مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۲۲، شهریور ۱۴۰۲، ۵۶۶-۵۵۵

اثرات آنتی‌اکسیدانی سیلی‌مارین بر اختلالات یادگیری و اضطراب ناشی از اتانول در موش صحرایی: یک مطالعه تجربی

مریم قلی‌زاده[۱]، اکبر حاجی‌زاده مقدم[۲]، فرهاد ولی زادگان[۳]، صدیقه خانجانی جلودار[۴]

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱۱/۰۸ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۱۴۰۱/۱۲/۱۳ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۱۴۰۲/۰۴/۲۴ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۰۴/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: اتانول پیامدهای عصبی قوی بر روی مغز دارد که با استرس اکسیداتیو مرتبط است. هدف از این مطالعه تعیین اثر سیلی‌مارین بر استرس اکسیداتیو، اضطراب و اختلال یادگیری ناشی از مصرف اتانول در موش صحرایی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۳۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۰۰ گرم به پنج گروه تقسیم شدند. گروه کنترل و چهار گروهی که اتانول ۴ گرم بر کیلوگرم را به مدت ۱۴ روز دریافت نمودند. سه گروه تیمار، به ترتیب با دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سیلی‌مارین به مدت ۱۴ روز، درمان شدند. اختلالات شناختی و اضطراب مورد ارزیابی قرار گرفت. میانگین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و سطح گلوتاتیون در ناحیه هیپوکامپ اندازه‌گیری شد. داده‌ها توسط آنالیز واریانس یک-طرفه و آزمون تعقیبی Tukey تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: مصرف اتانول شاخص تبعیض ($P<۰/۰۰۱$)، درصد زمان گذرانده شده در بازوی باز (%Open Arm Time; %OAT) ($P<۰/۰۰۱$) و درصد ورود به بازوی باز (%Open Arm Entry; %OAE) ($P=۰/۰۰۷$) را به‌طور معناداری نسبت به گروه کنترل کاهش داد. هم‌چنین، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز ($P<۰/۰۰۱$)، سوپراکسیددیسموتاز ($P=۰/۰۰۲$) و سطح گلوتاتیون ($P<۰/۰۰۱$) نسبت به گروه کنترل کاهش نشان داد. درحالی‌که مصرف سیلی‌مارین با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، OAE ($P=۰/۰۲۲$) و OAT ($P=۰/۰۲۳$) را نسبت به گروه اتانول افزایش داد و هم‌چنین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز ($P=۰/۰۰۸$)، سوپراکسیددیسموتاز ($P=۰/۰۳۰$) و سطح گلوتاتیون را ($P<۰/۰۰۱$) را نسبت به گروه اتانول افزایش داد.

نتیجه‌گیری: احتمالاً سیلی‌مارین با افزایش سطح آنتی‌اکسیدانی در هیپوکامپ از بروز اختلالات رفتاری ناشی از مصرف اتانول محافظت می‌کند.

واژه‌های کلیدی: سیلی‌مارین، اختلالات شناختی، استرس اکسیداتیو، اضطراب، هیپوکامپ، موش صحرایی

۱- کارشناسی ارشدفیزیولوژی،گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
۲- دانشیار فیزیولوژی، گروه زیست علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
تلفن: ۳۵۳۰۲۴۵۳-۰۱۱، دورنگار: ۳۵۳۰۲۴۵۳-۰۱۱، پست الکترونیکی: a.hajizadeh@umz.ac.ir
۳- استادیار فیزیولوژی، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
۴- استادیار فیزیولوژی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-05-17]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1402.22.6.2.6]
[DOI: 10.61186/jrums.22.6.555]

مقدمه

اتانول با فرمول شیمیایی (C_2H_5OH) یا (CH_3CH_2OH) [۱] مایعی بی‌رنگ، با وزن مولکولی کم و قابل انحلال در آب و چربی است [۲]، که اصلی‌ترین جزء نوشیدنی‌های الکلی است و می‌توان آن را از تخمیر قندها به‌دست آورد [۳]. پس از مصرف، الکل در بافت‌های بدن پخش می‌شود و به سرعت از سد خونی مغزی عبور می‌کند. سوء مصرف اتانول به طور قابل توجهی باعث آسیب در بافت‌های مختلف از جمله کبد، قلب و سیستم عصبی می‌شود [۴]. سیستم عصبی مرکزی یکی از اهداف اصلی تخریب عصبی توسط الکل است [۵]. مناطقی در مغز که در دوره نوجوانی رشد عصبی قابل توجهی دارند، نسبت به سوء مصرف الکل آسیب‌پذیر شناخته می‌شوند [۶]. شواهد قابل توجهی نشان می‌دهد که یکی از اهداف اصلی مسمومیت با الکل در مغز، هیپوکامپ است [۷]. در هیپوکامپ، نوروژنز به منطقه ساب‌گرانولار شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ محدود می‌شود که دارای یک میکرو محیط فعال است که اجازه می‌دهد نوروژنز در طول زندگی ادامه یابد. این فرآیند بسیار پویا توسط عوامل داخلی و خارجی از جمله انتقال دهنده‌های عصبی مثل استیل‌کولین و سوء مصرف داروها تأثیر می‌پذیرد [۸]. قرار گرفتن در معرض اتانول در نوجوانان موجب کاهش نوروژنز در شکنج دندانه‌ای هیپوکمپ پشتی [۹] و هم‌چنین اختلالات در حافظه و نقص در عملکرد شناختی می‌شود [۸].

