مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
دوره ۱۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷

مقاله پژوهشی

بررسی اثر محافظت عصبی عصاره اتانولی خارمریم (*Silybum marianum*) در سمیت عصبی ناشی از آکریل آمید: مطالعات برون تنی و درون تنی

صغری مهری [۱]، یاسر عمر رواس [۲]، فائزه وحدتی حسنی [۳]، غلامرضا کریمی [۴]، حسین حسین‌زاده [۴،*]

[۱] استادیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[۲] دکترای حرفه‌ای، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[۳] Ph.D سم شناسی، گروه فارماکودینامی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[۴] استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[*] **نویسنده مسئول:** حسین حسین زاده، استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. ایمیل: hosseinzadehh@mums.ac.ir

DOI: 10.29252/nkjmd-010017

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۰۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۲۰

واژگان کلیدی:
آکریل‌آمید
خارمریم
سمیت عصبی
آنتی اکسیدان

چکیده

مقدمه: آکریل آمید کاربرد فراوانی در صنعت دارد و در غذاهای غنی از نشاسته و پروتئین که در دمای بالا طبخ می‌شود تشکیل می‌شود. این ترکیب دارای سمیت عصبی است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات حفاظتی احتمالی عصاره اتانولی خارمریم در مقابل سمیت عصبی ناشی از آکریل آمید در مطالعات برون تنی (سلول‌های PC12) و درون تنی (رت) می‌باشد.

روش کار: اثرات عصاره خارمریم در جلوگیری از سمیت آکریل آمید در سلولهای PC12 با تست MTT ارزیابی شد. به گروه‌های مختلف حیوانی آکریل‌آمید با دوز ۵۰ میلی گرم برکیلوگرم، دوزهای ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره اتانولی خارمریم همزمان با تجویز آکریل‌آمید و ویتامین E به عنوان کنترل مثبت به صورت داخل صفاقی و به مدت ۱۱ روز (روزی یکبار) تجویز گردید. پس از اتمام دوره تجویز در حیوانات امتیاز راه رفتن تعیین شد.

یافته‌ها: با افزایش غلظت آکریل آمید میزان زنده ماندن سلول‌ها در مدت زمان ۲۴ ساعت کاهش یافت. عصاره خارمریم در تمامی غلظت‌ها پس از ۲۴ ساعت مجاورت با سلول‌ها باعث کاهش سمیت ناشی از آکریل آمید گردید. تجویز آکریل آمید باعث ایجاد اختلالات حرکتی قابل توجه در حیوانات شد. تجویز عصاره اتانولی خارمریم (۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) باعث بهبود حرکات حیوانات در مقایسه با گروه دریافت کننده آکریل آمید شد.

نتیجه گیری: عصاره اتانولی گیاه خارمریم قادر است سمیت عصبی ناشی از آکریل آمید را کاهش دهد. بخشی از اثرات محافظت عصبی این ترکیب می‌تواند از طریق اثر آنتی اکسیدانی باشد.

مقدمه

آکریل آمید ACR (CH2=CH– CO– NH2; 2-propenamide) عضو خانواده آلدئیدهای α و β غیر اشباع و آلکنهای Type 2 می‌باشد [۱]. این ترکیب به راحتی پلیمریزه می‌شود و تولید پلی آکریل آمید می‌کند که دارای کاربرد فراوانی در صنایع مختلف از جمله تصفیه فاضلابها، تهیه رنگها، تهیه محصولات آرایشی بهداشتی و تهیه ژل‌های الکتروفورز جهت جداسازی و خالص سازی پروتئینها در آزمایشگاههای بیولوژی می‌باشد [۱، ۲]. علاوه بر استفاده این ترکیب در صنعت و آزمایشگاه‌ها، افراد به صورت عمومی در معرض آکریل آمید از طریق رژیم غذایی قرار می‌گیرند زیرا در آوریل ۲۰۰۲ دانشگاه استکهلم اعلام کرد این ترکیب در غذاهای غنی از نشاسته و پروتئین که در دمای بالاتر از ۱۲۰° C تهیه می‌شوند، بوجود می‌آید [۳، ۴]. آکریل آمید مونومر به عنوان ترکیب سمی مد نظر می‌باشد و اثر نهایی و مهم آن سمیت عصبی در انسانها و حیوانات، سمیت دستگاه تولید مثل، سمیت ژنتیکی و سرطانزایی در جوندگان می‌باشد [۳-۵]. این ترکیب بر سیستم عصبی مرکزی و محیطی تأثیر می‌گذارد. علائم سمیت شامل: آتاکسی، ضعف عضلات اسکلتی دیستال، کرختی دستها و پاها و خستگی می‌باشد. در حیوانات آزمایشگاهی علائم عصبی ایجاد می‌کند که در بسیاری از جنبه‌ها مشابه سمیت عصبی است که در انسانها رخ می‌دهد [۴، ۶]. با توجه به اهمیت سمیت عصبی ناشی از آکریل آمید، مطالعات مختلف برون تنی و درون تنی در جهت یافتن مکانیسم‌های دخیل در این سمیت انجام شده است. کاهش محتوای گلوتاتیون و افزایش میزان لیپید پراکسیداسیون در بافت مغز [۷]، تغییر در سطح پروتئینهای دخیل در آپوپتوز (Bax، Bcl-2 و Caspase3) در بخشهای مختلف مغز [۸]، تورم

