

مقاله پژوهشی

نقش حفاظتی سیلیمارین و فلاونوئیدهای آرتیشو (*Cynara scolymus*) در مقابل آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع موش‌های سوری بالغ

فرزانه مشاوری، حمید رضا مؤمنی^{*}، میترا نوری

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک

پذیرش: ۱۰ آبان ۹۵

دریافت: ۲۹ تیر ۹۵

چکیده

مقدمه: مرگ نورون‌های حرکتی در کشت قطعات نخاع از نوع آپوپتوزیس می‌باشد و استرس اکسیداتیو می‌تواند یکی از مکانیسم‌های دخیل در این پدیده محسوب شود. سیلیمارین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی قادر است استرس اکسیداتیو را مهار نماید. با توجه به اینکه فلاونوئیدهای آرتیشو منبع غنی از سیلیمارین می‌باشند هدف از این پژوهش بررسی اثر سیلیمارین و فلاونوئیدهای آرتیشو بر آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع موش بود.

روش‌ها: نخاع سینه‌ای موش‌های سوری ماده بالغ به قطعات ۵۰۰ میکرونی بریده و این قطعات به ۴ گروه تقسیم شدند: ۱- قطعات لحظه صفر که بلافاصله فیکس شدند. ۲- قطعات گروه کنترل که حلال سیلیمارین و فلاونوئیدها را دریافت کردند. ۳- قطعات تیمار شده با سیلیمارین (۲۰۰ میکرو مولار) ۴- قطعات تیمار شده با فلاونوئیدهای استخراج شده از آرتیشو (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر). قطعات گروه ۲ تا ۴ به مدت ۶ ساعت در محیط کشت نگهداری شدند. سپس قطعات کشت شده فیکس و پس از شستشو برش گیری شدند. جهت بررسی جنبه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس از رنگ آمیزی هوخست و پروپیدیوم آبیواید استفاده شد. جهت ارزیابی پراکسیداسیون لیپید و ظرفیت کل آنتی اکسیدانی در قطعات نخاع به ترتیب از سنجش مالون دی آلدیید (MDA) و قدرت آنتی اکسیدانی/ احیا کنندگی آهن سه ظرفیتی (FRAP) استفاده شد.

یافته‌ها: نورون‌های حرکتی قطعات نخاع کشت شده برای به مدت ۶ ساعت مشخصات مورفولوژیکی آپوپتوزیس شامل چروکیدگی سلول، متراکم شدن هسته و کروماتین را در مقایسه با نورون‌های لحظه صفر نشان دادند. در این زمان، میزان MDA و FRAP در قطعات نخاع نسبت به قطعات لحظه صفر به ترتیب افزایش و کاهش یافت. استفاده از سیلیمارین و فلاونوئیدهای آرتیشو به‌طور جداگانه پس از ۶ ساعت، نسبت به گروه کنترل، توانست جنبه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس را در نورون‌های حرکتی به تأخیر بیندازند و میزان MDA قطعات نخاع را کاهش دهد.

نتیجه‌گیری: سیلیمارین و فلاونوئیدهای آرتیشو با خاصیت آنتی اکسیدانی خود توانستند آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع موش‌های بالغ را مهار نمایند.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوزیس، آرتیشو، آنتی اکسیدان، سیلیمارین

مقدمه

آسیب‌های نخاعی و بیماری‌های ناشی از تخریب نورون‌ها (Neurodegenerative diseases) مثل آلزایمر، پارکینسون، ایسکمی مغزی و Amyotrophic Lateral Sclerosis با

مرگ سلولی برنامه ریزی شده نوع II (آپوپتوزیس) همراه هستند [۱] و تا کنون درمان قطعی برای آن‌ها شناخته نشده است.

کشت قطعات نخاع می‌تواند به‌عنوان مدلی از آسیب نخاعی در نظر گرفته شود [۲]. مطالعات نشان می‌دهد که مرگ نورون‌های حرکتی در قطعات کشت شده نخاع از نوع آپوپتوزیس می‌باشد [۳]. لذا بررسی و مطالعه مکانیسم‌های ایجاد کننده و پیشبرنده آپوپتوزیس این نورون‌ها به منظور

h-momeni@araku.ac.ir

http://ijpp.phypha.ir

ijpp@phypha.ir

^{*} نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

پست الکترونیکی:

نورون‌ها جلوگیری و یا حداقل مرگ آن‌ها را به تأخیر انداخت. بنابراین تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر سیلیمارین و فلاونوئیدهای گیاه آرتیشو بر روی آپوتوزیس نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع طراحی شده تا به این سوال پاسخ داده شود که با فرض القا استرس اکسیداتیو در القا آپوتوزیس در نورون‌های حرکتی، آیا کاربرد این ترکیبات می‌تواند آپوتوزیس را در این نورون‌ها مهار نمایند.