آسیب‌شناسی این اختلال نقش محوری استرس اکسیداتیو را نشان می‌دهد. مصرف اتانول تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species; ROS) مضر را افزایش داده و منجر به تهی شدن مغز از آنتی‌اکسیدان‌های دفاعی می‌شود [۱۰]. استالدهید یک ترکیب بیولوژیکی فعال است که موجب آسیب عصبی می‌شود و در اعتیاد به الکل و هم‌چنین ایجاد سرخوشی در غلظت‌های کم نقش دارد. آنزیم‌های سیتوکروم (Cytochrome P450 2E1; CYP2E1) P450 و کاتالاز مسیرهای اصلی در مغز هستند که اتانول را به استالدهید متابولیزه می‌کنند. CYP2E1، اکسیژن مولکولی را به آب کاهش می‌دهد و در نتیجه اتانول به استالدهید اکسید می‌شود [۱۱]. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که مصرف مزمن اتانول با آسیب اکسیداتیو به پروتئین‌های سلولی، لیپیدها و DNA (Deoxyribonucleic acid) و هم‌چنین کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌های درون‌زا همراه است [۱۲]. استرس اکسیداتیو طولانی مدت در مغز باعث اختلال عملکرد عصبی و مرگ سلولی می‌شود که می تواند منجر به تخریب عصبی شود [۱۳].

سیلی‌مارین (Silymarin)، عصاره‌ای از گیاه خار مریم (*Silybum marianum*) و در واقع مخلوطی از ایزومرهای سیلی‌بین، ایزوسیلی‌بین، سیلی دیانین و سیلی کریستین است. این مخلوط یک آنتی‌اکسیدان قوی و به عنوان پاک کننده رادیکال‌های آزاد در بدن انسان عمل می‌کند که توانایی مهار پراکسیداسیون لیپیدی را دارد [۱۴]. با کاهش سطح گلوتاتیون (Glutathione; GSH) احیاء شده سلول را از استرس‌اکسیداتیو محافظت می‌کند. گزارش شده است که سیلی‌مارین از مسیرهای مختلف از جمله فعالیت مستقیم مهار رادیکال‌های آزاد، با جلوگیری از تشکیل رادیکال‌های آزاد با کمک به مهار آنزیم‌های خاص مسئول تولید رادیکال های آزاد و با حفظ وضعیت ردوکس بهینه سلول با فعال کردن یک طیف وسیعی از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-05-17]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1402.22.6.2.6]
[DOI: 10.61186/jrums.22.6.555]

آنزیمی، عمدتاً از طریق فاکتورهای رونویسی، از جمله NF-E2-related factor 2 (Nrf2) به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند [۱۵]. علاوه بر این، احتمالاً سیلی‌مارین به علت شباهت ساختاری با استروژن، مشابه ترکیباتی مانند سروتونین عمل می‌کند و سب کاهش رفتارهای اضطراب و به دنبال آن اختلالات یادگیری می‌گردد [۱۶].

بر طبق جستجوهای انجام شده، تاکنون خواص آنتی اکسیدانی سیلی‌مارین بر اختلالات عصبی ناشی از مصرف الکل مورد پژوهش و بررسی قرار نگرفته است، بنابراین هدف از این پژوهش تعیین اثرات آنتی‌اکسیدانی سیلی‌مارین بر اختلالات یادگیری و اضطراب ناشی از اتانول در موش صحرایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در سال ۱۴۰۰ در دانشگاه مازندان انجام شد. تعداد ۳۵ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با محدوده وزنی ۳۰±۲۰۰ گرم در اتاق حیوانات دانشگاه مازندران در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵±۵۰ درصد نگه‌داری شدند. به‌منظور سازگاری حیوانات با محیط، آزمایش‌ها یک هفته پس از انتقال حیوانات به آزمایشگاه انجام گردید. کلیه آزمایشات مطابق با آیین‌نامه کمیته اخلاق زیستی معاونت پژوهشی دانشگاه مازندران با کد اخلاق IR.UMZ.REC.1400.012 انجام شد.

به منظور ایجاد مدل اتانولی، اتانول ۴گرم بر کیلوگرم به مدت ۱۴ روز به گروه اتانول و گروه‌های تیمار خورانده شد [۱۰]. حیوانات به طور تصادفی به ۵ گروه ۷تایی شامل گروه کنترل، اتانول و گروه‌های تیمار شده با پودر سیلی‌مارین (سیگما، آمریکا) ۵۰، سیلی‌مارین ۱۰۰ و سیلی‌مارین ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تقسیم شدند. موش‌ها در گروه تیمار ابتدا اتانول ۴گرم بر کیلوگرم را به‌صورت گاواژ دریافت کرده و بعد از دو ساعت به ترتیب مقدار ۰/۰۱۲، ۰/۰۲۵، ۰/۰۳۷ گرم از سیلی‌مارین در ۰/۱ سی‌سی آب مقطر (موش ۲۵۰ گرمی) [۱۷] را صورت گاواژ به مدت ۱۴ روز دریافت کردند.