و دژنراسیون نواحی انتهایی آکسونی [۹] از جمله مکانیسم‌های دخیل در سمیت عصبی ناشی از آکریل آمید می‌باشد. با توجه به اینکه القاء استرس اکسیداتیو نقش مهمی در سمیت عصبی آکریل آمید دارد، مطالعه روی ترکیبات با خاصیت آنتی اکسیدانی جهت مهار سمیت این ترکیب ضروری به نظر می‌رسد. در مطالعات قبلی ما اثرات آنتی اکسیدان های مهم مثل کروسین [۷، ۱۰]، لینالول[۱۱] ، تیموکینون [۱۲] و کریزین [۱۳] در سمیت عصبی آکریل آمید بررسی و نتایج قابل توجهی در کاهش سمیت این ترکیب بدست آمد. گیاه خار مریم (*Silybum marianum* یا Milk thistle) در اصل بومی آسیا و جنوب اروپا بوده ولی امروزه در سرتاسر دنیا یافت می‌شود. اثرات دارویی این گیاه به علت وجود گروهی از فلاوونولیگنان هایی است که به آن سیلی مارین گفته می‌شود. سیلی مارین ترکیبی از انواع مختلف فلاوونوئیدها، ترکیبات محلول در آب و محلول در الکل می‌باشد. دانه‌های گیاه خارمریم منبعی خوب از ۵ نوع فلاوونوئید به نام‌های سیلی بین، ایزوسیلی بین، سیلی دیانین، سیلی کریستین و تاکسی فولین می‌باشند [۱۴، ۱۵]. این گیاه در طب سنتی دارای کاربردهای فراوانی بوده است که از جمله به موارد زیر می‌توان اشاره کرد: ضد حساسیت، ضد قارچ، ضد سمیت کبدی، ضد التهاب، آنتی اکسیدان، ملین، هضم کننده غذا، پایین آورنده چربی خون، پایین آورنده کلسترول [۱۵-۱۷].

اثرات آنتی اکسیدانی و محافظت عصبی خارمریم و سیلی مارین در مطالعات مختلف مورد توجه قرار گرفته است. همچنین با توجه به نفوذ خوب سیلی مارین از سد خونی-مغزی، این ترکیب در درمان سمیت عصبی هم می‌تواند مورد توجه قرار گیرد [۱۸، ۱۹]. پیش درمانی سلولهای آستروسیتی C6 با عصاره خارمریم که در مواجهه با مورفین قرار گرفته بودند، باعث افزایش میزان زنده ماندن سلول‌ها و افزایش سطوح گلوتاتیون شد. همچنین نشان داده شد که این گیاه نه تنها اثرات حفاظتی دارد بلکه هیچ گونه اثرات سمی نداشته و به عنوان یک جاروبگر قدرتمند رادیکال‌های آزاد فعالیت می‌کند [۲۰]. تجویز عصاره خارمریم از طریق کاهش پراکسیداسیون چربی در بافت هیپوکامپ رت های دیابتی، باعث افزایش یادگیری و بهبود حافظه کوتاه مدت شد [۲۱]. همچنین عصاره متانولی گیاه خار مریم توانست اثرات حفاظتی بسیار خوبی در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از H_2O_2 از خود نشان دهد [۲۲]. تجویز سیلی مارین به صورت قابل توجهی باعث کاهش تجمع پلاکهای آمیلوئید بتا و بهبود عملکرد حافظه در مدل آلزایمر ناشی از تجویز آمیلوئید بتا در رت شد[۲۳]. با توجه به اهمیت نقش استرس اکسیداتیو در سمیت عصبی ناشی از آکریل آمید و همچنین اثرات آنتی اکسیدانی و محافظت عصبی خارمریم، در مطالعه کنونی اثرات حفاظتی عصاره خارمریم در سمیت عصبی آکریل آمید در مدل برون تنی (سلول‌های PC12) و درون تنی (رت) مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

