ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۴، شماره۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۸(شماره پی در پی۱۳۴)

Archiv

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019

اثر حفاظتی گلیسیریزین بر سلول‌های گلیال B92 آسیب دیده با اتانول در محیط کشت

لیلا صالح حق گو[۱]، شیوا خضری[۱*]، سید میثم ابطحی فروشانی[۲]

[۱]گروه زیست‌شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه ، ایران، [۲]گروه میکروب شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۷/۰۸/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: گلیسیریزین از جمله مهم‌ترین ترکیب‌های فارماکولوژیک گیاه شیرین بیان می‌باشد و دارای خواص ضدالتهابی است.اتانول جزء مواد آسیب‌زا در مغز است .استفاده روز افزون از این ماده میزان ضایعات عصبی را بالا برده است، لذا هدف از این تحقیق بررسی اثرات حفاظتی گلیسیریزین بر سلول‌های گلیال B92 آسیب دیده با اتانول بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که در سال۱۳۹۷ اجرا شد، سلول‌های B92 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهیه شدند و با تراکم ۱×۱۰^{۶} به پلیت ۹۶ خانه انتقال داده شدند. سپس به مدت ۲۴ ساعت با گلیسیریزین(۵،۱۰ و ۲۵ میکرومولار) انکوبه شدند. آنگاه سلول‌ها به مدت ۸۰ دقیقه با اتانول مطلق با غلظت ۸۶ میلی‌مولار مجاور شدند. آنگاه میزان قدرت حیاتی سلول‌ها با تست‌های برداشت نوترال رد(NR) و احیای نمک تترازولیوم(MTT) ارزیابی شدند. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: گلیسیریزین به طور وابسته به دوز، آسیب وارد شده به وسیله اتانول به غشاء سلولی و میتوکندری سلول‌ها را کاهش داد. به طوری که گلیسیریزین در غلظت ۱۰ و ۲۵ میکرو مولار باعث کاهش معنی‌دار آسیب غشایی شده و آسیب وارد شده به عملکرد میتوکندری‌ها را کاهش معنی‌داری داد، ولی در غلظت ۵ میکرومولار نه تنها اثر حفاظتی نداشت، بلکه باعث کاهش رشد و تکثیر سلول‌ها شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره گیاه شیرین بیان(گلیسیریزین) بر میزان زنده مانی سلول‌ها اثر مثبت دارد و قابلیت حیاتی سلول‌های گلیال آسیب دیده با اتانول را بهبود می‌بخشد. پس گلیسیریزین می‌تواند به طور وابسته به دوز اثرات حفاظتی در مقابل آسیب‌های ناشی از اتانول در سلول‌های B92 داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: سلول گلیال B92، گلیسیریزین، اتانول، محیط کشت، آسیب سلولی

***نویسنده مسئول: شیوا خضری**، ارومیه، دانشگاه ارومیه، گروه زیست شناسی

Email: sh.khezri@urmia.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019

مقدمه

در سال‌های اخیر استفاده روز افزون از داروهای گیاهی و طبیعی در اکثر کشورهای جهان و انجام تصاعدی پژوهش‌های سم‌شناسی، فاماکولوژی و بالینی در امر شناسایی خواص درمانی گیاهان مختلف موجب شناخت آثار جدید و بارز درمانی از گیاهان شده است. کشور ما هم سابقه بسیار طولانی در استفاده از منابع گیاهی دارد(۱). طبق گفته سازمان بهداشت جهانی استفاده از گیاهان دارویی و سنتی نه تنها در کشورهای در حال توسعه بلکه در مناطق صنعتی نیز به عنوان مکمل گسترش یافته است(۲). شیرین بیان با نام علمی*Glycyrrhiza glabra* و فرمول C42H62O16 یک گیاه درمانی سنتی و یکی از جنس‌های تیره پروانه آسا است که و دارای چندین گونه و زیر گونه می‌باشد. ریشه این گیاه از زمان‌های قدیم در طب سنتی و هم‌چنین امروزه در درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌شود. این گیاه دارای خواص ضد التهابی، ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و سمیت‌زدایی است. یکی از ترکیب‌های فعال شیرین بیان، گلیسیریزین می‌باشد. این ترکیب دارای خواص فاماکولوژیک بسیار گسترده‌ای است که می‌توان به اثرات درمانی آن در اختلالات عصبی، ریوی، گوارشی، کبدی، صفراوی و ادراری اشاره کرد(۵-۳).