در این مطالعه از تست رفتاری ماز صلیبی بالاتر از زمینه (Elevated plus Maze; EPM) برای بررسی رفتارهای شبه‌اضطرابی استفاده شد. دستگاه مورد استفاده یک ماز چوبی به شکل به علاوه است. این ماز دارای دو بازوی باز بدون دیواره و دو بازوی بسته با دیوارهای به ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر می‌باشد. طول و عرض بازوی باز به ترتیب ۵۰ و ۱۰ سانتی‌متر است که به صورت عمود به بازوهای بسته به ابعاد ۱۰ سانتی‌مترمربع در ناحیه مرکز متصل می‌باشند. این مجموعه بر روی پایه‌ای به ارتفاع ۵۰ سانتی‌متر از سطح زمین قرار دارد. قبل از شروع آزمایش، موش‌ها به مدت ۵ دقیقه در دستگاه قرار گرفتند تا با محیط آشنا شوند. حیوانات در قسمت مرکز دستگاه و رو به بازوی باز قرار داده شدند و به مدت ۵ دقیقه اجازه داشتند تا در بازوهای باز و بسته حرکت کنند. پارامترهای زیر به‌روش مشاهده و با استفاده از کرنومتر (مدل F-5853T، چین) اندازه‌گیری شد. درصد زمان گذرانده شده در بازوی باز (%OAT) و درصد ورود به بازوی باز (%OAE) به عنوان فاکتورهای استاندارد ارزیابی اضطراب محاسبه شدند. افزایش ورود به بازوهای باز و افزایش مدت زمان سپری شده در بازوی باز شاخص کاهش اضطراب در موش تلقی شد [۱۸].

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-05-17]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1402.22.6.2.6]
[DOI: 10.61186/jrums.22.6.555]

حافظه، توجه و توانایی‌های تمایز با آزمون تشخیص شی جدید (Novel Object Recognition Test; NORT) مورد آزمایش قرار گرفتند [۱۹]. روش کار شامل سه مرحله عادت کردن، آشنایی و مرحله آزمایش بود [۲۰]. موش‌ها یک روز قبل از تمرین به مدت ۱۰ دقیقه به جعبه خالی تمرین عادت کردند. در مرحله آموزش این کار، یک موش به مدت پنج دقیقه در جعبه‌ای قرار داده شد که دو جسم یکسان به زمین چسبانده شده بود. پس از یک فاصله زمانی ۲۴ ساعته، موش ها در همان جعبه به مدت ۵ دقیقه با شیء آشنا و یک شیء جدید قرار داده شدند. زمانی که یک موش در تماس با جسم بود یا در فاصله ۲ سانتی‌متری به سمت شیء هدایت می‌شد، در حال تعامل با جسم بود، زمان صرف شده با اشیاء در طول تمرین توسط دوربین برای ارزیابی هرگونه سوگیری موش‌ها ثبت شد و در طول آزمایش یک نسبت تمایز محاسبه شد [۲۱].

بیست و چهار ساعت پس از پایان تست‌های رفتاری، حیوانات با کلروفرم بیهوش شدند و بعد از انجام رپرفیوژن قلبی، بافت مغز خارج و ناحیه هیپوکامپ آن‌ها جدا شد. ۱۵۰ میلی‌گرم از بافت هیپوکامپ مغز در ۱/۵ میلی‌لیتر بافر تریس (pH=۷/۴) شامل ۰/۳۲ مول بر لیتر ساکارز، ۱ میلی‌مول بر لیتر EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) هموژن گردید. سپس، محلول حاوی بافت هموژن شده با سرعت ۱۳۶۰۰ دور به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (مدل 3-k 30، ساخت شرکت sigma آلمان) شد. در نهایت مایع شفاف بالایی، برای سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و سطح گلوتاتیون مورد استفاده قرار گرفت [۲۲]. غلظت کل پروتئین در مایع رویی هموژن مغز به روش Bradford با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد تعیین شد [۲۳]. برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز از مخلوط واکنش، حاوی بافر سدیم فسفات با غلظت ۵۰ میلی‌مولار در pH=۷ به‌همراه ۱۰ میلی‌مولار H_2O_2 استفاده شد. پس از اضافه کردن عصاره آنزیمی به مخلوط واکنش، جذب محلول در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه خوانده شد [۲۴].

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اساس روش genet انجام شد. به طور خلاصه مخلوط واکنش، شامل بافر سدیم فسفات با غلظت ۵۰ میلی‌مولار pH=۷ است که حاوی ۰/۴۸ میلی‌مولار پیروگالل و ۰/۱ میلی مولار EDTA می‌باشد. جذب محلول در طول موج ۴۲۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه خوانده شد [۲۵].

سطح گلوتاتیون احیاء شده بر اساس روش Fukazawa و Tokumura تعیین شد. به طور خلاصه، ۱۳۰ میکرولیتر 5,5 Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)– (۰/۰۴ درصد) با ۲۰۰ میکرولیتر مایع رویی و ۱/۱ میلی‌لیتر از بافر فسفات سدیم (pH=۷/۴) ۰/۲۵ مولار مخلوط شد. سپس آب مقطر به حجم نهایی ۱/۵ میلی‌لیتر اضافه شد و جذب در طول موج ۴۱۲ نانومتر خوانده شد و نتایج به صورت میلی‌گرم گلوتاتیون بر گرم پروتئین بیان شد [۲۲].