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق موش‌های سوری ماده بالغ نژاد NMRI با میانگین وزنی 22 ± 3 گرم (۵ تا ۶ هفته‌ای) از انستیتو پاستور ایران خریداری و در خانه حیوانات در شرایط استاندارد (دمای 21 ± 2 درجه سانتی گراد، رطوبت ۷۵ درصد، ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) با دسترسی به آب و غذای کافی نگهداری شدند. در این پژوهش کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است. حیوانات با استفاده از ماده بی‌هوش کننده دی اتیل اتر کاملاً بی‌هوش و توسط شکافتگی قلب کشته شدند. پس از باز نمودن ناحیه پشتی، نخاع خارج و به پتری حاوی سالین فسفات (Phosphate buffer solution, PBS) سرد منتقل گردید. نمونه بلافاصله به آزمایشگاه کشت منتقل و پس از جدا شدن ناحیه سینه‌ای نخاع این بخش با استفاده از دستگاه قطعه کننده بافت (Tissue chopper, Stolting, USA) به صورت برش‌های عرضی به قطعاتی با ضخامت ۵۰۰ میکرومتر بریده و به ۴ گروه تقسیم شدند: ۱) قطعات لحظه زمانی صفر که برای استفاده در مطالعات بافتی بلافاصله فیکس شدند. ۲) قطعات گروه کنترل (۳) قطعات تیمار شده با سیلیمارین (Sigma, USA ۲۰۰ میکرو مولار). ۴) قطعات تیمار شده با فلاونوئیدهای استخراج شده از آرتیشو (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر). قطعات گروه ۲ تا ۴ به مدت ۶ ساعت در محیط کشت نگهداری شدند. سپس قطعات کشت شده فیکس و پس از شستشو برش‌گیری شدند. جهت بررسی جنبه‌های مورفولوژیکی آپوتوزیس از رنگ‌آمیزی هوخست و پروپیدوم آبوداید استفاده شد. قطعات گروه کنترل و تیمار در پلیت‌های استریل چهارخانه حاوی ۴۵۰ میکرولیتر Minimum Essential Medium ۵۰٪ (MEM)، سرم اسب، Hanks Balanced (HBSS)

یافتن راهکاری برای افزایش بقای آن‌ها در محیط کشت جهت استفاده در ترمیم آکسونی احتمالاً می‌تواند برای درمان بیماران آسیب نخاعی مفید باشد. اگرچه مکانیسم‌های متعددی در آپوتوزیس نورون‌ها در سیستم اعصاب مرکزی دخیل می‌باشد اما رادیکال‌های آزاد با القای استرس اکسیداتیو و با افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای سلولی نقش مهمی در بروز آپوتوزیس در این نورون‌ها بازی می‌کنند [۴]. بدین ترتیب مهار رادیکال‌های آزاد و تقویت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی با هدف کاهش استرس اکسیداتیو در سیستم اعصاب مرکزی می‌تواند به‌عنوان راه کاری برای مقابله با آسیب نورونی مطرح باشد. تحقیقات نشان می‌دهد که آنتی‌اکسیدان‌ها به‌ویژه پلی‌فنل‌ها قادر هستند مرگ نورونی را در شرایط *in vitro* مهار نمایند و بدین ترتیب ممکن است خواص درمانی در مدل‌های حیوانی بیماری‌های ناشی از تخریب نورون‌ها داشته باشند [۵]. به همین دلیل بهره‌گیری از آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی احتمالی برای مهار و یا کاهش مرگ نورونی در مدل‌های حیوانی به‌کار رود تا بتواند به فرضیه درمان با آنتی‌اکسیدان‌ها برای بیماری‌های ناشی از تخریب نورون‌ها جامه عمل بپوشاند.

سیلیمارین به عنوان ماده مؤثره خار مریم (*Silybum marianum*) و نیز سایر گیاهان دارویی از جمله آرتیشو (*Cynara scolymus*) [۶] یک فلاونوئید پلی‌فنلی با خواص درمانی متعدد می‌باشد [۷]. وجود گروه متوکسی بر روی حلقه فنلی، سیلیمارین را به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی مطرح نموده است. سیلیمارین به‌عنوان یک محافظت کننده عصبی در مقابل بیماری‌های نورولوژیکی از جمله آلزایمر، پارکینسون و ایسکمی مغزی شناخته شده است که این اثر ناشی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن در مهار استرس اکسیداتیو در مغز است [۸]. همچنین مشخص شده است که عصاره گیاه آرتیشو با دارا بودن سیلیمارین هپاتوسیت‌های کشت شده موش صحرایی را در مقابل استرس اکسیداتیو ناشی از هیدروپروکسید محافظت می‌کند [۹]. از آنجا که استرس اکسیداتیو می‌تواند عاملی برای آپوتوزیس نورون‌های حرکتی در بیماری‌های ناشی از مرگ نورون‌ها، آسیب‌های نخاعی و همچنین در قطعات کشت شده نخاع باشد، بنابراین می‌توان این گونه فرض نمود که با جلوگیری از افزایش بیش از حد رادیکال‌های آزاد و یا تقویت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بتوان از مرگ این

استفاده قرار گرفتند.