سیستم عصبی از دو نوع سلول اصلی تشکیل شده است؛ نرون‌ها و سلول‌های گلیا، تعداد گلیاها در مغز پستانداران ۱۰ برابر نرون‌ها است. در انسان سلول‌های گلیا تشکیل دهنده ۹۰ درصد سلول‌های مغز است. این سلول‌ها در عملکردهای میلن‌سازی، محافظت ساختمانی، تنظیم پتاسیم خارج سلولی انتقال عصبی و سایر عملکردهای دیگر نقش دارند (٦).

سلول‌های که B92 از دستگاه عصبی رت جدا می‌شود، سلول‌هایی با منشأ عصبی و گلیالی هستند که به واسطه اتیل نیتروزا توموری می‌شوند. این سلول‌ها دارای خاصیت چسبندگی هستند و در پژوهش‌ها بسیار مفید می‌باشد. مورفولوژی این سلول‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای زمانی که در محیط کشت فاقد سرم کشت داده می‌شوند، تغییر می‌کند و و از لحاظ موروفولوژی به سلول‌های میکروگلیا شباهت دارند(۸ و۷).

اتانول جزء مواد آسیب‌زا در مغز است، استفاده روز افزون از این ماده در کشورهای غربی به خصوص آمریکا و انگلستان میزان ضایعات عصبی را بالا برده است. این ماده به عنوان یک سرکوب کننده اولیه سیستم عصبی مرکزی است. علاوه بر آن باعث کاهش قدرت عضلات اسکلتی و احساس گرما و افزایش تعریق و غیره می‌شود(۱۱-۹).

اثرات کوتاه مدت اتانول به طور عمده ناشی از اختلال در چربی غشا عصبی یا اختلال در عملکرد کانال‌های یونی در غشا است. پژوهش‌های اخیر نشان داده که اثرات اتانول بر روی انتقال دهنده‌های عصبی و گیرنده‌ها می‌باشد. هم‌چنین به عنوان بلوک کننده‌های کانال‌های کلسیمی عمل می‌کند. سیستم انتقال سیگنالی یکی از اهداف اثرات مخرب اتانول در دراز مدت محسوب می‌شود. اتانول باعث گسیختگی ژن‌های هدف مشخص و تغییرات در پروتئین‌های

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019

سیگنالی می‌باشد(۱۳ و۱۲)، لذا هدف از این مطالعه بررسی آسیب‌های سلولی ایجاد شده به وسیله اتانول و اثرات حفاظتی اسید گلیسیریزیک بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی که در سال ۹۷اجرا شد، سلول‌های B92 از بانک سلولی پاستور ایران تهیه شدند. در این پژوهش سلول‌ها به دو گروه کنترل و گروه تیمار شده با گلیسیریزین تقسیم شدند. گروه کنترل با گلیسیریزین تیمار نشد و گروه تیمار شده با گلیسیریزین با دوزهای(۲۵ و ۱۰، ۵) میکرو مولار گلیسیریزین تیمار شدند.