جهت این مطالعه آکریل آمید و رنگ MTT (مرک-آلمان) مورد استفاده قرارگرفت. در ابتدا عصاره اتانولی خار مریم تهیه شد. بدین منظور گیاه خار مریم از مزرعه نمونه دانشکده کشاورزی، اول جاده سرخس جمع آوری شد. برای تهیه عصاره اتانولی خارمریم، از روش سوکسله استفاده شد. به عنوان حلال استخراج، اتانول مطلق مورد استفاده قرار گرفت. پیش از استخراج عصاره گیاه، جهت افزایش بازده عصاره گیری، چربی زدایی با پترولئوم اتر صورت گرفت [۲۴، ۲۵]. جهت مطالعه برون تنی از رده سلولی PC12 استفاده شد. این رده سلولی از انیستیتو پاستور تهران تهیه شد. سلول‌های PC12 به صورت یک لایه چسبنده به سطح (با درجه چسبندگی کم) در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ که حاوی ۱۰٪ حجمی/حجمی سرم جنین گاوی که قبلاً غیر فعال شده است، پنی سیلین (۱۰۰ واحد در میلی لیتر)، استرپتومایسین (۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر) می‌باشد کشت داده شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و CO_2 ۵٪ نگهداری شد. محیط کشت سلول‌ها بسته میزان رشد آن‌ها هر ۲ تا ۳ روز تعویض شد. جهت بررسی اثر ترکیبات بر درصد بقا و زنده‌مانی سلولها از روش MTT استفاده شد. جهت بررسی اثرات سمی آکریل‌آمید، ابتدا سلول‌های PC12 با تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک کاشته شدند. بعد از ۲۴ ساعت آکریل آمید با غلظت‌های ۱ تا ۲۰ میلی مولار (تهیه شده در PBS) به سلول‌ها اضافه شد. بعد از زمان مجاورت ۲۴ ساعت، معرف MTT با غلظت نهایی ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر به هر خانه در پلیت اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۲ تا ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. سپس محلول رویی خارج شد و ۲۰۰ - ۱۰۰ میکرولیتر از DMSO به عنوان حلال فورمازان اضافه شد. بعد از حل شدن کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان، جذب پلیت توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۴۵ نانومتر در مقابل ۶۳۰ نانومتر خوانده شد [۱۰]. بعد از محاسبات مربوطه IC_{50} ترکیب آکریل‌آمید برای زمان مورد نظر تعیین شد. اثرات عصاره خار مریم به تنهایی بر سلول‌های PC12 نیز بررسی شد. بدین منظور ابتدا سلول‌های PC12 به تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک کاشته شدند. بعد از زمان مجاورت ۲۴ ساعت، غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر این عصاره به سلولها اضافه شدند. بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت مواجهه با عصاره، درصد بقا سلولی با روش MTT ارزیابی شد. برای بررسی اثرات حفاظتی عصاره خار مریم در سمیت ناشی از آکریل‌آمید در سلول‌های PC12، ابتدا سلول‌ها در معرض غلظت‌هایی از عصاره گیاه که فاقد اثر سمی بر سلول‌ها بود قرار گرفت. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، آکریل آمید با غلظت ۵ میلی مولار (IC_{50}: غلظتی که باعث مرگ و میر در ۵۰٪ سلول‌ها شد) اضافه شد و بعد از ۲۴ ساعت مجاورت با سلول‌ها، میزان بقاء سلول‌ها با روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت مطالعه درون تنی از در این مطالعه از رت های نر گونه ویستار با وزن ۲۳۰ تا ۲۵۰ گرم که در بخش تکثیر اتاق حیوانات دانشکده داروسازی مشهد پرورش یافته‌اند استفاده شد. این حیوانات در بازه دمایی ۲۵-۲۲ درجه سانتی گراد و شرایط نوری به شکل ۱۲ ساعت تاریکی،۱۲ ساعت روشنایی و بدون محدودیت دسترسی به آب و غذا نگهداری شدند. شرایط نگهداری حیوانات مطابق قوانین کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد (کد طرح:۸۹۶۶۳) بود. برای ایجاد سمیت عصبی در حیوانات رت نر دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم آکریل آمید به صورت داخل صفاقی به مدت ۱۱ روز (روزی یکبار) تجویز شد [۴، ۷]. جهت بررسی اثرات حفاظتی عصاره در سمیت عصبی ناشی از آکریل آمید از دوزهای ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی استفاده شد [۲۶]. گروه‌های مورد آزمایش به صورت زیر مورد بررسی قرار گرفتند (تعداد حیوانات در هر گروه ۷ می‌باشد):

گروه اول: حیوانات رت نر دریافت کننده حامل (گروه کنترل)، گروه دوم: حیوانات رت نر دریافت کننده دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم آکریل آمید، گروه سوم: حیوانات رت نر دریافت کننده دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم آکریل آمید + عصاره خارمریم با دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، گروه چهارم: حیوانات رت نر دریافت کننده دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم آکریل آمید + عصاره خارمریم با دوز ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، گروه پنجم:

حیوانات رت نر دریافت کننده دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم آکریل آمید + عصاره خار مریم با دوز ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، گروه ششم: حیوانات رت نر دریافت کننده عصاره خارمریم با دوز ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، گروه هفتم: حیوانات رت نر دریافت کننده ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم آکریل آمید + ویتامین E با دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم (روز در میان) (گروه کنترل مثبت) [۱۲].

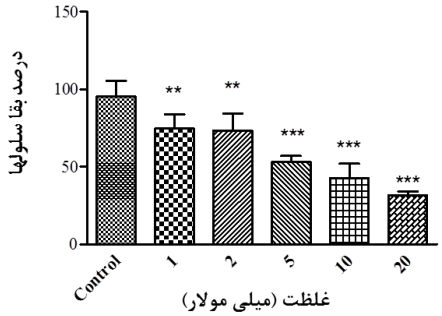
بعد از اتمام دوره تجویز، آزمون شاخص رفتاری تعیین شد. رت‌ها به ترتیب در جعبه‌ای به ابعاد ۱۰۰ cm × ۱۰۰ cm × ۱۰۰ cm گذاشته و حرکات هر یک به مدت ۳ دقیقه تحت نظر گرفته شد. حرکات رت‌ها به صورت زیر درجه بندی شد:

۱- گام برداشتن و راه رفتن طبیعی بود.
۲- گام برداشتن و راه رفتن در حد جزئی تحت تأثیر قرار گرفته بود که ضعف و سستی جزئی اندام‌های عقبی مشهود بود.
۳- گام برداشتن و راه رفتن در حد متوسط تحت تأثیر قرار گرفته بود که ضعف و سستی متوسط اندام‌های عقبی مشهود بود.
۴- گام برداشتن و راه رفتن شدیداً تحت تأثیر قرار گرفته و فلج اندام تحتانی ایجاد شده بود [۱۱، ۲۷، ۲۸].