جهت سنجش پراکسیداسیون لیپید و بنابراین القای استرس اکسیداتیو در قطعات نخاع، از روش سنجش مالون دی آلدهید (MDA) استفاده شد [۵]. به‌طور خلاصه نمونه بافتی (۰/۱ گرم) در محلول KCl به نسبت ۱ به ۹ هموژنیزه شد. یک حجم از نمونه هموژنیزه شده با دو حجم از محلول تیوباریتوریک اسید (شامل تری کلرواستیک (TCA)، تیوباریتوریک اسید (TBA)، هیدروکلریک اسید (HCl) ترکیب شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در آب جوش قرار گرفته و بعد از خنک شدن با دور $\times 1000$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس لایه فوقانی شفاف برداشته شد و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۳۵ نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. غلظت MDA با استفاده از ضریب خاموشی (extinction coefficient)، $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ محاسبه و میزان MDA بر حسب nmol/gr بافت بیان شد.

به منظور ارزیابی ظرفیت کل آنتی اکسیدانتی بافت، قدرت آنتی اکسیدانتی/احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی (FRAP) قطعات نخاع مورد سنجش قرار گرفت [۱۲]. به این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره بافتی (۰/۱ گرم بافت نخاع در محلول KCl به نسبت ۱ به ۹ هموژنیزه شد) با ۳ میلی‌لیتر از معرف آماده FRAP (شامل ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر استات، ۱۰ میلی‌لیتر کلرید فریک، ۱۰ میلی‌لیتر TPTZ و ۱۲ میلی‌لیتر آب مقطر) مخلوط و پس از ۴ دقیقه جذب آن‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر در مقابل بلانک قرائت شد. سپس با استفاده از فرمول رگرسیون حاصل از منحنی استاندارد سولفات آهن میزان FRAP نمونه‌های بافتی محاسبه و بر حسب $\mu\text{mol/g}$ بیان شد.

به منظور بررسی جنبه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس در قطعات نخاع، ابتدا لام‌های حاوی برش‌های نخاع توسط PBS شسته شدند (۳ بار و هر بار ۵ دقیقه). سپس رنگ آمیزی برش‌ها توسط (پروپیدیوم آیوداید، Propidium iodide, Sigma) با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق انجام شد. لام‌ها مجدداً توسط PBS شستشو (۳ بار و هر بار ۵ دقیقه) و سپس توسط هوخست ۳۳۳۴۲ (۳ بار و هر بار ۵ دقیقه) و سیگما با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۳۰ ثانیه در دمای اتاق رنگ آمیزی شدند. پس از آن لام‌ها توسط PBS شستشو (۳ بار و هر بار ۵ دقیقه) و با اضافه

HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-, Salt Solution 25% piperazineethanesulfonic acid) 25 mM، پلی‌ن - استرپتومایسین و D 6gr/L - گلوکز با $7/3 - 7/4$ pH منتقل (چهار قطعه در هر خانه) و در انکوباتور CO_2 دار با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای ۶ ساعت انکوبه شدند. قطعات تازه تهیه شده (لحظه زمانی صفر) و کشت شده توسط فیکساتور استنفانی (۲ درصد پارافرمالدئید، ۰/۲ درصد اسید پیکریک در ۰/۱ مولار بافر فسفات با pH ۷/۲) برای مدت زمان حداقل ۲ ساعت فیکس شدند. سپس قطعات ۳ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه توسط PBS شستشو و برای مدت ۱ شب در محلول ساکارز ۲۰٪ در PBS، در یخچال نگهداری شدند. سرانجام قطعات با استفاده از دستگاه cryostat با ضخامت ۱۰ میکرومتر برش گیری شده و برش‌ها بر روی لام‌های آغشته به پلی‌ال-لایزین Poly-L-lysine (۱:۹ در آب مقطر) قرار گرفته و در فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد تا هنگام استفاده نگهداری شدند.

به منظور استخراج فلاونوئیدهای آرتیشو، از قسمت هوایی در سایه خشک شده این گیاه استفاده گردید. بخش هوایی خشک شده گیاه به وسیله آسیاب پودر گردیده، ۳۰۰ گرم از آن با ۲۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد در سه مرحله عصاره گیری و سپس با دستگاه تبخیر در خلا چرخشی تا تهیه عصاره جامد تبخیر شد. سپس با استفاده از اتیل استات و اسید کلریدریک کل فلاونوئیدهای گیاه استخراج و جداسازی شدند [۱۰]. تشخیص و شناسایی فلاونوئیدهای موجود در گیاه با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی کاغذی دو بعدی و لایه نازک پس از هیدرولیز اسیدی و جداسازی بخش فلاونوئیدی از غیر فلاونوئیدی انجام شد [۱۱].

جهت غلظت‌یابی و مشخص نمودن غلظت مؤثر سیلیمارین و همچنین فلاونوئیدهای استخراج شده از آرتیشو بر روی آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع، به ترتیب غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکرومولار و غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به اینکه غلظت‌های ۲۰۰ میکرومولار (برای سیلیمارین) و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (برای فلاونوئیدهای استخراج شده از آرتیشو) بهترین اثر را در مهار آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی داشت، این غلظت‌ها به عنوان غلظت‌های مؤثر در این پژوهش مورد

میکرومولار (شکل C۱) و فلاونوئیدهای استخراج شده از آرتیشو با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (شکل D۱) توانستند نشانه‌های مورفولوژیکی آپوتوزیس را در نورون‌های حرکتی نسبت به گروه کنترل به‌طور قابل ملاحظه‌ای مهار نمایند. میانگین قطر هسته نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع پس از گذشت ۶ ساعت نسبت به میانگین قطر هسته این نورون‌ها در لحظه زمانی صفر کاهش معنی‌داری ($p < 0.001$) را نشان داد. کاربرد سیلیمارین (۲۰۰ میکرومولار) و فلاونوئیدهای استخراج شده از آرتیشو (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) توانست کاهش ایجاد شده در قطر هسته نورون‌های حرکتی را به‌طور معنی‌داری ($p < 0.001$) نسبت به گروه کنترل جبران نماید (نمودار ۱).