سلول‌های حاصله به فلاسک کشت T25حاوی محیط کشت DMEM (BIOWEST) و ۱۰ درصدFBS (BIOWEST) منتقل شد. سلول‌ها به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه و در حضور ۵ درصد CO2 در گرم‌خانه گرماگذاری شدند، سپس سلول‌های غیر چسبنده حذف و کشت سلول‌های چسبنده ادامه یافت. تعویض محیط کشت هر روز یک‌بار انجام گرفت، پس از اولین تراکم بیش از ۷۰ درصد سلول‌های چسبنده با استفاده از تریپسین(BIOWEST) از کف فلاسک جداسازی و جهت پاساژ به فلاسک‌های بعدی منتقل شدند، پس از طی مراحل بالا و به دنبال شمارش سلول‌ها به شیوه تریپان بلو سوسپانسیون سلولی به تعداد ۱×۱۰^{۶} به چاهک پلیت ۹۶ خانه ته تخت اضافه شد، برای هر دو گروه کنترل و تیمار شده با گلیسیریزین،۱۰ تکرار در نظر گرفته شد که ۵ تکرار در حضور اتانول ۸۶ میلی‌مولار و ۵ تکرار بدون حضور اتانول در نظر گرفته شد. گروه کنترل بدون گلیسیریزین و سلول‌های گروه تیمار شده در مجاورت غلظت‌های(۲۵ و ۱۰، ۵) میکرومولار گلیسیریزین به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند، سپس مایع رویی غلظت‌هایی که باید در مجاورت اتانول قرار می‌گرفتند خالی و اتانول ۸۶ میلی‌مولار اضافه شد و به مدت ۸۰ دقیقه در گرم‌خانه قرار گرفت. بعد از انجام این کار مایع رویی همه چاهک‌ها تخلیه شد و محیط کشت تازه به اندازه حجم قبلی اضافه شد، آن گاه ۱۰۰ میکرولیتر نوترال رد(NR)(۳۳صدم درصد محلول نوترال رد به میزان ۱۰ درصد محیط کشت) به همه چاهک‌ها اضافه شد و دوباره به مدت ۲ ساعت در گرم‌خانه در دمای ۳۷ درجه و حضور ۵ درصد CO2 گرماگذای شد، سپس ۳ بار به وسیله PBS (BIOWEST) شستشو داده شد. پس از اضافه کردن ۱درصد حجم اولیه محلول لیز کننده(اسید استیک۱ درصد در اتانول ۵۰ درصد) شیک شد وآنگاه در طول موج ۴۹۲ به وسیله دستگاه الایزا ریدر قرائت شد(۱۴). برای سنجش میزان قدرت حیاتی سلول‌های B92، سوسپانسیونی حاوی ۱×۱۰^{۶} سلول B92 به چاهک اضافه شد و گروه کنترل بدون گلیسیریزین و گروه تیمار شده در مجاورت سه غلظت(۲۵ و ۱۰، ۵) میکرومولار قرار گرفتند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه و ۵ درصد انکوبه شدند. در مرحله بعد مایع رویی غلظت‌هایی که باید در مجاورت اتانول باشند تخلیه شد، آن گاه به مدت ۸۰ دقیقه در مجاورت

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019

اتانول قرار گرفت. بعد از این کار محیط کشت تازه به اندازه حجم قبلی اضافه شد، آنگاه ۱۰۰ میکرولیتر MTT(۸ هزارم درصد پودر MTT به میزان ۱۶ سی‌سی محیط کشت) به همه چاهک‌ها افزوده شد و به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه و ۵ درصد CO2 گرماگذاری و پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیترDMSO و شیک کردن آن در طول موج ۴۹۲، به وسیله الایزا ریدر قرائت شد(۱۵).

در رنگ‌آمیزی فلورسنت دوگانه باآکریدین اورنج وپروپیدیوم آیوداید جهت بررسی میزان آپوپتوز، فلاسک‌هایی که حاوی ۷۰ درصد سلول B92 بودند مورد انتخاب قرار گرفتند. گروه کنترل بدون گلیسیریزین و گروه تیمار شده با غلظت(۱۰) میکرومولار گلیسیریزین به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 انکوبه شدند. دو فلاسک به طور تصادفی از دو گروه کنترل و تیمار شده با غلظت ۱۰ میکرو مولار گلیسیریزین انتخاب شد و به مدت ۸۰ دقیقه با اتانول ۸۶ میلی‌مولار مجاور شدند. پس از رنگ‌آمیزی سلول‌های B92 با رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج(Acridine orange) و پروپیدیم آیوداید(Propidium iodide) به شیوه مرسوم میزان قدرت حیاتی سلول‌ها در حضور اتانول و بدون حضور اتانول با کمک میکروسکوپ فلورسانس و عدسی۴۰× و در۱۰ ناحیه مورد بررسی قرار گرفتند(۱۶).