محاسبات آماری توسط برنامه نرم افزاری Prism 6 انجام گرفت. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده‌اند. جهت مقایسه بین گروه‌های مختلف در مطالعه سلولی از تست آماری ANOVA و Post test Tukey-Kramer استفاده شد و $P < ۰/۰۵$ به عنوان تفاوت معنی دار در نظر گرفته شد. در آزمون رفتاری، داده‌ها به صورت Median with range نمایش داده شد و از آزمون غیر پارامتریک Kruskal - Wallis استفاده شد.

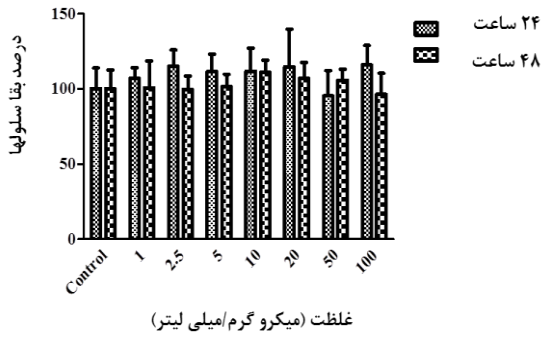
یافته‌ها

نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف آکریل آمید بر روی رده سلولی PC12 نشان داد که با افزایش غلظت آکریل آمید اثر سمیت روی سلول‌ها به تدریج افزایش یافته است. نتایج بیانگر آن است اثر سمیت آکریل‌آمید روی سلول‌های رده PC12 وابسته به غلظت است (تصویر ۱).



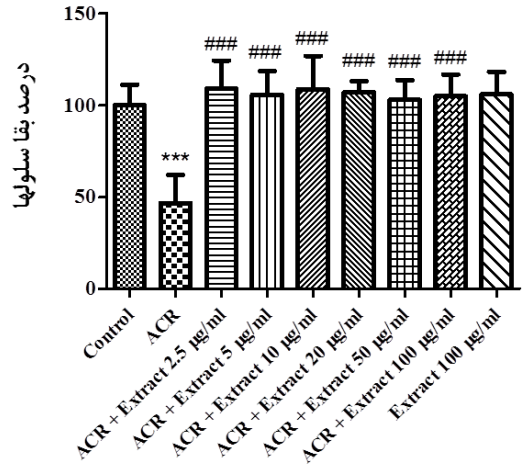
تصویر ۱: اثر غلظت‌های مختلف آکریل‌آمید بر سلول‌های PC12 طی مدت زمان ۲۴ ساعت. داده‌ها به شکل میانگین ± انحراف معیار حاصل از ۳ آزمایش جداگانه می‌باشد (تعداد تکرار در هر آزمایش ۵ می‌باشد). از آزمون آماری ANOVA و Post test Tukey-Kramer جهت بررسی سطح اختلاف آماری گروه‌ها نسبت به گروه کنترل استفاده شده است. $P < ۰/۰۰۱$ *** و $P < ۰/۰۱$ ** در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد.

پس از انجام محاسبات با نرم افزار Prism، IC_{50} آکریل آمید برابر ۵ میلی مولار بدست آمد. نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی خار مریم بر روی رده سلولی PC12 نشان داد که که غلظتهای ۲/۵ تا ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر از عصاره بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت مواجهه اثری بر حیات سلولها ندارد (تصویر ۲).



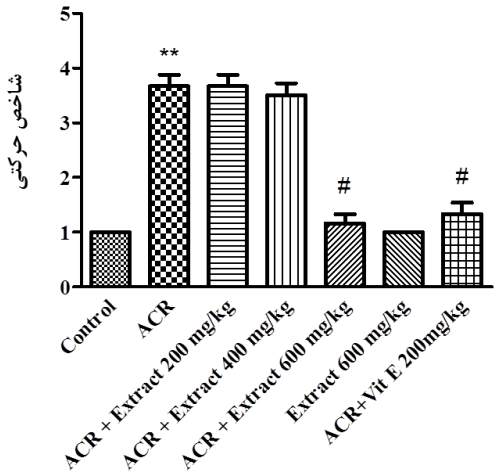
تصویر ۲: اثر غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی خار مریم بر سلول‌های PC12 طی مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت. داده‌ها به شکل میانگین ± انحراف معیار صورت حاصل از ۳ آزمایش جداگانه می‌باشد (تعداد تکرار در هر آزمایش ۵ می‌باشد). از آزمون آماری ANOVA جهت بررسی سطح اختلاف آماری گروه‌ها نسبت به گروه کنترل استفاده شد.

پیش درمانی سلولها با غلظتهای مختلف عصاره اتانولی خارمریم (۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر) به مدت ۲۴ ساعت به شکل قابل توجهی باعث کاهش مرگ سلولی ناشی از آکریل آمید را کاهش داد ($P < ۰/۰۰۱$) (تصویر ۳).