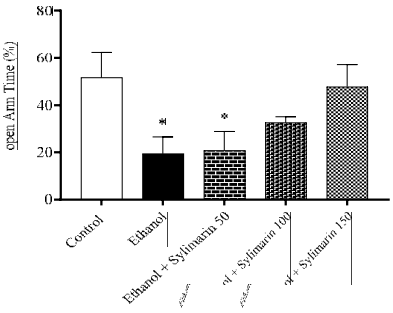
داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Prism نسخه ۸ تجزیه و تحلیل شد. نتایج به‌صورت "انحراف معیار±میانگین" گزارش شده است. به منظور ارزیابی نرمال بودن توزیع متغیرهای مورد بررسی از آزمون Shapiro–Wilk استفاده شد و تخطی از پیش‌فرض نرمال

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-05-17]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1402.22.6.2.6]
[DOI: 10.61186/jrums.22.6.555]

بودن مشاهده نشد (P>۰/۰۵). هم‌چنین، آزمون Levene برای ارزیابی همگنی واریانس گروه‌ها استفاده شد و همگنی واریانس گروه‌ها نیز مورد تأیید قرار گرفت (P>۰/۰۵). در نهایت مقایسه بین میانگین گروه‌ها توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey انجام شد. سطح معنی داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

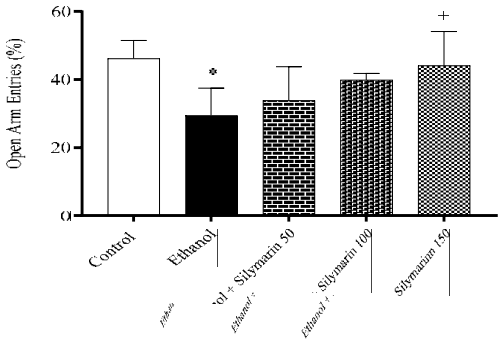
نتایج

با توجه به نمودار ۱، میانگین مدت زمان حضور در بازوی باز در گروه اتانول و گروه تیمار با سیلی‌مارین ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، در مقایسه با گروه کنترل، کاهش معنادار نشان داده است (P<۰/۰۰۱). این در حالی است که این شاخص در گروه تیمار با سیلی‌مارین ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم افزایش معنادار نسبت به گروه اتانول نشان داده است (P<۰/۰۰۱).



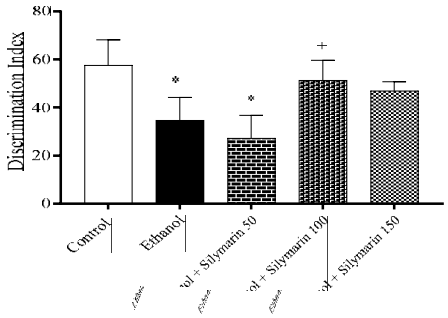
نمودار ۱- اثر تیمار با سیلی‌مارین بر مدت زمان حضور در بازوی باز در تست ماز صلیبی
نمودار به صورت "انحراف معیار ± میانگین" رسم شده است. آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey
**** اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۰۱)، + اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه اتانول (P<۰/۰۰۱)***

با توجه به نمودار ۲، میانگین تعداد دفعات ورود به بازوی باز در گروه اتانول کاهش معنادار را نسبت به گروه کنترل نشان داده است (P=۰/۰۰۷). گروه تیمار با سیلی‌مارین ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم افزایش معنادار نسبت به گروه اتانول نشان داده است (P=۰/۰۲۲).



نمودار ۲- اثر تیمار با سیلی‌مارین بر تعداد دفعات ورود به بازوی باز در تست ماز صلیبی
نمودار به صورت "انحراف معیار ± میانگین" رسم شده است. آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey
**** اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل (P=۰/۰۰۷)، + اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه اتانول (P=۰/۰۲۲)***

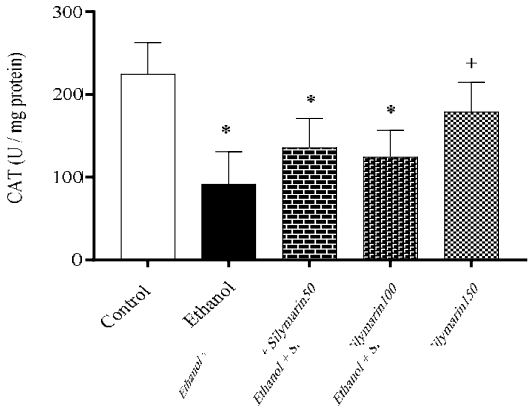
با توجه به نمودار ۳، میانگین شاخص تبعیض در گروه اتانول و گروه تیمار با سیلی‌مارین ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش معنادار را نسبت به گروه کنترل نشان داد (P<۰/۰۰۱). گروه تیمار با سیلی‌مارین ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم افزایش معنادار را نسبت به گروه اتانول نشان داده است (P=۰/۰۱۹).



نمودار ۳- اثر تیمار با سیلی‌مارین بر شاخص تبعیض در آزمون تشخیص شیء جدید
نمودار به صورت "انحراف معیار ± میانگین" رسم شده است. آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey
**** اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۰۱)، + اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه اتانول (P=۰/۰۱۹)***

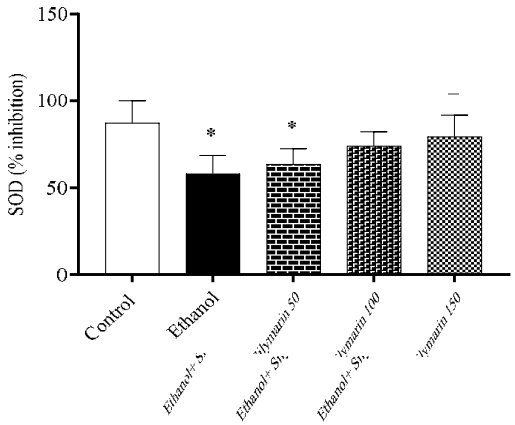
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-05-17]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1402.22.6.2.6]
[DOI: 10.61186/jrums.22.6.555]

در بررسی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در ناحیه هیپوکامپ مغز بر اساس نمودار ۴، در گروه اتانول (P<۰/۰۰۱) و گروه‌های تیمار با سیلی‌مارین ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (P=۰/۰۰۷) و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (P=۰/۰۰۲) کاهش معنادار را نسبت به گروه کنترل نشان داده‌اند و گروه تیمار با سیلی‌مارین ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم افزایش معنادار را نسبت به گروه اتانول نشان داد (P=۰/۰۰۸).