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

بر اساس یافته‌های حاضر، تست نورال رد(NR) نشان داد زمانی که سلول‌های نروگلیال B92 به وسیله گلیسیریزیک اسید تیمار می‌شوند، بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد، یعنی اسید گلیسیریزیک وقتی به سلول‌های سالم و بدون اتانول اضافه شد، در عملکرد غشایی تغییری ایجاد نکرد و هیچ اثر سمی بر روی غشاء سلول‌ها نداشت، هم‌چنین اضافه کردن اتانول ۸۶ میلی‌مولار به تنهایی در غلظت‌ها موجب هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در عملکرد غشاء سلول‌ها نمی‌شود، اما تیمار کردن سلول‌ها با اسید گلیسیریزیک با غلظت ۵ میکرومولار و سپس مجاور کردن با اتانول ۸۶ میلی‌مولار موجب اثر منفی در عملکرد غشاء شد. البته رساندن غلظت به۱۰ میکرومولار باعث می‌شود تغییر معنی‌داری($p<0/05$) نسبت گروه بدون الکل و با الکل مشاهده کنیم(نمودار ۲ و ۱).

یافته‌های حاضر از آزمون برداشت نمک تترازولیوم(MTT) در زمانی که محیط فاقد اتانول است، نشان داد که اسید گلیسیریزیک در غلظت ۵ میکرومولار موجب کاهش عملکرد میتوکندری‌ها می‌شود، هم‌چنین باعث کاهش قدرت حیاتی و قدرت تکثیر سلول‌های B92 می‌شود، اما افزودن غلظت اسید گلیسیریزیک و رساندن آن به غلظت‌های ۱۰ و ۲۵

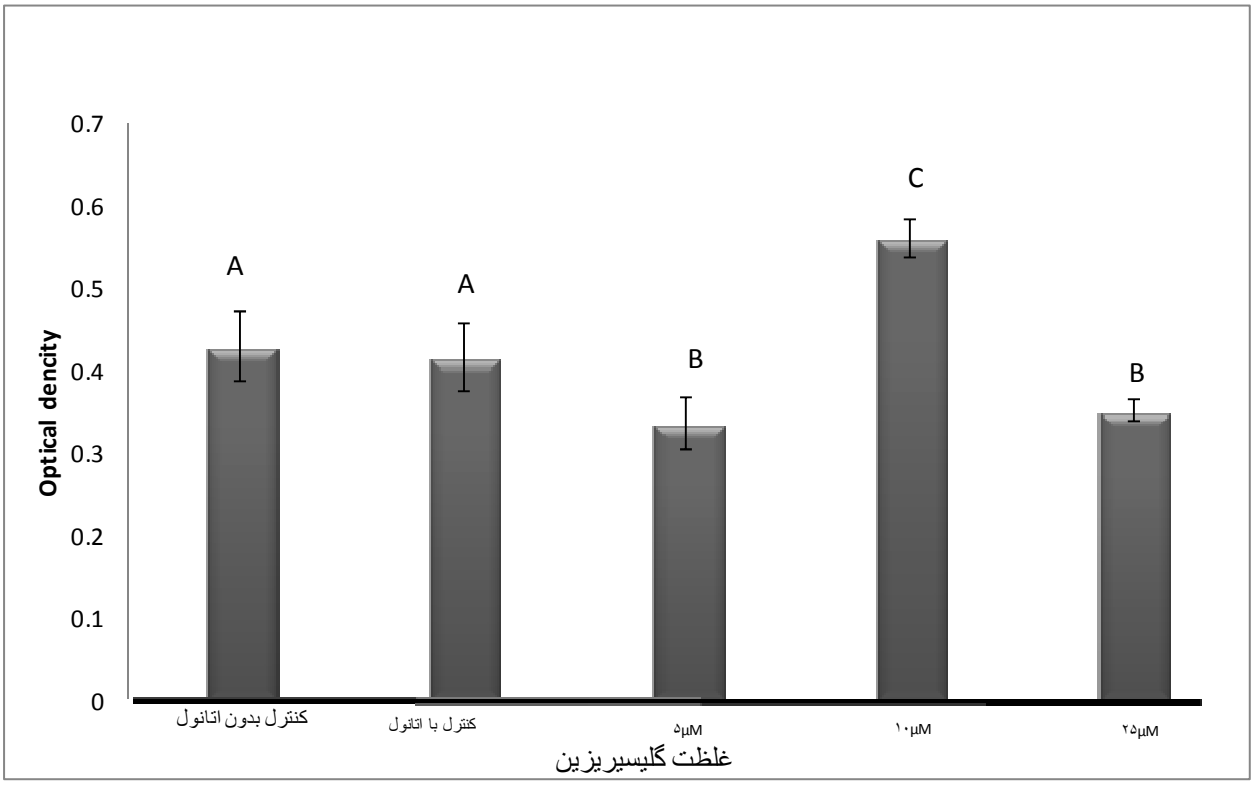
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019