تصویر ۳: اثر عصاره اتانولی خارمریم بر سمیت ناشی از آکریل آمید بعد از ۲۴ ساعت مجاورت با سلول‌های PC12. داده‌ها به شکل میانگین ± انحراف معیار حاصل از ۳ آزمایش جداگانه می‌باشد (تعداد تکرار در هر آزمایش ۵ می‌باشد). از آزمون آماری ANOVA و Tukey-Kramer Post test جهت بررسی سطح اختلاف آماری

گروه‌ها نسبت به گروه کنترل استفاده شده است. ۰/۰۰۱ > P ***
در مقایسه با کنترل و ۰/۰۰۱ > P ### در مقایسه با آکریل‌آمید می‌باشد. (ACR: آکریل آمید، Extract: عصاره اتانولی خارمریم).
در مطالعه درون تنی اثر عصاره اتانولی خارمریم بر تغییرات حرکتی ناشی از آکریل آمید در رت بررسی شد. نتایج نشان داد تجویز آکریل آمید با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی باعث ایجاد اختلالات حرکتی قابل توجه در حیوانات شد (۰/۰۱ > P در مقایسه با گروه کنترل). تجویز عصاره اتانولی خارمریم با دوز ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت قابل توجهی باعث بهبود حرکات حیوانات در مقایسه با گروه دریافت کننده آکریل آمید گردید (۰/۰۵ > P). همچنین تجویز ویتامین E به عنوان کنترل مثبت اختلالات حرکتی ناشی از آکریل آمید را بهبود بخشید و تفاوت قابل توجهی بین اثرات ناشی از ویتامین E و سیلی مارین در دوز ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وجود نداشت (تصویر ۴).



تصویر ۴: اثر عصاره اتانولی خارمریم بر اختلالات حرکتی ناشی از آکریل آمید در رت. داده‌ها به صورت Median with range نشان داده شده است. تست غیر پارامتریک Kruskal Wallis جهت بررسی اختلاف آماری استفاده شده است. تعداد حیوانات در هر گروه ۷ می‌باشد. ۰/۰۱ > P ** در مقایسه با کنترل و ۰/۰۵ > P # در مقایسه با آکریل آمید می‌باشد.

بحث

در این مطالعه اثرات حفاظتی عصاره اتانولی خارمریم در سمیت ناشی از آکریل آمید در دو مدل برون تنی (PC12) و درون تنی بررسی شد. در مدل دورن تنی، پیش درمانی سلولها با عصاره خارمریم به صورت قابل توجهی باعث کاهش سمیت آکریل آمید شد. در مدل درون تنی نیز تجویز عصاره اتنولی خارمریم توانست سمیت ناشی از آکریل آمید را کاهش دهد. در این مطالعه ابتدا از آکریل آمید به شکل درون تنی و با تزریق داخل صفاقی ۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم (یکبار در روز به مدت ۱۱ روز) جهت القاء سمیت عصبی در رت‌های نژاد ویستار نر استفاده شد. سپس دوزهای ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره اتانولی خارمریم به همراه دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم آکریل آمید به مدت ۱۱ روز به رت های نر تزریق گردید. با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که در میان ۳ دوز تست شده، عصاره اتانولی خارمریم با دوز ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم بیشترین اثر حفاظتی در برابر سمیت عصبی ناشی از آکریل‌آمید و مشابه با ویتامین E با دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از خود نشان داد. از مدل‌های مختلفی جهت ایجاد سمیت عصبی در حیوانات استفاده می‌شود [۲۹]، ولی تزریق آکریل آمید به مدت ۱۱ روز به رت و به شکل داخل صفاقی یکی از معتبرترین روش‌ها جهت ایجاد سمیت عصبی توسط آکریل‌آمید می‌باشد که در مطالعات مختلفی استفاده شده است [۱۱-۱۳]، به همین جهت از این روش برای ایجاد سمیت عصبی در حیوان استفاده گردید. شاخص قابل اطمینان جهت ایجاد سمیت عصبی در حیوان نیز انجام آزمون رفتاری نحوه حرکت حیوانات می‌باشد [۳۰]. در این مطالعه نشان داده شد که حرکات و راه رفتن رت‌های دریافت کننده آکریل آمید به شدت تحت تأثیر قرار گرفته و دچار مسمومیت بارز شده‌اند و به همین جهت در امتیازبندی عدد ۴ به آن‌ها تعلق گرفت. در این مطالعه نیز همانند مطالعات مشابه، مشخص شد که تجویز آکریل آمید با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به مدت ۱۱ روز به شدت گام برداشتن حیوانات را تحت تأثیر قرار داده و فلج اندام تحتانی در رت‌ها ایجاد شد. رت‌های دریافت کننده آکریل آمید به همراه عصاره اتانولی خارمریم با دوز ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم و نیز رت‌های دریافت کننده ویتامین E با دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به جهت داشتن خاصیت آنتی اکسیدانی توانستند سمیت عصبی آکریل آمید را به شکل معنی داری کاهش دهند و از ایجاد فلج اندام‌های تحتانی در رت‌ها جلوگیری کنند. همچنین تفاوت معنی دار بین اثرات حفاظتی عصاره خارمریم و ویتامین E (کنترل مثبت) در این مطالعه وجود نداشت، که این امر نشان می‌دهد عصاره خار مریم اثرات قابل توجهی در این مدل دارد. در مطالعه دیگری اثبات شده است که تجویز سیلی مارین با دوزهای ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم در رت‌های دریافت کننده آکریل‌آمید با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به مدت ۱۱ روز باعث کاهش سمیت عصبی ناشی از آکریل‌آمید گردید [۳۱]. نشان داده شده است که تجویز کروسین با افزایش محتوای گلوتاتیون و کاهش میزان لیپید پراکسیداسیون در بافت کورتکس مغز توانست سمیت عصبی آکریل آمید در رت را کاهش دهد (۶).