میزان مالون دی‌آلدهید در قطعات کشت شده نخاع پس از گذشت ۶ ساعت نسبت به میزان MDA این قطعات در لحظه زمانی صفر افزایش معنی‌داری ($p < 0.05$) را نشان داد. کاربرد سیلیمارین با غلظت ۲۰۰ میکرومولار در محیط کشت پس از طی ۶ ساعت توانست میزان MDA را در نورون‌های حرکتی نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری ($p < 0.001$) جبران نماید (نمودار ۲). پس از گذشت ۶ ساعت کاربرد عصاره آرتیشو با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در محیط کشت توانست میزان MDA قطعات را به‌طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه کنترل کاهش دهد، با این حال این کاهش معنی‌دار نبود (نمودار ۲).

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در قطعات کشت شده نخاع پس از ۶ ساعت نسبت به لحظه زمانی صفر کاهش معنی‌داری ($p < 0.001$) را نشان داد. استفاده از سیلیمارین با غلظت ۲۰۰ میکرومولار در محیط کشت در طی ۶ ساعت توانست ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی را در قطعات نخاع نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) جبران نماید (نمودار ۳). استفاده از فلاونوئیدهای استخراج شده از آرتیشو با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از گذشت ۶ ساعت در محیط کشت،

کردن محلول گلیسرول/PBS (۱:۱) توسط لامل پوشیده شدند. لام‌ها سپس توسط میکروسکوپ فلورسنس (Olympus, Japan) با استفاده از فیلتر مناسب مشاهده و از آن‌ها عکس تهیه شد. اندازه‌گیری قطر هسته نورون‌های حرکتی در برش‌های قطعات نخاع توسط نرم افزار موتیک انجام شد و سپس مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. داده‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از طریق آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون Tukey صورت گرفت و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

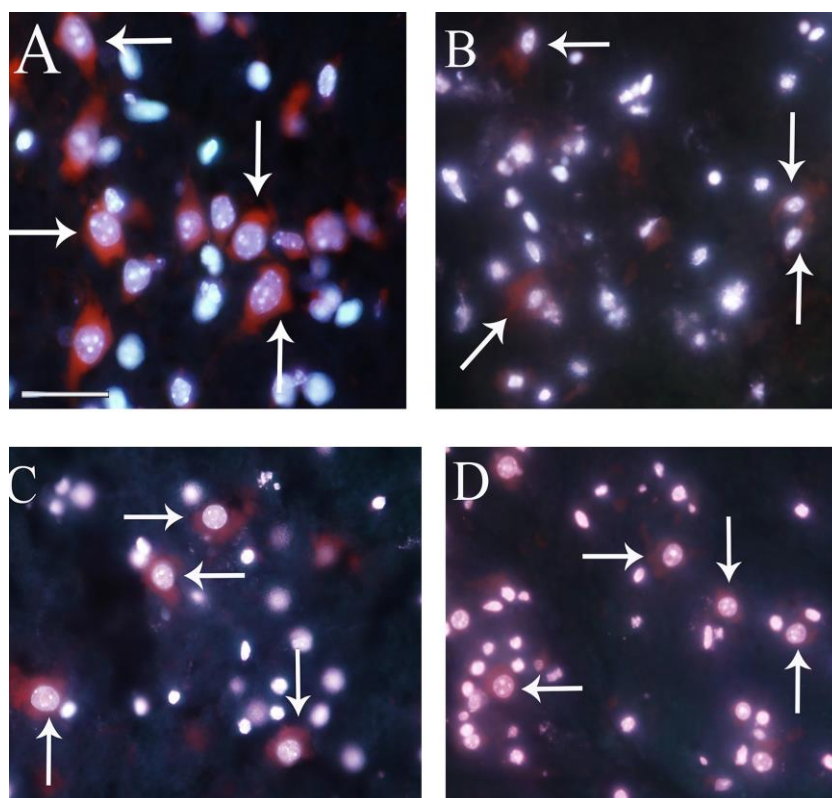
نتایج حاصل از مطالعه کروماتوگرافی کاغذی دو بعدی نشان داد که گیاه آرتیشو دارای آگلیکون، فلاونوئید سولفات و فلاون C & C-/O گلیکوزید است. همچنین نتایج کروماتوگرافی لایه نازک با استفاده از استانداردها (Merck)، Sigma and Fluka وجود فلاونوئیدهای سیلیمارین، آپی‌جین، لوتتولین، کوئرستین، روتین، نارنجین، میرستین و کامفرول را نشان داد (جدول ۱).