میکرومولار موجب برعکس شدن این فرآیند شده و باعث حفاظت از میتوکندری‌ها و هم‌چنین موجب افزایش قدرت تکثیر شد و اختلاف معنی‌دار($p<0/05$) با گروه کنترل را نشان داد. به طوری که در غلظت ۲۵ میکرومولار اسید گلیسیریزیک بالاترین تکثیر را از خود نشان داد. در این تست افزودن اتانول به محیط کشت باعث کاهش قابل توجه قدرت تکثیر سلول‌ها و عملکرد میتوکندری‌ها شد، هم‌چنین رساندن اسید گلیسیریزیک به غلظت‌های ۱۰ و ۲۵ میکرومولار توانست با اثرات سمی‌اتانول مبارزه کند و میزان عملکرد میتوکندری‌ها را به مقدار قبلی برگرداند، ولی بین خود گروه ۱۰ و ۲۵ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد(نمودار ۴ و ۳).

هم‌چنین یافته‌های حاضر از رنگ آمیزی فلوروسنت دوگانه با آکریدین اورنج و پروپیدیوم آیوداید نشان داد که سلول‌های B92 که به تنهایی در مجاورت گلیسیریزین با غلظت ۱۰ میکرومولار قرار گرفته‌اند سالم می‌باشند، ولی سلول‌هایی که به تنهایی در مجاورت اتانول قرار گرفته بودند دچار آپوپتوز شدند و در نهایت سلول‌هایی که ابتدا با گلیسیریزین ۱۰ میکرومولار تیمار سپس با اتانول ۸۶ میلی‌مولار مجاور شده بودند، اثرات حفاظتی از خود نشان دادند و گلیسیریزین مانع از تخریب سلول‌های B92 به وسیله اتانول شد(شکل ۱).

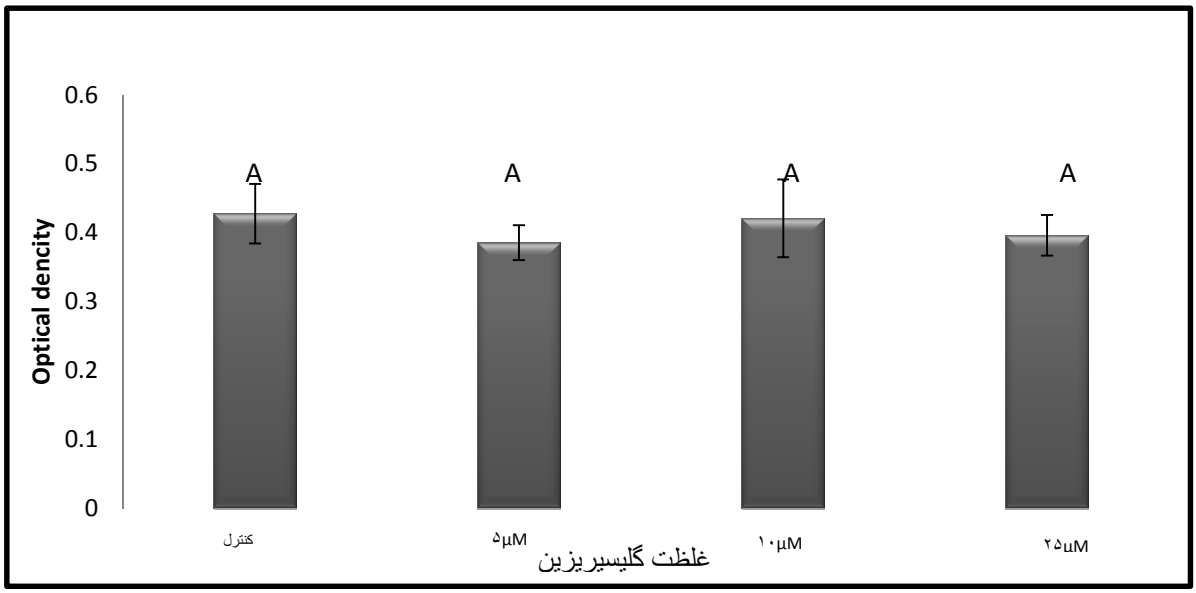


نمودار۱: نتایج حاصل از سنجش حیاتی سلول‌ها ی نروگلیال B92 تیمار شده با سه غلظت گلیسیریزین و سپس مجاور شده با اتانول(تست NR). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد

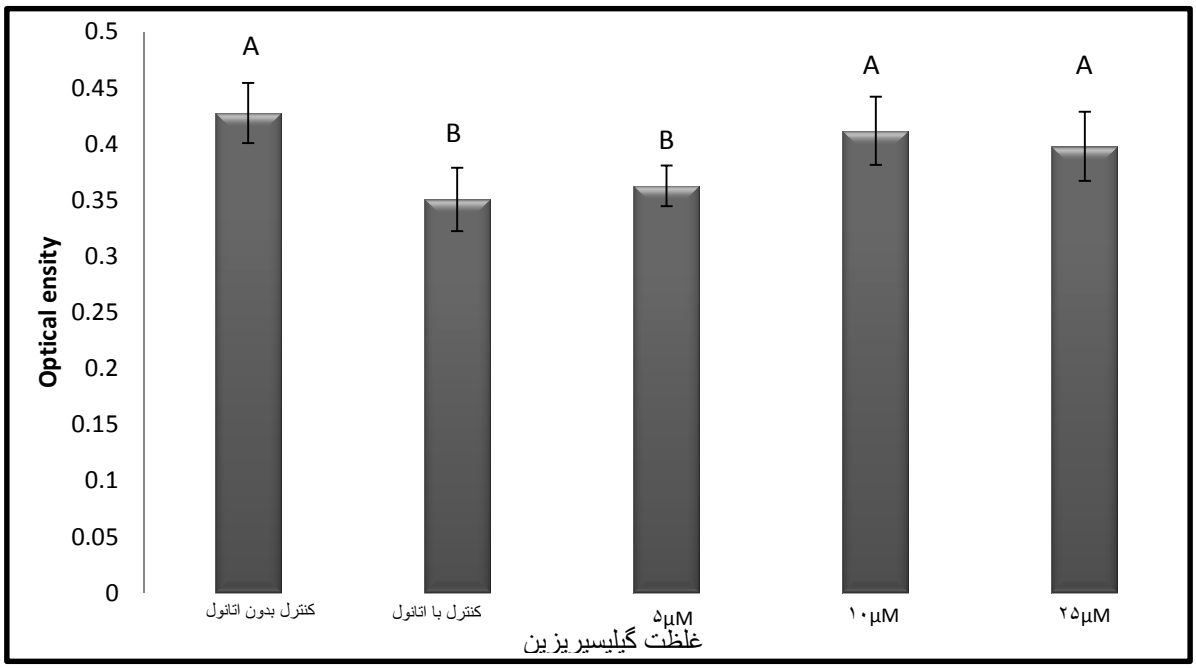
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019



نمودار۲: اثر گلیسیریزین بر روی سلول نروگلیال B92 بدون قرار دادن در مجاورت اتانول در سه غلظت گلیسیریزین و گروه کنترل (**تست NR**). حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است