در مطالعه‌ای نشان داده شده است که تجویز داخل صفاقی نانوذرات تیتانیوم دی سولفید با دوز ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به مدت ۲ هفته باعث افزایش میزان آپوپتوز در سلول‌های طحال شد. تجویز خوراکی عصاره خارمریم با دوز ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم یک هفته قبل و یک هفته بعد از تجویز نانوذرات، درصد سلول‌های آپوپتوتیک را کاهش داد [۳۲]. تحقیقات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که دیابت ملیتوس باعث کاهش یادگیری، حافظه و مهارت‌های شناختی می‌شود. تجویز عصاره خارمریم با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از طریق کاهش پراکسیداسیون چربی در بافت هیپوکامپ رت های دیابتی باعث افزایش یادگیری و بهبود حافظه کوتاه مدت شد [۲۱]. در مدل بیماری پارکینسون پس از تجویز ۶-هیدروکسی دوپامین در رت‌ها، تجویز سیلی مارین با دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به شکل داخل صفاقی به مدت ۲ هفته توانست میزان لیپید پراکسیداسیون را کاهش و منجر

به تغییر در فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز در مغز این حیوانات گردد. سیلی مارین از طریق اثر بر استرس اکسیداتیو توانست اثرات حافظتی قابل توجهی در این مدل نشان دهد [۳۳]. در قسمت برون تنی این مطالعه غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر عصاره اتانولی خارمریم بر روی رده سلولی PC12 مورد آزمایش قرار گرفت که هیچ یک از این غلظت‌ها اثر سمی بر روی این رده سلولی نداشتند و در نتیجه به عنوان غلظت‌های مناسب جهت این مطالعه انتخاب شده بودند. مجاورت رده سلولی مذکور با عصاره خارمریم در تمامی غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر به مدت ۲۴ ساعت توانست سمیت ناشی از آکریل آمید را کاهش دهد. مجاورت سلولها با آکریل آمید از طریق افزایش گونه‌های فعال اکسیژن سمیت سلولی در سلولهای PC12 را افزایش داد در حالیکه مجاورت با کروسین از طریق مهار استرس اکسیداتیو سمیت سلولی را به صورت قابل توجهی کاهش داد [۱۰]. در مطالعه دیگری نشان داده شده است که پیش درمانی سلول‌های آستروسیتی C6 با عصاره خارمریم به میزان ۲۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر که در مواجهه با مورفین قرار گرفته بودند، باعث افزایش میزان زنده ماندن سلول‌ها و سطوح گلوتاتیون شد. همچنین نشان داده شد که این گیاه نه تنها اثرات حفاظتی از خود نشان داد بلکه هیچ گونه اثرات سمی نداشته و به عنوان یک جاروبگر قدرتمند رادیکال‌های آزاد فعالیت می‌کند [۲۰]. اثرات ایجاد استرس اکسیداتیو توسط ترکیب بنزو آلفا پیرن بر روی اریتروسیت های استخراج شده از خون انسانی مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه عصاره خارمریم و فلاوونولیگنان‌های آن شامل سیلی بینین، ایزوسیلی بینین، سیلی دیانین و سیلی کریستین فعالیت آنتی اکسیدانی خود را از طریق کاهش ROS نشان داد [۳۴]. در مدل بیماری آلزایمر که بر روی نورون‌های کشت داده شده کورتکس رت انجام گرفت سیلی مارین با غلظت ۱۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر باعث افزایش میزان Bcl-2 و کاهش میزان پروتئین Bax و Caspase 3 شد و از این طریق منجر به کاهش آپوپتوز و مهار پیشرفت تحلیل عصبی در بیماری آلزایمر گردید [۳۵]. در مطالعه دیگر مشاهده شد سیلی مارین با غلظت ۱۹۲-۱۲ میکروگرم در میلی لیتر سمیت ناشی از آکریل آمید در سلولهای PC12 را از طریق فعال کردن مسیر سیگنالینگ Nrf2 را کاهش داد [۳۶]. با توجه به موارد ذکر شده و اثرات آنتی اکسیدانی قوی خارمریم از یک سو و نقش مهم استرس اکسیداتیو در سمیت آکریل آمید به نظر می‌رسد اثرات قابل توجه حفاظت عصبی عصاره خارمریم در این مطالعه در مدل درون تنی و برون تنی از طریق مهار استرس اکسیداتیو باشد.

نتیجه گیری

عصاره اتانولی خارمریم در سمیت ناشی از آکریل آمید در مدل درون تنی (سلول‌های PC12) و مدل برون تنی (رت) اثرات محافظت عصبی قابل توجه نشان داد.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که حامی مالی این طرح بوده است (کد طرح: ۸۹۶۶۳) تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