نورون‌های حرکتی به واسطه دارا بودن جسم سلولی و هسته بزرگ و محل قرار گیری آن‌ها در شاخ‌های شکمی از سایر نورون‌ها قابل تشخیص می‌باشند. نورون‌های حرکتی در برش‌های مربوط به قطعات تازه تهیه شده (لحظه زمانی صفر) دارای جسم سلولی و هسته بزرگ، هستک مشخص و بدون هیچ گونه علامت آپوتوزیس بودند (شکل A۱) در حالی که نورون‌های حرکتی در برش‌های قطعات کشت شده برای زمان ۶ ساعت (کنترل)، تغییرات مورفولوژیکی آپوتوزیس از قبیل چروکیدگی سیتوپلاسم و غشا سلول (کوچک شدن سلول)، متراکم شدن هسته (کوچک شدن هسته) و تراکم کروماتین را نشان دادند (شکل B۱). پس از گذشت مدت زمان ۶ ساعت در محیط کشت، کاربرد جداگانه سیلیمارین با غلظت ۲۰۰

جدول ۱ - داده‌های حاصل از کروماتوگرافی‌های کاغذی دو بعدی و لایه نازک بخش هوایی گیاه آرتیشو.

Sample	TFN	AN	Fl C&C-/O	N	FlSu	N	Si	A	L	Q	Rh	M	Ru	Na	K	My
Artichok	۸	۱	۴		۳		+	+	+	+	-	-	+	+	±	+

TFN: Total Flavonoids Number, AN: Aglycons Number, Fl C&C-/O: Flavon C & C-/O glycosides Number, FlSu: flavonoid sulfates Number, Si: Silymarin, A: Apigenin, L: Luteolin, Q: Quersetin, Rh: Rhamnetin, M: Morin, Ru: Rutin, Na: Naringenin, K: kaempferol, My: Myricetin.



شکل ۱- نقش سیلیمارین و فلاونوئیدهای استخراج شده از آرتیشو بر مهار جنبه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع پس از ۶ ساعت. رنگ آمیزی فلوئورسنت پروپیدیم آیوید (قرمز) و هوکست ۳۳۳۴۲ (آبی) تغییرات را در نورون‌های حرکتی نشان می‌دهد. (A) نورون‌های حرکتی بدون علائم آپوپتوزیس از قطعات تازه تهیه شده (لحظه زمانی صفر). (B) نورون‌های حرکتی کشت شده برای ۶ ساعت (کنترل). کاربرد سیلیمارین با غلظت ۲۰۰ میکرومولار (C)، و فلاونوئیدهای آرتیشو با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (D) برای ۶ ساعت توانست نشانه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس را در نورون‌های حرکتی به‌طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه کنترل مهار نماید. فلش‌ها نورون‌های حرکتی را نشان می‌دهند. Scale bar = ۵۰ میکرون.

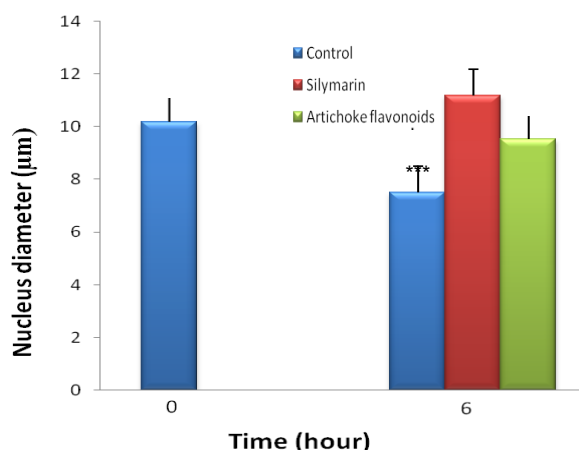
کاهش ظرفیت کل آنتی اکسیدانی را نسبت به گروه کنترل افزایش داد، ولی افزایش آن معنی‌دار نبود (نمودار ۳).

بحث

در پژوهش حاضر کشت قطعات نخاع موش بالغ مورد استفاده قرار گرفت تا به بررسی یکی از مکانیسم‌های دخیل در آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی این قطعات و همچنین تاثیر سیلیمارین و فلاونوئیدهای استخراج شده از آرتیشو در مهار آپوپتوزیس این نورون‌ها بپردازد.

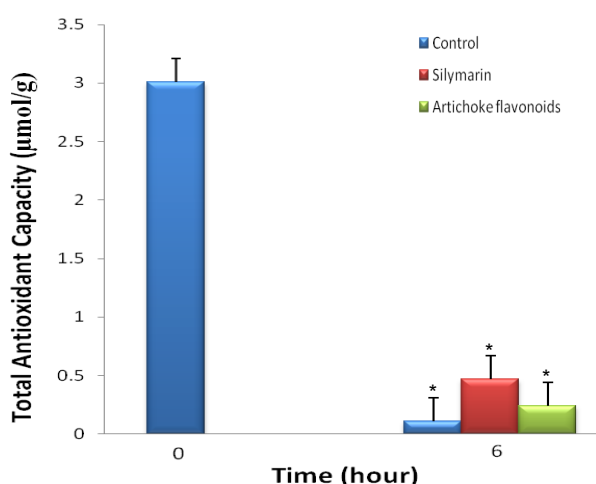
جهت مشخص شدن نوع مرگ نورون‌های حرکتی، از رنگ‌آمیزی فلوئورسنت استفاده شد. در مطالعات متعدد این رنگ‌ها برای بررسی مورفولوژیک آپوپتوزیس در این نورون‌ها مورد استفاده قرار گرفته است [۱۳]. در پژوهش حاضر نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده مشخصاتی همچون چروکیدگی سیتوپلاسم، متراکم شدن هسته و کروماتین که به عنوان جنبه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس محسوب