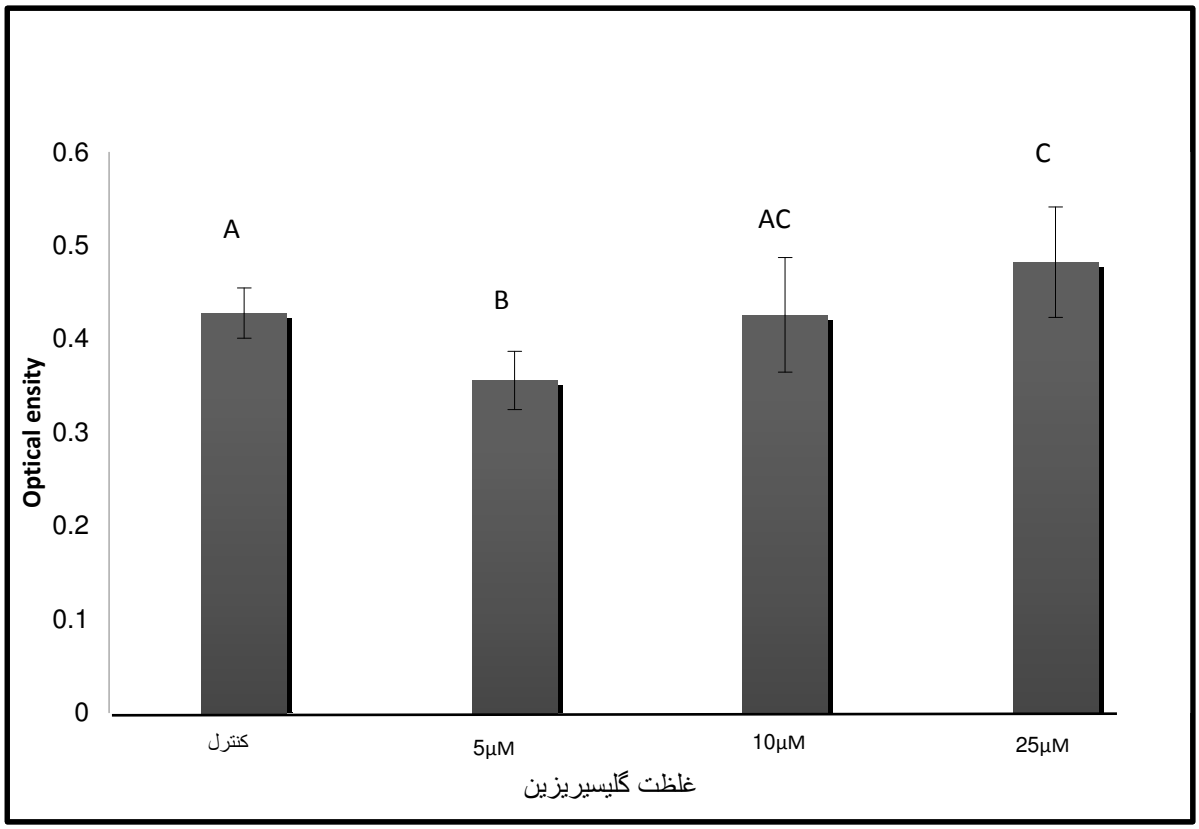


نمودار۳: نتایج سنجش حیاتی سلول‌ها ی نروگلیال B92 در سه غلظت گلیسیریزین و دو گروه کنترل با تست MTT. این تست در حضور اتانول انجام شد. حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد

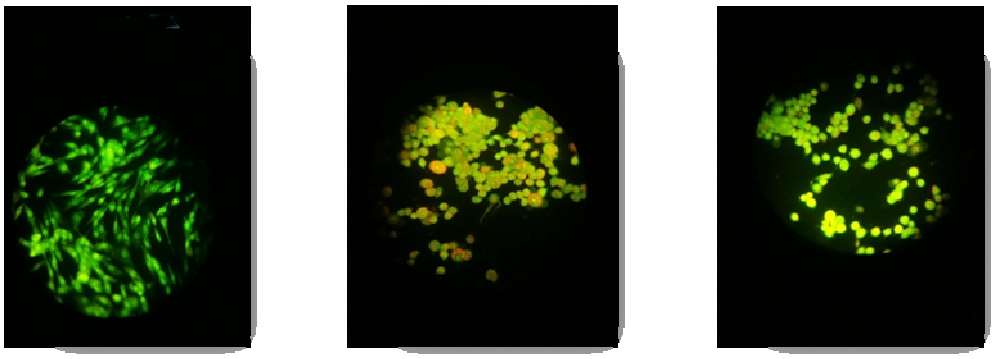
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019



نمودار۴: نتایج سنجش حیاتی سلول‌های تیمار شده با سه غلظت گلیسیریزین و گروه کنترل با تست MTT **بدون مجاورت با اتانول.**
حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار می‌باشد.



ج ب الف

شکل ۱: سلول های B92 رنگ‌آمیزی شده با آکریدین اورنج و پروپیدیوم آیوداید؛ الف) سلول‌های B92 تیمار شده با گلیسیریزین در غلظت ۱۰ میکرومولار، ب) سلول‌های بدون تیمار با گلیسیریزین و مجاور شده با اتانول و ج) سلول‌های تیمار شده با گلیسیریزین و سپس مجاور شده با اتانول ۸۶ میلی‌مولار به مدت ۸۰ دقیقه با میکروسکوپ فلوروسنت و بزرگنمایی ۴۰×

