز ۳.

است و در حفظ هموستاز سلولی و تکامل طبیعی نقش مهمی دارد. تعادل بین مرگ سلولی و پرولیفراسیون سلولی لازم است تا هموستاز طبیعی سلول حفظ شود. عدم تعادل سلولی سبب شماری از بیماری‌ها می‌شود. تجمع سلولی با میزان ناکافی آپوپتوز سبب بیماری‌هایی مثل سرطان، التهاب و بیماری‌های اتوایمیون و برعکس، افزایش آپوپتوز نیز سبب آسیب‌ها و بیماری‌های عصبی، قلبی و ... می‌شود. آپوپتوز روندی وابسته به انرژی است که به فعال‌سازی گروهی از پروتئازها به نام کاسپازها منجر می‌شود [۲۲، ۲۳].

فرایند القای آپوپتوز از طریق دو مسیر صورت می‌گیرد: مسیر داخلی و مسیر خارجی. مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی آپوپتوز یکی از اصلی‌ترین مسیرهای آپوپتوز است. همان‌طور که مطالعات زیادی نشان می‌دهند، میتوکندری منبع عظیمی از استرس اکسیداتیو است و در آپوپتوز سلولی و بیماری‌های زیادی نقش مهمی دارد. این مسیر با محرک‌های استرسی مانند استرس اکسیداتیو فعال می‌شود [۲۴]. تغییر در پتانسیل غشای میتوکندری سبب افزایش نفوذپذیری میتوکندری می‌شود و آزادسازی سیتوکروم C از میتوکندری به داخل سیتوپلاسم صورت می‌گیرد و سیتوکروم C به پروتئینی به نام APAF-1 متصل می‌شود تا کمپلکس پروتئینی به نام آپوپتوزوم را تشکیل دهد و باعث فعال شدن کاسپازها شود. این فرایند و نفوذپذیری غشای میتوکندری با پروتئین‌های خانواده Bcl-2 تنظیم می‌شود. خانواده پروتئین‌های Bcl-2 شامل دو گروه پروتئین‌های ضدآپوپتوز (Bcl-2, Bcl-xL) و پروتئین‌های شروع‌کننده آپوپتوز BAX و Bcl-xs می‌شوند. هنگام

در تمامی تیمارها بهترین جواب‌ها به گروه تیمار شده با ویتامین E تعلق دارد که توانسته است به‌طور معنی‌دار سبب کاهش بیان کاسپاز ۳ ($P < 0.001$) و افزایش معنی‌دار Bcl-2 در مقایسه با همه گروه‌های تیمار شده شود ($P < 0.001$). با این حال، تیمار با آکرلامید و ویتامین E نتوانست سبب تفاوت معنی‌داری در بیان Bcl-2 در مقایسه با گروه دریافت‌کننده آکرلامید و دوز ۱۰۰ سیر شود (نمودار ۱).

بحث

آکرلامید یکی از مواد پرمصرف در صنایع مختلف است که یکی از آثار نهایه و اثبات‌شده آن در انسان‌ها و حیوانات، سمیت عصبی است. این آسیب از طریق مکانیسم‌هایی از قبیل کاهش فعالیت ترانسپورتر آکسونی، تغییر در مکانیسم‌های آزادسازی، بازجذب و ذخیره‌سازی ترانسپورترهای عصبی و آسیب به نواحی دیستال آکسون‌ها، القای استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در سیستم عصبی ایجاد می‌شود [۱۹، ۲۰]. از طرفی، سیر حاوی ترکیبات زیست‌فعال مختلفی است، به‌ویژه ترکیبات ارگانوسولفور و ترکیبات فنولیک. ترکیبات فنولیک موجود در سیر یک یا چند گروه هیدروکسیل دارند که به‌عنوان اهداکننده هیدروژن، عمل و رادیکال‌های آزاد را خنثی می‌کنند (آنتی‌اکسیدان‌ها). آنتی‌اکسیدان‌ها نشان داده‌اند که در برابر آثار گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد از بدن محافظت می‌کنند [۲۱]. آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی‌شده، نوعی فرایند فیزیولوژیک طبیعی