می‌شوند [۱۴] را به نمایش گذاشتند. این نوع مرگ سلولی در بسیاری از بیماری‌های ناشی از دژنره شدن نورون‌ها (Neurodegenerative diseases) همچون ALS،

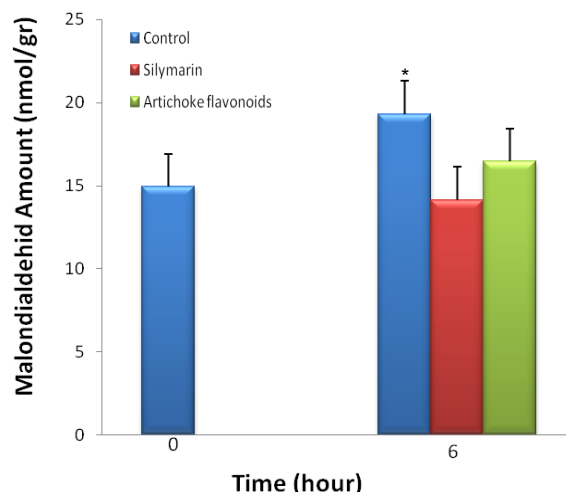


نمودار ۱- اثر سیلیمارین (۲۰۰ میکرومولار) و فلاونوئیدهای استخراج شده از آرتیشو (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر قطر هسته نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع پس از ۶ ساعت. نتایج به شکل میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده اند. ***: تفاوت معنی‌دار با زمان صفر با $p < 0.001$.

سیلیمارین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی [۶] و همچنین فلاونوئیدهای استخراج شده از آریشو با دارا بودن آنتی‌اکسیدان‌هایی از جمله سیلیمارین [۱۷] توانست جنبه‌های مورفولوژیکی آپوتوزیس را در نورون‌های حرکتی پس از ۶ ساعت نسبت به گروه کنترل به تأخیر اندازد. این نتایج می‌توانست حمایت‌کننده این فرضیه باشد که مکانیسم دخیل در آپوتوزیس نورون‌های حرکتی در قطعات کشت شده، احتمالاً استرس اکسیداتیو است. ارزیابی شاخص‌های استرس اکسیداتیو از جمله میزان پراکسیداسیون لیپید و همچنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بافت می‌توانست در جهت تأیید بیشتر این فرضیه کمک نماید. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در قطعات کشت شده به مدت ۶ ساعت، میزان MDA افزایش و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این قطعات کاهش یافت و کاربرد سیلیمارین و فلاونوئیدهای استخراج شده از آریشو توانست میزان MDA را کاهش و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهد. در تأیید این نتایج، تحقیقات مختلف نقش حفاظتی سیلیمارین [۶] و فلاونوئیدهای آریشو [۱۷] را در مقابله با مرگ سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو نشان می‌دهد. تشدید استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از افزایش تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن، باعث آسیب بافت‌هائی نظیر نخاع و افزایش سطح MDA به‌عنوان یکی از شاخص‌های معتبر استرس اکسیداتیو می‌باشد [۱۸]. در همین رابطه به‌علت تشدید روند پراکسیداسیون لیپیدی، سطح MDA



نمودار ۳- اثر سیلیمارین (۲۰۰ میکرومولار) و فلاونوئیدهای استخراج شده از آریشو (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی قطعات کشت شده نخاع سنجش شده توسط FRAP پس از ۶ ساعت. نتایج به شکل میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده اند. *: تفاوت معنی‌دار با زمان صفر با. $p < 0.05$



نمودار ۲- اثر سیلیمارین (۲۰۰ میکرومولار) و فلاونوئیدهای استخراج شده از آریشو (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر میزان مالون دی آلدئید قطعات کشت شده نخاع پس از ۶ ساعت. نتایج به شکل میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده اند. *: تفاوت معنی‌دار با زمان صفر با. $p < 0.05$

پارکینسون و آلزایمر و همچنین آسیب‌های نخاعی [۱] گزارش شده است. آپوتوزیس پدیده پیچیده‌ای است که می‌تواند به‌وسیله سیگنال‌های متعددی به‌طور واحد یا هم‌زمان با هم در نورون‌ها آغاز شود. مکانیسم‌های مختلفی در آپوتوزیس نورون‌ها مطرح می‌باشد. یکی از این مکانیسم‌ها دخالت رادیکال‌های آزاد و بنابراین القا استرس اکسیداتیو است. چنین مکانیسمی در آپوتوزیس نورون‌ها در بیماری‌های ناشی از دژنره شدن نورون‌ها نیز گزارش شده است [۵].