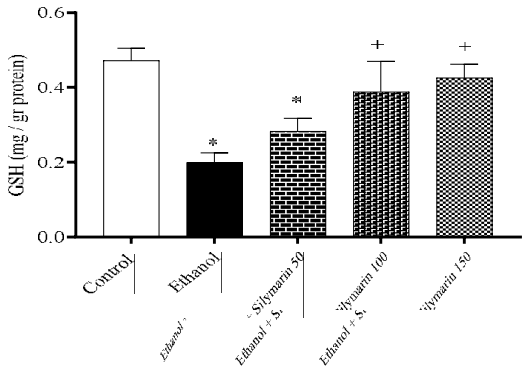
نمودار ٤- اثر تیمار با سیلی‌مارین بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در ناحیه هیپوکامپ مغز
نمودار به صورت "انحراف معیار ± میانگین" رسم شده است. آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey
****اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۵)، +اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه اتانول (P=۰/۰۰۸)***

در بررسی میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در ناحیه هیپوکامپ مغز بر اساس نمودار ۵، گروه اتانول (P=۰/۰۰۲) و گروه تیمار با سیلی‌مارین ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش معنادار (P=۰/۰۱۷) را نسبت به گروه کنترل نشان داده‌اند. گروه تیمار با سیلی‌مارین ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم افزایش معنادار را نسبت به گروه اتانول نشان داده است (P=۰/۰۳۶).



نمودار ٥- اثر تیمار با سیلی‌مارین بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ناحیه هیپوکامپ مغز
نمودار به صورت "انحراف معیار ± میانگین" رسم شده است. آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey
****اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۵)، +اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه اتانول (P=۰/۰۳٦)***

در بررسی میانگین سطح گلوتاتیون در ناحیه هیپوکامپ مغز بر اساس نمودار ۶، گروه اتانول و سیلی‌مارین ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش معنادار را نسبت به گروه کنترل نشان داده است (P<۰/۰۰۱). گروه‌های تیمار با سیلی‌مارین ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم افزایش معنادار را نسبت به گروه اتانول نشان داده‌اند (P<۰/۰۰۱).



نمودار ٦- اثر تیمار با سیلی‌مارین بر سطح گلوتاتیون (GSH) در ناحیه هیپوکامپ مغز
نمودار به صورت "انحراف معیار ± میانگین" رسم شده است. آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey
****اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۰۱)، +اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه اتانول (P<۰/۰۰۱)***

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-05-17]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1402.22.6.2.6]
[DOI: 10.61186/jrums.22.6.555]

بحث

در مطالعه حاضر، به بررسی تأثیرات مصرف سیلی‌مارین بر رفتارهای شبه اضطرابی، اختلالات حافظه و یادگیری و هم‌چنین استرس اکسیداتیو در ناحیه هیپوکامپ مدل اتانولی پرداخته شد. هیپوکمپ از جمله اصلی‌ترین مناطق مغز است که عملکرد یادگیری و حافظه در آن کنترل می شود، منطقه‌ای که گزارش شده است در برابر اثرات تراتوژنیک الکل آسیب‌پذیر است. یکی از مکانیسم‌هایی که توسط آن اتانول به سیستم عصبی مرکزی آسیب می‌رساند، تولید ROS و کاهش سطح آنتی‌اکسیدان است [۵].

بر اساس تحلیل داده‌های به دست آمده از این مطالعه، در گروه اتانول با توجه به کاهش تعداد دفعات ورود به بازوهای باز و کاهش مدت زمان حضور در بازوهای باز رفتارهای شبه اضطرابی نسبت به گروه کنترل مشهود است و برای تشخیص حافظه و یادگیری حیوانات از تست تشخیص شیء جدید استفاده شد که بر اساس تحلیل آماری مشخص شد که اتانول موجب کاهش قدرت تمایز و تشخیص گشته است. هم‌چنین، مشاهده شده است که پس از مصرف اتانول فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز و سطح گلوتاتیون در ناحیه هیپوکامپ کاهش یافته است. در راستای این مطالعه، گزارش شده است که مصرف الکل سبب انحطاط عصبی، اختلال در هدایت الکتریکی مغز می‌شود که احتمالاً این اختلالات به دلیل وقوع استرس‌اکسیداتیو و نقص میلین ناشی از مصرف این ماده می‌باشد [۲۶]. به طور کلی، مصرف مداوم الکل ممکن است منجر به بروز درجات مختلفی از اختلالات شناختی از جمله زوال عقل شدید شود [۲۷].

در راستای مطالعه حاضر Hernández و همکاران پی بردند که در صورتی که سطوح ROS از توانایی سلول برای از بین بردن آن‌ها فراتر رود یا اگر سطوح طبیعی آنتی‌اکسیدان در سلول به دلیل یک عامل سمی مانند الکل کاهش یابد، استرس اکسیداتیو می‌تواند رخ دهد. این استرس اکسیداتیو می‌تواند باعث آسیب به اجزاء سلولی مانند غشاء، DNA و پروتئین‌ها شود [۱۱]. Dominguez و همکارانش نشان داده اند که کاهش حافظه کاری و افزایش رفتارهای اضطرابی به‌عنوان آسیب‌های طولانی مدت ناشی از مصرف مزمن الکل در نظر گرفته می‌شود [۲۸]. همسو با نظر نویسندگان این مقاله، Zhao و همکارانش با تحقیق بر نقص شناختی و مرگ نورونی پس از قرار گرفتن در معرض متناوب اتانول به این نتیجه رسیدند که مرگ نورون‌ها در قشر انتورینال و هیپوکامپ به دلیل مصرف اتانول ممکن است مستقیماً مسئول نقص حافظه مشاهده شده در NORT باشد [۲۹].