سطوح کربونیل پروتئین و همچنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و زانتین‌اکسیداز) شد، اما فعالیت گلوتاتیون - اس - ترانسفراز در مقایسه با گروه کنترل کاهش چشمگیری داشت. علاوه بر این، فایبرونیل بیان ژن‌های پیش‌آپوپتوز (*BAX* و *کاسپاز ۳*) را به‌طور قابل توجهی افزایش داد و به تجزیه DNA منجر شد، درحالی‌که بیان ژن‌های ضدآپوپتوز (*Bcl-2*) را کاهش داد. نکته جالب این بود که مصرف هم‌زمان سیر یا آلپورینول، پراکسیداسیون لیپیدی، اختلال آنتی‌اکسیدانی و آپوپتوز ناشی از فایبرونیل در بافت مغز را بهبود بخشید. در نتیجه، سیر و آلپورینول، آپوپتوز ناشی از فایبرونیل و آسیب اکسیداتیو بافتی را کاهش دادند که به احتمال قوی از طریق تقویت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بافت عمل می‌کنند [۲۷] که نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه ما همسو بود. در مطالعه‌ای دیگر، که نتایج آن با نتایج مطالعه ما همسو بود، اثر محافظتی عصاره ریشه پیاز و سیر در مدل رت مبتلا به بیماری آلزایمر بررسی شد. چندین گروه از رت‌های مبتلا شده به آلزایمر، دوزهای ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره پیاز یا سیر را از طریق گاواژ به‌مدت سی روز دریافت کردند. پس از درمان، آنالیز هیستوپاتولوژیک، بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز، بررسی آسیب DNA و تولید گونه‌های فعال اکسیژن در بافت‌های مغزی انجام شد. نتایج نشان داد که درمان رت‌های مبتلا به آلزایمر با دوزهای مختلف عصاره ریشه پیاز و سیر، میزان بیان *BAX* و *کاسپاز ۳* را کاهش و میزان بیان *Bcl-2* را افزایش داد. همچنین، ضایعات هیستوپاتولوژیک، میزان آسیب DNA و تولید گونه‌های فعال اکسیژن درون سلولی در بافت‌های مغزی کاهش یافت که حاکی از آن است که نقش محافظتی عصاره ریشه پیاز ممکن است ناشی از محتوای فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی آن از طریق بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تنظیم الگوهای بیان ژن باشد [۲۸].

نتیجه‌گیری

سمیت عصبی از طریق تزریق داخل صفاقی آکرلامید در کورتکس مغز رت‌های نر ویستار رخ داد. سمیت عصبی ناشی از آکرلامید موجب افزایش میزان پروتئین‌های *کاسپاز ۳* و کاهش میزان پروتئین *Bcl-2* در کورتکس مغز رت‌های نر ویستار شد. تجویز آکرلامید به رت‌ها در مقایسه با رت‌های دریافت‌کننده نرمال‌سالین در میزان پروتئین *BAX* تأثیر چندانی نداشت. همچنین، سمیت عصبی ناشی از آکرلامید موجب بروز آپوپتوز و نکروپتوز در سلول‌های کورتکس مغز رت نر ویستار شد. از طرفی، تیمار رت‌ها با سیر سبب افزایش چشمگیر میزان پروتئین *Bcl-2* شد. علاوه بر این، افزایش دوز سیر گاواژ شده در رت ویستار نر با القای بیشتر پروتئین *Bcl-2* همراه بود و نقش ضدآپوپتوزی بیشتری ایجاد کرد. نهایتاً، سمیت عصبی آکرلامید به ایجاد آپوپتوز در کورتکس مغز رت‌های نر ویستار منجر شد، اما تیمار با سیر توانست تمام این موارد را بهبود دهد و آسیب به بافت سیستم عصبی رت‌ها را کم کند.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر حاصل از رساله دانشجوی دکتری داروسازی نویسنده اول به راهنمایی آقایان دکتر کهریزی و دکتر تابش‌پور است.