رادیکال‌های آزاد از طریق پراکسیداسیون لیپیدها به غشای سلولی آسیب می‌رسانند. از طرف دیگر موجب اکسیداسیون پروتئین‌ها شده و با آسیب و قطعه‌قطعه نمودن DNA منجر به مرگ سلولی می‌شوند [۱۵]. علاوه بر این، رادیکال‌های آزاد در فرآیند آپوتوزیس موجب فعال شدن کاسپازها شده و به این ترتیب با تخریب سوبستراهای پروتئینی خود از جمله پروتئین‌های اسکلت سلولی و هسته‌ای به‌ترتیب منجر به چروکیدگی سلول و کوچک شدن هسته می‌شوند [۱۶].

یک احتمال ممکن آن است که مکانیسم دخیل در آپوتوزیس نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع از طریق القا استرس اکسیداتیو صورت گرفته باشد. در صورتی که این احتمال درست باشد کاربرد آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند با جارب کردن رادیکال‌های آزاد و همچنین افزایش ظرفیت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی اثرات مخرب استرس اکسیداتیو را بر نورون‌های حرکتی مهار نماید. نتایج ما نشان داد که کاربرد

می‌توان نتیجه گرفت که اثرات ایجاد شده ناشی از فلاونوئیدهای آرتیشو به‌علت وجود سیلیمارین با اثرات آنتی‌اکسیدانی خود بوده است.

نتیجه‌گیری

در مجموع از آنجا که سیلیمارین و فلاونوئیدهای آرتیشو با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی توانستند نشانه‌های آپوپتوزیس را در نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع مهار نماید، این احتمال وجود دارد که القا استرس اکسیداتیو یکی از مکانیسم‌های دخیل در آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی در قطعات کشت شده نخاع بوده و این مواد از طریق مهار استرس اکسیداتیو و یا افزایش سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی باعث به تاخیر افتادن آپوپتوزیس در این نورون‌ها شده‌اند.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

سهم نویسندگان

ف.م: انجام مطالعه و نگارش مقاله؛ ح.م: ایده، طراحی، نظارت بر حسن اجرای مطالعه و نگارش مقاله؛ م.ن: مشاوره و اجرای بخشی از مطالعه.

فهرست منابع

- [1] Elmore S, Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35 (2007) 495-516.
- [2] Lambert W, Davis P, Mechanisms of Apoptosis. *Am J Pathol* 157 (2000) 1415-1430.
- [3] Momeni HR, Mehranjani MS, Abnosi MH, Kanje M, Apoptosis in cultured spinal cord slices of neonatal mouse. *Iran J Sci Technol Transact A* 32 (2008) 109-116.
- [4] Gandhi S, Abramov A, Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev* (2012) 428010.
- [5] Esposito E, Rotilio D, Di Matteo V, Di Giulio C, Cacchio M, Algeri S, A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiol Aging* 23 (2002) 719-735.
- [6] Borah A, Paul R, Choudhury S, Neuroprotective potential of silymarin against CNS disorders: insight into the pathways and molecular mechanisms of action,

نیز در بافت‌ها افزایش می‌یابد. سیلیمارین با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجه خود سبب کاهش رادیکال‌های آزاد و افزایش فعالیت آنزیم‌های سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود [۱۹]. نشان داده شده است که فلاونوئیدهای استخراج شده از آرتیشو نیز با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی قادر هستند پراکسیداسیون لیپیدهای غشا را مهار کرده و به این ترتیب اثرات مهاری قوی بر روی آپوپتوزیس سلول‌های کبد اعمال کنند [۲۰]. همچنین مطالعات گزارش کرده‌اند که فلاونوئیدهای آرتیشو باعث کاهش تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر و در نتیجه مهار آپوپتوزیس سلول‌ها و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش سطح MDA پلاسما و بافت و افزایش سطح گلوکوتائین به‌عنوان یکی از اجزا سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن و در نتیجه افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل می‌شود [۱۷، ۲۱]. این شواهد خود می‌تواند توجیه‌کننده کاهش سطح MDA و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی قطعات کشت شده نخاع باشد.

اگرچه نتایج کاربرد فلاونوئیدهای استخراج شده از آرتیشو در خصوص MDA و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود، با این حال تغییرات آن نسبت به گروه کنترل قابل ملاحظه بود. دلیل آن می‌تواند به‌علت مقدار کم سیلیمارین موجود در مجموعه فلاونوئیدهای آرتیشو در مقایسه با سیلیمارین خالص باشد. با این حال، با توجه به تشابه نتایج حاصل از سیلیمارین و فلاونوئیدهای استخراج شده از آرتیشو