امروزه سیلی‌مارین به دلیل خواص متعددی مانند آنتی اکسیدان و ضدالتهاب در انواع اختلالات مورد بررسی قرار گرفته است. مطالعات نشان داده که عوارض جانبی کمی در انسان دارد [۱۵]. تحلیل داده‌های آماری به دست آمده از مطالعه حاضر، تأثیر مثبت سیلی‌مارین بر اثرات مخرب ناشی از اتانول کاملاً مشهود است. مصرف سیلی‌مارین، فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز و سطح گلوتاتیون گروه‌های تیمار نسبت به گروه اتانول و هم‌چنین درصد ورود به بازوی باز و درصد دفعات ورود به بازوی باز در تست ماز صلیبی و شاخص تبعیض در تست تشخیص شیء جدید نسبت به گروه اتانول افزایش داده است.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-05-17]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1402.22.6.2.6]
[DOI: 10.61186/jrums.22.6.555]

Thakare و همکارانش نشان دادندکه مصرف سیلی‌مارین در دو دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت خوراکی برای ۲۱ روز متوالی موجب کاهش سیتوکین‌ها، اینترلوکین۶، مالون‌دی‌آلدهید و افزایش پارامترهای آنتی اکسیدانی، سوپراکسید دیسموتاز وکاتالاز در ناحیه هیپوکامپ موش شده است که از طریق این مکانیسم احتمالاً پتانسیل درمانی مناسبی در کاهش افسردگی خفیف و استرس مزمن دارد [۳۰]. Roghani، اثر دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم سیلی‌مارین را بر روی موش‌های نیمه پارکینسونی بررسی نمود که نتیجه افزایش سطح سوپراکسید دیسموتاز و کاهش سطح مالون‌دی‌آلدهید و در نهایت کاهش استرس اکسیداتیو از طریق مسیر استروژنیک بود [۳۱].

Yaghmaei و همکارانش، به منظور تعیین اثر سیلی‌مارین بر یادگیری و تغییرات بافت‌شناسی هیپوکامپ، از دوزهای ۹۰ و ۱۸۰میلی‌گرم بر کیلوگرم سیلی‌مارین به صورت درون صفاقی در موش‌های صحرایی استفاده نمودند و نتیجه این بود که سیلی‌مارین موجب افزایش یادگیری و حافظه می‌شود و این اثرات وابسته به دوز است [۳۲]. Sahhinfar و همکارانش گزارش کردند که کمپلکس سیلی‌مارین موجود در گیاه خارمریم با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی و تعدیل میزان گلوتاتیون دارای توانایی حفاظت نورون‌ها در برابر استرس اکسیداتیو است و با جمع کردن رادیکال‌های آزاد و بافرینگ آهن بر ویژگی‌های غشاء سلولی اثر می‌گذارد. در نتیجه موجب توانایی نگه‌داری اطلاعات در حافظه و به یادآوری آن‌ها می‌شود [۳۳]. Bahram Kalhori و همکارانش با گاواژ دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سیلی‌مارین و بررسی اثرات آن پی بردند که سیلی‌مارین احتمالاً به واسطه خواص آنتی‌اکسیدانی خود باعث بهبود اختلال حافظه و یادگیری القاء شده با نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم می‌شود [۳۴].

در مطالعه حاضر نشان داده شده است که احتمالاً سیلی مارین به سبب خواص آنتی‌اکسیدانی خود موجب بهبود رفتارهای افسردگی و کاهش اختلالات یادگیری ناشی از مصرف اتانول گردید. به دلیل کمبود امکانات و زمان، پژوهش‌گران این مطالعه موفق به بررسی مولکولی و مسیرهای دقیق آنتی‌اکسیدانی و التهابی ناشی از اتانول نشده‌اند. پیشنهاد می‌گردد به منظور بررسی مکانیسم دقیق آنتی‌اکسیدانی سیلی‌مارین در مطالعات آینده بررسی‌های مولکولی مسیر سیگنالینگ keap-1 و nrf-2 مورد آزمایش قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، سیلی‌مارین با افزایش سطح آنتی‌اکسیدان‌های درون سلولی سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون سبب بهبود اثرات مخرب ناشی از استرس اکسیداتیو ناشی از اتانول در ناحیه هیپوکامپ گردید و احتمالاً به واسطه خواص آنتی‌اکسیدانی خود سبب کاهش اضطراب و اختلالات یادگیری شد. ارائه مکانیسم دقیق سیلی‌مارین نیاز به پژوهش و مطالعات مولکولی دقیق‌تر در آینده دارد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از پایان‌نامه دانشجوی کارشناسی ارشد بوده است. از حمایت‌های مادی معاونت محترم علمی پژوهشی دانشگاه مازندران صمیمانه سپاسگزاریم.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-05-17]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1402.22.6.2.6]
[DOI: 10.61186/jrums.22.6.555]

References

[1] Kurniawan A, Abe K, Ohashi K, Nomura T, Akiyama T. Reduction of mild-dehydrated, low-grade iron ore by ethanol. *Fuel Processing Technology* 2018; 178: 156-65.