References

1. Friedman M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. J Agric Food Chem. 2003; 51(16):4504-26. DOI: 10.1021/jf030204+ PMID: 14705871
2. Shipp A, Lawrence G, Gentry R, McDonald T, Bartow H, Bounds J, et al. Acrylamide: review of toxicity data and dose-response analyses for cancer and noncancer effects. Crit Rev Toxicol. 2006;36(6-7):481-608. DOI: 10.1080/10408440600851377 PMID: 16973444
3. Parzefall W. Minireview on the toxicity of dietary acrylamide. Food Chem Toxicol. 2008;46(4):1360-4. DOI: 10.1016/j.fct.2007.08.027 PMID: 17905504
4. LoPachin RM. Acrylamide neurotoxicity: neurological, morhological and molecular endpoints in animal models. Chemistry and safety of acrylamide in food: Springer; 2005. p. 21-37.
5. Lai SM, Gu ZT, Zhao MM, Li XX, Ma YX, Luo L, et al. Toxic effect of acrylamide on the development of hippocampal neurons of weaning rats. Neural Regen Res. 2017; 12(10):1648-54. DOI: 10.4103/1673-5374.217345 PMID: 29171430
6. Pruser KN, Flynn NE. Acrylamide in health and disease. Front Biosci (Schol Ed). 2011;3:41-51. PMID: 21196355
7. Mehri S, Abnous K, Khooei A, Mousavi SH, Shariaty VM, Hosseinzadeh H. Crocin reduced acrylamide-induced neurotoxicity in Wistar rat through inhibition of oxidative stress. Iran J Basic Med Sci. 2015;18(9):902-8. PMID: 26523222
8. Li SX, Cui N, Zhang CL, Zhao XL, Yu SF, Xie KQ. Effect of subchronic exposure to acrylamide induced on the expression of bcl-2, bax and caspase-3 in the rat nervous system. Toxicology. 2006;217(1):46-53. DOI: 10.1016/j.tox.2005.08.018 PMID: 16242231
9. LoPachin RM. The changing view of acrylamide neurotoxicity. Neurotoxicology. 2004;25(4):617-30. DOI: 10.1016/j.neuro.2004.01.004 PMID: 15183015
10. 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):227-35. DOI: 10.1007/s10571-011-9752-8 PMID: 21901509
11. Mehri S, Meshki MA, Hosseinzadeh H. Linalool as a neuroprotective agent against acrylamide-induced neurotoxicity in Wistar rats. Drug Chem Toxicol. 2015; 38(2):162-6. DOI: 10.3109/01480545.2014.919585 PMID: 24844946
12. Mehri S, Shahi M, Razavi BM, Hassani FV, Hosseinzadeh H. Neuroprotective effect of thymoquinone in acrylamide-induced neurotoxicity in Wistar rats. Iran J Basic Med Sci. 2014;17(12):1007-11. PMID: 25859305
13. Mehri S, Karami HV, Hassani FV, Hosseinzadeh H. Chrysin reduced acrylamide-induced neurotoxicity in both in vitro and in vivo assessments. Iran Biomed J. 2014;18(2):101-6. PMID: 24518551
14. Subramaniam S, Vaughn K, Carrier DJ, Clausen EC. Pretreatment of milk thistle seed to increase the silymarin yield: an alternative to petroleum ether defatting. Bioresour Technol. 2008;99(7):2501-6. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.04.071 PMID: 17624768
15. Abenavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. Phytother Res. 2010; 24(10):1423-32. DOI: 10.1002/ptr.3207 PMID: 20564545
16. Varma PN, Talwar SK, Garg GP. Chemical Investigation of Silybum-Marianum. Plant Med. 1980;38(4):377-83. DOI: 10.1055/s-2008-1074893

17. Hackett ES, Twedt DC, Gustafson DL. Milk thistle and its derivative compounds: a review of opportunities for treatment of liver disease. J Vet Intern Med. 2013;27(1):10-6. DOI: 10.1111/jvim.12002 PMID: 23140176
18. Devi KP, Malar DS, Braidy N, Nabavi SM, Nabavi SF. A Mini Review on the Chemistry and Neuroprotective Effects of Silymarin. Curr Drug Targets. 2017;18(13):1529-36. DOI: 10.2174/1389450117666161227125121 PMID: 28025940
19. Hirayama K, Oshima H, Yamashita A, Sakatani K, Yoshino A, Katayama Y. Neuroprotective effects of silymarin on ischemia-induced delayed neuronal cell death in rat hippocampus. Brain Res. 2016;1646:297-303. DOI: 10.1016/j.brainres.2016.06.018 PMID: 27312091
20. Badisa RB, Fitch-Pye CA, Agharahimi M, Palm DE, Latinwo LM, Goodman CB. Milk thistle seed extract protects rat C6 astroglial cells from acute cocaine toxicity. Mol Med Rep. 2014;10(5):2287-92. DOI: 10.3892/mmr.2014.2524 PMID: 25174449
21. Roghani M, Khalili M, Baluchnejadmojarad T, Ahmadi M. Protective effect of silymarin on learning and memory deficiency in streptozotocin-diabetic Rats. J Gorgan Uni Med Sci. 2013;15(2):35-41.
22. Ali A, Rahman K, Shahid M, Arshad M. Bioassays Application for Mutagenicity and Cytotoxicity Evaluation of Medicinal Plant having Considerable Antioxidant Potential. Asian J Chem. 2015;27(11):3965-8. DOI: 10.14233/ajchem.2015.19005
23. Yaghmaei P, Azarfar K, Dezfulian M, Ebrahim-Habibi A. Silymarin effect on amyloid-beta plaque accumulation and gene expression of APP in an Alzheimer's disease rat model. Daru. 2014; 22(1):24. DOI: 10.1186/2008-2231-22-24 PMID: 24460990
24. Wallace SN, Carrier DJ, Clausen E. Extraction of nutraceuticals from milk thistle: part II. Extraction with organic solvents. Appl Biochem Biotechnol. 2003;105 - 108(1-3):891-903. PMID: 12721426
25. Azwanida N. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. Med Arom Plant. 2015;4(3):2167-0412. DOI: 10.4172/2167-0412.1000196
26. Karimi G, Ramezani M, Tahoonian Z. Cisplatin nephrotoxicity and protection by milk thistle extract in rats. Evid Based Complement Alternat Med. 2005;2(3):383-6. DOI: 10.1093/ecam/neh103 PMID: 16136217
27. LoPachin RM, Barber DS, He D, Das S. Acrylamide inhibits dopamine uptake in rat striatal synaptic vesicles. Toxicol Sci. 2006;89(1):224-34. DOI: 10.1093/toxsci/kfj005 PMID: 16207938
28. Zhu YJ, Zeng T, Zhu YB, Yu SF, Wang QS, Zhang LP, et al. Effects of acrylamide on the nervous tissue antioxidant system and sciatic nerve electrophysiology in the rat. Neurochem Res. 2008;33(11):2310-7. DOI: 10.1007/s11064-008-9730-9 PMID: 18470611
29. 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
30. Prasad SN, Muralidhara. Mitigation of acrylamide-induced behavioral deficits, oxidative impairments and neurotoxicity by oral supplements of geraniol (a monoterpene) in a rat model. Chem Biol Interact. 2014;223:27-37. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.08.016 PMID: 25199698
31. Mehri S, Dadesh Q, Tabeshpour J, Vahdati Hassani F, Karimi G, et al. . Evaluation of the Neuroprotective effect of silymarin on acrylamide-induced neurotoxicity. Jundishapur J Nat Pharm Prod. 2016 11(4). DOI: 10.17795/jjnpp-37644
32. Aziz HOA, Awaad A. Titanium dioxide (TiO 2) nanoparticles induced apoptosis of splenocytes in adult male albino rat and the protective role of milk thistle seeds extract. Int J. 2014;2:732-46.
33. Baluchnejadmojarad T, Roghani M, Mafakheri M. Neuroprotective effect of silymarin in 6-hydroxydopamine hemi-parkinsonian rat: involvement of estrogen receptors and oxidative stress. Neurosci Lett. 2010;480(3):206-10. DOI: 10.1016/j.neulet.2010.06.038 PMID: 20600617
34. Kiruthiga PV, Karutha Pandian S, Pandima Devi K. Silymarin prevents the toxicity induced by benzo(a)pyrene in human erythrocytes by preserving its membrane integrity: an in vitro study. Environ Toxicol. 2014;29(2):165-75. DOI: 10.1002/tox.20783 PMID: 22052664
35. Lee HM, Jang JY, Seong YH. Protective effect of the aerial parts of Silybum marianum against amyloid β protein (25-35)-induced neuronal death in cultured neurons. J Biomed Transl Res. 2016;17(4):109-14. DOI: 10.12729/jbtr.2016.17.4.109
36. Li L, Sun HY, Liu W, Zhao HY, Shao ML. Silymarin protects against acrylamide-induced neurotoxicity via Nrf2 signalling in PC12 cells. Food Chem Toxicol. 2017;102:93-101. DOI: 10.1016/j.fct.2017.01.021 PMID: 28137608

Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
Volume 10, Issue 1, Spring 2018

Research Article

Evaluation of the Neuroprotective Effect of *Silybum Marianum* Extract on Acrylamide-Induced Neurotoxicity: An *In Vitro* and *In Vivo* Study

Soghra Mehri [1], Yasser Omar Rawas [2], Faezeh Vahdati Hassani [3], Gholamreza Karimi [4], Hossein Hosseinzadeh [4,*]

[1] Pharmaceutical Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[2] Pharm D, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[3] Ph.D of Toxicology, Department of Pharmacodynamics and Toxicology, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[4] Pharmaceutical Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
*** Corresponding author:** Hossein Hosseinzadeh, Pharmaceutical Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. E-mail: hosseinzadehh@mums.ac.ir

DOI: 10.29252/nkjmd-010017

How to Cite this Article:
Mehri S, Omar Rawas Y, Vahdati Hassani F, Karimi G, Hosseinzadeh H. Evaluation of the Neuroprotective Effect of Silybum Marianum Extract on Acrylamide-Induced Neurotoxicity: An In Vitro and In Vivo Study. JNKUMS. 2018; 10 (1) :46-52
URL: http://journal.nkums.ac.ir/article-1-1413-fa.html

Received: 29 Oct 2017
Accepted: 11 Mar 2018

Keywords:
Acrylamide
Silybum marianum
Milk thistle
Neurotoxicity
Antioxidant

Abstract

Introduction: Due to the importance of Acrylamide (ACR) neurotoxicity, investigation of the compounds, which can reduce the toxicity of ACR seems to be essential. The antioxidant effects of *Silybum marianum* (milk thistle) have been shown by different studies. The aim of this study was to evaluate the possible protective effects of the extract of *S. marianum* in prevention of the neurotoxicity of ACR in both *in vitro* and *in vivo* models.

Methods: Acrylamide toxicity in PC12 cells and the protective effect of *S. marianum* extracts to prevent toxicity were evaluated by the MTT test. Neurotoxicity was induced using administration of ACR (IP) for 11 days in rats. The effect of different doses of ethanolic extracts (200, 400, and 600 mg/kg) of milk thistle was evaluated in ACR-induced neurotoxicity in Wistar rats using gait score examination. In this study, vitamin E (200 mg/kg) was used as a positive control. At the end of the treatment the gait score was evaluated.

Results: The viability of the cells decreased following exposure to different concentrations of ACR for 24 hours (IC_{50}: 5mM). The alcoholic extract of S. *marianum* at different concentrations after 24 hours of exposure to cells led to a significant decrease in toxicity. Furthermore, ACR at a dose of 50 mg/kg caused significant motor disorders in rats. The alcoholic extract at a dose of 600 mg/kg significantly improved animal movements as compared to the group receiving ACR.

Conclusions: The alcoholic extract of *S. marianum* significantly reduced the neurotoxicity of ACR in both *in vitro* and *in vivo* models, possibly through antioxidant activity.