استرس، *BAX* از سیتوزول به جدار خارجی میتوکندری منتقل می‌شود و با *Bcl-2*، هترودیمر تشکیل می‌دهد و با افزایش نفوذپذیری میتوکندری، سبب آزادسازی سیتوکروم *c* به سیتوپلاسم و ایجاد آپوپتوز می‌شود. در حالی‌که *Bcl-2* به استحکام و ثبات غشای میتوکندری کمک می‌کند و تعادل بین پروتئین‌های ضدآپوپتوز و شروع‌کننده آپوپتوز از خانواده *Bcl-2* در مقایسه با *Bax/Bcl2* در روند آپوپتوز نقش مهمی دارد [۸]. آزادسازی سیتوکروم *c* از میتوکندری باعث فعال‌سازی *کاسپاز ۹* می‌شود که این *کاسپاز*، *کاسپاز*های ۳ و ۷ را فعال می‌کند. این *کاسپاز*ها سبب تجزیه بسیاری از پروتئین‌ها می‌شوند و در نهایت، سلول دچار آپوپتوز می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که استرس اکسیداتیو و کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول سبب ایجاد مرگ سلولی آپوپتوزی و مسیر میتوکندریایی آپوپتوز با محرک‌های استرسی مثل استرس اکسیداتیو فعال می‌شود [۲۵]. از این‌رو، این مطالعه با هدف بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی سیر در مقابله با سمیت عصبی آکرلامید در رت‌های نر ژاد ویستار از طریق مسیر آپوپتوز انجام شد.

نتایج آنالیز باندهای وسترن‌بلات نشان داد که تجویز آکرلامید به‌تنهایی سبب افزایش بیان پروتئین‌های *کاسپاز ۳* و *Bcl-2* در مقایسه با گروه دریافت‌کننده نرمال‌سالین شد. باین‌حال، میزان بیان *BAX* بین این دو گروه تفاوت معنی‌داری نداشت. تیمار رت‌ها با آکرلامید و سیر با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم سبب افزایش معنی‌دار میزان پروتئین *Bcl-2* در مقایسه با گروه دریافت‌کننده نرمال‌سالین و آکرلامید به‌تنهایی شد. میزان *کاسپاز ۳* در گروه دریافت‌کننده سیر با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در مقایسه با گروه دریافت‌کننده آکرلامید تفاوت معنی‌داری نداشت، اما با اختلاف از گروه دریافت‌کننده نرمال‌سالین بیشتر بود. در تمامی تیمارها بهترین جواب‌ها به گروه تیمار شده با ویتامین E تعلق دارد که توانسته است به‌طور معنی‌دار سبب کاهش بیان *کاسپاز ۳* و افزایش معنی‌دار *Bcl-2* در مقایسه با همه گروه‌های تیمار شده شود. باین‌حال، تیمار با آکرلامید و ویتامین E نتوانست سبب تفاوت معنی‌داری در بیان *Bcl-2* در مقایسه با گروه دریافت‌کننده آکرلامید و دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم سیر شود.

نتایج مطالعه ما با مطالعه‌ای همسو بود که *Rahbardi* و همکاران درباره سمیت ناشی از آکرلامید و آثار آن در پروتئین‌های مسیر آپوپتوز انجام دادند. در این مطالعه، دو گروه شاهد و مورد تحت تزریق داخل صفاقی با آکرلامید با دوز ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم قرار گرفتند. بررسی‌های آن‌ها نشان داد که آکرلامید باعث اختلالات حرکتی می‌شود. همچنین، در گروه آکرلامید در مقایسه با گروه کنترل میزان نسبت *Bax/Bcl-2* افزایش و *کاسپاز ۳* کلیواژ شده افزایش یافت. در نتیجه در حضور آکرلامید، آپوپتوز در سلول‌های عصبی افزایش یافت [۲۶].

در مطالعه‌ای دیگر، نشان داده شد که فایبرونیل می‌تواند باعث آسیب اکسیداتیو بافتی و آپوپتوز شود. در واقع، هدف این بود که اثر ضدآپوپتوز سیر یا آلپورینول در برابر سمیت عصبی ناشی از فایبرونیل ارزیابی شود. برای این منظور، ۳۶ رت نر بالغ به گروه‌های زیر تقسیم شدند: کنترل، عصاره آبی سیر (۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، آلپورینول (۱۳/۲۷۷ میلی‌گرم بر لیتر در آب آشامیدنی)، فایبرونیل (۱۳/۲۷۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، سیر + فایبرونیل و آلپورینول + فایبرونیل. نتایج نشان داد که فایبرونیل موجب افزایش معنادار مالون‌دی‌آلدید مغز،

ملاحظات اخلاقی

تمامی مراحل با رعایت اصول اخلاقی تأییدشده کمیته اخلاق پژوهش‌های زیست‌پزشکی با کد اخلاق IR.IAU.DAMGHAN.REC.1403.025 انجام شد.