[2] Zorumski CF, Mennerick S, Izumi Y. Acute and chronic effects of ethanol on learning-related synaptic plasticity. *Alcohol* 2014; 48(1): 1-7.

[3] Jeong JS, Jeon H, Ko KM, Chung B, Choi GW. Production of anhydrous ethanol using various PSA (Pressure Swing Adsorption) processes in pilot plant. *Renewable Energy* 2012; 42: 41-5.

[4] Chopra K, Tiwari V. Alcoholic neuropathy: possible mechanisms and future treatment possibilities. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2012; 73(3): 348-62.

[5] Soleimani E, Goudarzi I, Abrari K, Lashkarbolouki T. The combined effects of developmental lead and ethanol exposure on hippocampus dependent spatial learning and memory in rats: Role of oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology* 2016; 96: 263-72.

[6] Squeglia LM, Jacobus J, Tapert SF. The effect of alcohol use on human adolescent brain structures and systems. *Handbook of Clinical Neurology* 2014; 125: 501-10.

[7] Mira RG, Lira M, Tapia-Rojas C, Rebolledo DL, Quintanilla RA, Cerpa W. Effect of alcohol on hippocampal-dependent plasticity and behavior: role of glutamatergic synaptic transmission. *Frontiers in behavioral Neuroscience* 2020; 13: 288.

[8] Vetreno RP, Crews FT. Binge ethanol exposure during adolescence leads to a persistent loss of neurogenesis in the dorsal and ventral hippocampus that is associated with impaired adult cognitive functioning. *Frontiers in Neuroscience* 2015; 9: 35.

[9] Ehlers CL, Liu W, Wills DN, Crews FT. Periadolescent ethanol vapor exposure persistently reduces measures of hippocampal neurogenesis that are associated with behavioral outcomes in adulthood. *Neuroscience* 2013; 244: 1-5.

[10] Taati M, Alirezaei M, Moshkatalsadat MH, Rasoulian B, Moghadasi M, Sheikhzadeh F, et al. Protective effects of Ziziphus jujuba fruit extract against ethanol-induced hippocampal oxidative stress and spatial memory impairment in rats. *Journal of Medicinal Plants Research* 2011; 5(6): 915-21.

[11] Hernández JA, López-Sánchez RC, Rendón-Ramírez A. Lipids and oxidative stress associated with ethanol-induced neurological damage. *Oxidative medicine and Cellular Longevity* 2016; 2016.

[12] Patil S, Tawari S, Mundhada D, Nadeem S. Protective effect of berberine, an isoquinoline alkaloid ameliorates ethanol-induced oxidative stress and memory dysfunction in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2015; 136: 13-20.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-05-17]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1402.22.6.2.6]
[DOI: 10.61186/jrums.22.6.555]

[13] Kamal H, Tan GC, Ibrahim SF, Shaikh MF, Mohamed IN, Mohamed RM, et al. Alcohol use disorder, neurodegeneration, Alzheimer's and Parkinson's disease: Interplay between oxidative stress, neuroimmune response and excitotoxicity. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2020; 14: 282.

[14] Younis N, Shaheen MA, Abdallah MH. Silymarin-loaded Eudragit RS100 nanoparticles improved the ability of silymarin to resolve hepatic fibrosis in bile duct ligated rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2016; 81: 93-103.

[15] Jaggi AS, Singh N. Silymarin and its role in chronic diseases. *Drug Discovery from Mother Nature* 2016: 25-44.

[16] Khazaei R, Seidavi A, Bouyeh M. A review on the mechanisms of the effect of silymarin in milk thistle *(Silybum marianum)* on some laboratory animals. *Veterinary Medicine and Science* 2021; 2.

[17] Nikkhah S, Hafshejan RJ, Hajivar FG, Khashei K, Afzali S. Effects of Silymarin on Blood Glucose Concentration, Hepatic Histopathological Changes and FOXA2 and FOXA3 Gene Expression in Streptozotocin-Induced Diabetic Male Wistar Rats. *Genetics & Applications* 2021; 5(2): 17-23.

[18] Safari H, Miladi Gorji H. Anxiety-like behavior profile in morphine dependent rats exposed to acute and chronic stress. *Tehran University Medical Journal* 2013; 70(11).

[19] Bonito-Oliva A, Pignatelli M, Spigolon G, Yoshitake T, Seiler S, Longo F, et al. Cognitive impairment and dentate gyrus synaptic dysfunction in experimental parkinsonism. *Biological Psychiatry* 2014; 75(9): 701-10.

[20] Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing* 2012; 13: 93-110.

[21] Yang K, Broussard JI, Levine AT, Jenson D, Arenkiel BR, Dani JA. Dopamine receptor activity participates in hippocampal synaptic plasticity associated with novel object recognition. *European Journal of Neuroscience* 2017; 45(1): 138-46.

[22] Moghaddam AH, Zare M. Neuroprotective effect of hesperetin and nano-hesperetin on recognition memory impairment and the elevated oxygen stress in rat model of Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018; 97: 1096-101.

[23] Goc Z, Szaroma W, Kapusta E, Dziubek K. Protective effects of melatonin on the activity of SOD, CAT, GSH-Px and GSH content in organs of mice after administration of SNP. *Chin J Physiol* 2017; 60(1): 1-10.

[24] Javed H, Nagoor Meeran MF, Azimullah S, Adem A, Sadek B, Ojha SK. Plant extracts and phytochemicals targeting α-synuclein aggregation in Parkinson's disease models. *Frontiers in Pharmacology* 2019; 9: 1555.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-05-17]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1402.22.6.2.6]
[DOI: 10.61186/jrums.22.6.555]

[25] 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. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2002; 236: 7-12.