- [7] Nabavi SM, Suredd A, Nabavi SF, Latifi AM, Moghaddam AH, Hellio C, Neuroprotective effects of silymarin on sodium fluoride-induced oxidative stress. *J Fluorine Chem* 142 (2012) 79-82.
- [8] Kren V, Walterova D, Silybin and silymarin – new effects and application. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 149 (2005) 29-41.
- [9] Li H, Xia N, Brausch I, Yao Y, Förstermann U, Flavonoids from Artichoke (*Cynara scolymus* L.) up-regulate endothelial-type nitric-oxide synthase gene expression in human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 310 (2004) 926-932.
- [10] Noori M, Flavonoids in some Iranian angiosperms In: Rao V, editor. *Phytochemicals-A global perspective of their role in nutrition and health*, Rijeka: InTech, 2012, 151-166.
- [11] Markham KR, editor. *Techniques of flavonoid identification*. London: Academic Press, 1982.
- [12] Bedreag OH, Rogobete AF, Sărăndan M, Cradigati A, Păpurică M, Roșu OM, Dumbuleu CM, Săndesc D, Oxidative stress and antioxidant therapy in traumatic

- spinal cord injuries. *Rom J Anaesth Intensive Care* 21 (2014) 123-129.
- [13] Zhang QL, Niu Q, Ji XL, Conti P, Boscolo P, Is necroptosis a death pathway in aluminum-induced neuroblastoma cell demise? *Int J Immunopathol Pharmacol* 21 (2008) 787-796.
- [14] Allen S, Sotos J, Sylte MJ, Czuprynski CJ, Use of Hoechst 33342 staining to detect apoptotic changes in bovine mononuclear phagocytes infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 8 (2001) 460-464.
- [15] Singh RP, Sharad S, Kapur S, Free radicals and oxidative stress in neurodegenerative diseases: relevance of dietary antioxidants. *J Indian Acad Clin Med* 5 (2004) 218-225.
- [16] Johnson VL, Ko SC, Holmstrom, TH, Eriksson JE, Chow SC, Effector caspases are dispensable for the early nuclear morphological changes during chemical-induced apoptosis. *J Cell Sci* 113 (2000) 2941-2953.
- [17] Heidarian E, Jafari-Dehkordi E, Seidkhani-Nahal A, Lipid-lowering effect of artichoke on liver phosphatidate phosphohydrolase and plasma lipids in hyperlipidemic rats. *J Med Plant Res* 5 (2011) 4918-4924.
- [18] Pazdro R, Burgess JR, The role of vitamin E and oxidative stress in diabetes complications. *Mech Ageing Dev* 131 (2010) 276-286.
- [19] Soto C, Recoba R, Barrón H, Alvarez H, Favari L, Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. *Comp Biochem Physiol* 136 (2003) 205-212.
- [20] Lohr G, Deters A, Hensel A, In vitro investigations of *Cynara scolymus* L. extract on cell physiology of HepG2 liver cells. *Braz J Pharm Sci* 45 (2009) 201-208.
- [21] Xia N, Pautz A, Wollscheid U, Reifenberg G, Förstermann U, Li H, Artichoke, cynarin and cyanidin downregulate the expression of inducible nitric oxide synthase in human coronary smooth muscle cells. *Molecules* 19 (2014) 3654-3668.

Research paper

Protective effect of silymarin and Artichoke (*Cynara scolymus*) flavonoids against apoptosis of cultured spinal cord the motor neurons of adult mice

Farzaneh Moshaveri, Hamid Reza Momeni*, Mitra Noori

Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran

Received: 19 July 2016

Accepted: 31 October 2016

Abstract

Introduction: Motor neurons in cultured spinal cord slices die through apoptosis and oxidative stress might be one of the contributing mechanisms in this process. Silymarin is a potent antioxidant and is able to inhibit oxidative stress. Artichoke flavonoids are a rich source of silymarin. The aim of this study was to investigate the effect of silymarin and artichoke flavonoids on apoptosis of motor neurons in cultured slices of mice spinal cord.

Methods: The thoracic region of spinal cord from female adult mice was cut into 500 μm slices. The slices were divided into four groups: 1) slices at time 0 that were fixed immediately, 2) control slices that received solvent of silymarin and flavonoids, 3) Slices that were treated with silymarin (200 μM), 4) Slices that were treated with flavonoids of artichoke (10 $\mu\text{g/mL}$). The slices of groups 2-4 were cultured for 6 h, fixed and sectioned using a cryostat. To study morphological features of apoptosis, the sections were stained with Hoechst and propidium iodide. Malondialdehyde (MDA) as lipid peroxidation index and ferric reducing ability as a measure of antioxidant power (FRAP) were measured in the spinal cord slices.

Results: Spinal motor neurons cultured for 6 h, showed morphological features of apoptosis including cell shrinkage as well as nuclear and chromatin condensation compared to the time 0. MDA level increased and FRAP decreased in the spinal cord slices. Silymarin and artichoke flavonoids delayed apoptosis in the motor neurons and decrease the amount of MDA in the spinal cord slices compared to control.

Conclusion: Silymarin and artichoke flavonoids delay apoptosis of motor neurons in cultured spinal cord slices of adult mice.

Keywords: Antioxidant activity, Apoptosis, Artichoke, Silymarin

Please cite this article as follows:

Moshaveri F, Momeni HR, Noori M, Protective effect of silymarin and Artichoke (*Cynara scolymus*) flavonoids against apoptosis of cultured spinal cord the motor neurons of adult mice. *Iran J Physiol Pharmacol* 1 (2018) 34-42.

*Corresponding author e-mail: h-momeni@araku.ac.ir
Available online at: <http://ijpp.phypha.ir>
E-mail: ijpp@phypha.ir