تضاد منافع

در این مقاله هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

مشارکت نویسندگان

حورا عیوضلو: انجام کارهای عملی و نگارش اولیه مقاله
فرزاد کهریزی: اصلاح مقاله
جمشید تابش پور: پیشنهاد ایده مقاله، مفهوم کلی و فراهم کردن چارچوب مقاله، و نیز اصلاح و ویرایش نهایی مقاله

حمایت مالی

از دانشگاه آزاد اسلامی دامغان جهت فراهم نمودن شرایط و مجوز استفاده از تجهیزات آزمایشگاهی تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

References

- Mehri S, Meshki MA, Hosseinzadeh H. Linalool as a neuroprotective agent against acrylamide-induced neurotoxicity in Wistar rats. *Drug Chem Toxicol*. 2015;38(2):162-166. [DOI: 10.3109/01480545.2014.919585] [PMID: 24844946]
- Sharma A, Jain J. Effects of oral exposure of acrylamide on plasma levels of thyroid hormones and haematological parameters in Swiss albino mice. *Asian J Exp Sci*. 2008;22(3):317-324. [Link]
- Teodor V, Cuciureanu M, Filip C, Zamosteanu N, Cuciureanu R. Protective effects of selenium on acrylamide toxicity in the liver of the rat: effects on oxidative stress. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2011;115(2):612-618. [PMID: 21870766]
- Motamedshariaty VS, Amel Farzad S, Nassiri-Asl M, Hosseinzadeh H. Effects of rutin on acrylamide-induced neurotoxicity. *Daru*. 2014;22(1):27. [DOI: 10.1186/2008-2231-22-27] [PMID: 24524427]
- Jangir BL, Mahaprabhu R, Rahangadale S, Bhandarkar AG, Kurkure NV. Neurobehavioral alterations and histopathological changes in brain and spinal cord of rats intoxicated with acrylamide. *Toxicol Ind Health*. 2016;32(3):526-540. [DOI: 10.1177/0748233713505893] [PMID: 24193052]
- Zhang X, Chen F, Huang Z. Apoptosis induced by acrylamide is suppressed in a 21.5% fat diet through a caspase-3-independent pathway in mice testis. *Toxicol Mech Methods*. 2009;19(3):219-224. [DOI: 10.1080/15376510802499048] [PMID: 19750022]
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516. [DOI: 10.1080/01926230701320337] [PMID: 17562483]
- Crompton M. Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*. 2000;12(4):414-419. [DOI: 10.1016/s0955-0674(00)00110-1] [PMID: 10873816]
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998;281(5381):1312-1316. [DOI: 10.1126/science.281.5381.1312] [PMID: 9721091]
- Rodríguez-Ramiro I, Martín M, Ramos S, Bravo L, Goya L. Olive oil hydroxytyrosol reduces toxicity evoked by acrylamide in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress. *Toxicology*. 2011;288(1-3):43-48. [DOI: 10.1016/j.tox.2011.07.002] [PMID: 21777647]
- Lakshmi D, Gopinath K, Jayanthi G, Anjum S, Prakash D, Sudhandiran G. Ameliorating effect of fish oil on acrylamide-induced oxidative stress and neuronal apoptosis in cerebral cortex. *Neurochem Res*. 2012;37(9):1859-1867. [DOI: 10.1007/s11064-012-0794-1] [PMID: 22648048]
- Zhang L, Zhang H, Miao Y, Wu S, Ye H, Yuan Y. Protective effect of allicin against acrylamide-induced hepatocyte damage in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(9):3306-3312. [DOI: 10.1016/j.fct.2012.05.060] [PMID: 22705327]
- Mehri S, Abnous K, Mousavi SH, Shariaty VM, Hosseinzadeh H. Neuroprotective effect of crocin on acrylamide-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2012;32(2):227-235. [DOI: 10.1007/s10571-011-9752-8] [PMID: 21901509]
- Rahangadale S, Jangir BL, Patil M, Verma T, Bhandarkar A, Sonkusale P, et al. Evaluation of protective effect of vitamin E on acrylamide-induced testicular toxicity in Wistar rats. *Toxicol Int*. 2012;19(2):158-161. [DOI: 10.4103/0971-6580.97216] [PMID: 22778514]