[26] Pervin Z, Stephen JM. Effect of alcohol on the central nervous system to develop neurological disorder: pathophysiological and lifestyle modulation can be potential therapeutic options for alcohol-induced neurotoxication. *AIMS Neuroscience* 2021; 8(3): 390.

[27] Kwok CL. Central Nervous System Neurotoxicity of Chronic Alcohol Abuse. *Asia Pac J Med Toxicol* 2016; 2: 70-1.

[28] Dominguez G, Belzung C, Pierard C, David V, Henkous N, Decorte L, et al. Alcohol withdrawal induces long-lasting spatial working memory impairments: relationship with changes in corticosterone response in the prefrontal cortex. *Addiction Biology* 2017; 22(4): 898-910.

[29] Zhao YN, Wang F, Fan YX, Ping GF, Yang JY, Wu CF. Activated microglia are implicated in cognitive deficits, neuronal death, and successful recovery following intermittent ethanol exposure. *Behavioural Brain Research* 2013; 236: 270-82.

[30] Thakare VN, Patil RR, Oswal RJ, Dhakane VD, Aswar MK, Patel BM. Therapeutic potential of silymarin in chronic unpredictable mild stress induced depressive-like behavior in mice. *Journal of Psychopharmacology* 2018; 32(2): 223-35.

[31] Roghani M. Role of estrogenic receptors and oxidative stress on protective effect of aqueous extract of Silybum marianum in hemi-parkinsonian rat. *Trauma Monthly* 2011; 2010: 207-12.

[32] Yaghmaei PA, Parivar KA, Darab M, Oryan SH, Abbasi ES. The effect of silimarin on learning and histological changes of hippocampal regions in male offsprings of rat. *Journal of Inflammatory Diseases* 2010; 14(3): 24-30.

[33] Sahhinfar J, Zeraati H, Imani Hesary S, Masrorniya M, Shojaei S. The effect of mint extract on the incidence and severity of nausea and vomiting after cesarean section under spinal anesthesia: A Randomized Clinical Trial. *Journal of Patient Safety & Quality Improvement* 2017; 5(1): 482-7.

[34] Bahram Kalhori P, Hajizade Moghaddam A, Zare M, Sayrafi R. The effect of silymarin on memory and learning disorders induced by TiO_2 nanoparticles. *Daneshvar Medicine* 2020; 25(5): 39-44.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-05-17]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1402.22.6.2.6]
[DOI: 10.61186/jrums.22.6.555]

Silymarin Antioxidant Effect on Ethanol-Induced Anxiety and Learning Impairments in Rats: An Experimental Study

Maryam Gholizadeh[1], Akbar Hajizadeh Moghaddam[2], Farhad Valizadegan[3], Sedigheh Khanjani Jelodar[4]

Received: 28/01/23 Sent for Revision: 04/03/23 Received Revised Manuscript: 15/07/23 Accepted: 17/07/23

Background and Objectives: Ethanol has shown strong neurodegenerative consequences in brain that are associated with oxidative stress. The aim of this study was to investigate the effects of silymarin on oxidative stress, anxiety, and learning disorder induced by ethanol in rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 35 male Wistar rats with 200gr average weight were divided into five groups. The control group and four groups that received 4 gr/kg ethanol for 14 days. Three treatment groups were treated with doses of 50, 100, and 150 mg/kg silymarin for 14 days, respectively. Cognitive impairment and anxiety were assessed. The average activity of catalase and superoxide dismutase enzymes and glutathione (GSH) level in the hippocampus were also assessed. Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) and Turkey's post hoc test.

Results: Ethanol consumption significantly decreased the discrimination index ($p<0.001$), the percentage of open arm time (%OAT) ($p<0.001$), and the percentage of open arm entry (%OAE) ($p=0.007$) compared to the control group. Also, it reduced the activity of antioxidants catalase ($p<0.001$), superoxide dismutase ($p=0.002$), and glutathione level ($p<0.001$) compared to the control group, while silymarin consumption with dose 150 mg/kg significantly increased the discrimination index, OAE ($p=0.022$), and OAT ($p=0.023$) compared to the ethanol group. Also, it increased antioxidant activity of catalase ($p=0.008$), superoxide dismutase ($p=0.030$), and glutathione ($p<0.001$) compared to the ethanol group.

Conclusion: Silymarin may protect the hippocampus against behavioral disorder induced by ethanol consumption by increasing the level of antioxidants.

Key words: Silymarin, Cognitive impairment, Oxidative stress, Anxiety, Hippocampus, Rat

Funding: This study was funded by Mazandaran University.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Mazandaran University approved the study (IR.UMZ.REC.1400.012).

How to cite this article: Gholizadeh Maryam, Hajizadeh Moghaddam Akbar, Valizadegan Farhad, Khanjani Jelodar Sedigheh Silymarin Antioxidant Effect on Ethanol-Induced Anxiety and Learning Impairments in Rats: An Experimental Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2023; 22 (6): 555-66. [Farsi]

1- MSc in Physiology, Dept. of Animal Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
2- Associate Prof. of Physiology, Dept. of Animal Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran, ORCID: 0000-0002-0843-8440
(Corresponding Author) Fax: (011) 35302453, Tel: (011) 35302453, E-mail: a.hajizadeh@umz.ac.ir
3- Assistant Prof. of Physiology, Dept. of Animal Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
4- Assistant Prof. of Physiology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-05-17]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1402.22.6.2.6]
[DOI: 10.61186/jrums.22.6.555]