- Moosavi T, Zakavi A, Hosseinivaliki F, Fakhar M, Rafiei A, Alizadeh-Navaei R, et al. Nutritional properties of garlic according to traditional and modern medicine: a review study. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2016;26(139):227-245. [Link]
- Tabeshpour J, Mehri S, Abnous K, Hosseinzadeh H. Neuroprotective effects of thymoquinone in acrylamide-induced peripheral nervous system toxicity through MAP kinase and apoptosis pathways in rat. *Neurochem Res*. 2019;44(5):1101-1112. [DOI: 10.1007/s11064-019-02741-4] [PMID: 30725239]
- Aprioku J, Amah-Tariah F. Garlic (*Allium sativum* L.) protects against hepatic and renal toxicity of alloxan in rats. *J Pharm Res Int*. 2017;17(6):1-7. [DOI: 10.9734/JPRI/2017/34909]
- Allen JW, Verkerke H, Owens J, Saedi B, Boyer D, Shin S, et al. Serum pooling for rapid expansion of anti-SARS-CoV-2 antibody testing capacity. *Transfus Clin Biol*. 2021;28(1):51-54. [DOI: 10.1016/j.traci.2020.10.008] [PMID: 33096207]
- LoPachin RM, Barber DS. Synaptic cysteine sulfhydryl groups as targets of electrophilic neurotoxins. *Toxicol Sci*. 2006;94(2):240-255. [DOI: 10.1093/toxsci/kfl066] [PMID: 16880199]
- LoPachin RM, Ross JF, Lehning EJ. Nerve terminals as the primary site of acrylamide action: a hypothesis. *Neurotoxicology*. 2002;23(1):43-59. [DOI: 10.1016/s0161-813x(01)00074-2] [PMID: 12164547]
- Subroto E, Cahyana Y, Tensiska M, Lembong F, Filianty E, Kurniati E, et al. Bioactive compounds in garlic (*Allium sativum* L.) as a source of antioxidants and its potential to improve the immune system: a review. *Food Res*. 2021;5(6):1-11. [DOI: 10.26656/fr.2017.5(6).042]
- Jang MH, Shin MC, Shin HS, Kim KH, Park HJ, Kim EH, et al. Alcohol induces apoptosis in TM3 mouse Leydig cells via Bax-dependent caspase-3 activation. *Eur J Pharmacol*. 2002;449(1-2):39-45. [DOI: 10.1016/s0014-2999(02)01973-8] [PMID: 12163104]
- Tanel A, Averill-Bates DA. Activation of the death receptor pathway of apoptosis by the aldehyde acrolein. *Free Radic Biol Med*. 2007;42(6):798-810. [DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.12.009] [PMID: 17320762]
- Liu B, Jian Z, Li Q, Li K, Wang Z, Liu L, et al. Baicalein protects human melanocytes from H₂O₂-induced apoptosis via inhibiting mitochondria-dependent caspase activation and the p38 MAPK pathway. *Free Radic Biol Med*. 2012;53(2):183-193. [DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.015] [PMID: 22569306]
- Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovskiy B. Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;266(3):699-717. [DOI: 10.1006/bbrc.1999.1888] [PMID: 10603308]
- Ghasemzadeh Rahbardar M, Hemadbeh B, Razavi BM, Eisvand F, Hosseinzadeh H. Effect of carnosic acid on acrylamide-induced

- neurotoxicity: in vivo and in vitro experiments. *Drug Chem Toxicol.* 2022;45(4):1528-1535. [DOI: [10.1080/01480545.2020.1845715](https://doi.org/10.1080/01480545.2020.1845715)] [PMID: 33213219]
27. Bakr AA, Ali M, Ibrahim K. Garlic and allopurinol alleviate the apoptotic pathway in rats' brain following exposure to fipronil insecticide. *Environ Anal Health Toxicol.* 2022;37(4):e2022037. [DOI: [10.5620/eah.2022037](https://doi.org/10.5620/eah.2022037)] [PMID: 36916050]
28. Hegazy EM, Sabry A, Khalil WKB. Neuroprotective effects of onion and garlic root extracts against Alzheimer's disease in rats: antimicrobial, histopathological, and molecular studies. *BioTechnologia (Pozn).* 2022;103(2):153-167. [DOI: [10.5114/bta.2022.116210](https://doi.org/10.5114/bta.2022.116210)] [PMID: 36606073]