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019

بحث

با توجه به اهمیتی که سیستم عصبی دارد، مطالعه بر روی عواملی که در برابر آسیب ها ی این دستگاه اثرات حفاظتی داشته باشد، در اولویت کار محققان قرار دارد. استفاده روز افزون الکل به عنوان یک نوشیدنی در جوامع مختلف به تدریج آثار زیان‌آوری را مشخص کرده تا جایی که امروزه پژوهش‌های گسترده‌ای پیرامون اثرات منفی الکل صورت گرفته است. اتانول سبب مرگ تدریجی سلول‌های مغزی می‌شود و چون این سلول‌ها قدرت تقسیم ندارند موجب انحطاط مغزی می‌شوند(۱۱). از دیر باز به منظور بررسی اثر الکل از مدل‌های متعدد حیوانی و آزمایش‌های کشت بافت استفاده شده است. چنین رویکردهایی مکانیسم متعددی را شناسایی کرده است که بسیاری از آنها باعث مرگ سلولی و یا نکروز و آپوپتوز می‌شود. از میان این مکانیسم‌ها به افزایش استرس اکسیداتیو، آسیب به میتوکندری، اثر بر روی گلایسین و دخالت در فعالیت عوامل رشد می‌توان اشاره کرد(۱۳)، لذا هدف از این مطالعه بررسی آسیب‌های سلولی ایجاد شده به وسیله اتانول و اثرات حفاظتی اسید گلیسیریزیک بود.

در مطالعه وانگ نشان داد که اتانول باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در نورون‌های نابالغ می‌شود. تحقیق و بررسی بیشتر نشان داد که مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با استرس افزایش یافته است، پس اتانول باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در نورون‌های نابالغ می‌شود و بینش جدیدی را به اثرات مضر اتانول بر روی CNS در حال رشد ایجاد می‌کند(۱۷). در گزارشی دیگر که به وسیله کای و همکاران بر روی موش انجام شد، نشان داد که اتانول موجب تخریب نورون‌ها در دستگاه عصبی مرکزی شده و باعث افزایش استرس اکسیداتیو، بیان فاکتورهای التهابی و در نهایت مرگ نرون‌ها می‌شود(۱۳).

در پژوهش حاضر از تست‌های MTT و NR برای بررسی اثرات تخربی اتانول بر روی سلول‌های گلیال B92 استفاده شد. تست تریپان بلو یک تست زنده مانی(Viability) است. در این آزمون فقط زنده یا مرده بودن سلول به صورت مطلق تعیین می‌شود. در حالی که سلول ممکن است زنده باشد، ولی در عملکرد غشایی و یا عملکرد میتوکندری و تأمین انرژی و یا به عبارتی در قدرت حیاتی(Vitality) دچار نقصان شده باشد. به این منظور از تست‌های برداشت نوترال رد به منظور سنجش سلامت غشا و از تست برداشت MTT برای سنجش عملکرد میتوکندری استفاده شد. رنگ نوترال رد یک رنگ کاتیونی است که به وسیله سلول‌های زنده به شیوه آندوسیتوز برداشت می‌شود و در بخش لیزوزومی آنها ذخیره می‌گردد و یک تست سنجش قدرت حیاتی غشا می‌باشد. هر چه سلولی از نظر سلامت غشایی در وضعیت بهتری قرار گرفته باشد، قادر به برداشت رنگ خواهد بود(۱۸). آزمون برداشت نمک تترازولیوم(MTT) برای بررسی میزان سمیت مواد بر عمکرد میتوکندری سلول است. آسیب به روند تولید انرژی در سلول از متداول‌ترین روش‌های آسیب اتانول می‌باشد(۱۹). افزایش یا کاهش

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019

تعداد سلول‌ها در کنار سلامت میتوکندری سلول‌ها می‌تواند منجر به تغییرات هم‌زمان در مقدار احیای MTT به فورمازون به وسیله سلول‌های موجود در کشت شود، بنابراین کاهش شدت رنگ آزاد شده حاکی از اثراتانول بر میتوکندری سلولی می‌باشد. در صورتی که به دنبال تیمار با اتانول در یک غلظت خاص فقط تست برداشت نوترال رد مختل شده باشد، آسیب اتانول به طور اولیه مربوط به غشاء سلولی است، ولی اگر فقط تست احیای MTT در یک غلظت خاص مختل شده باشد، آسیب اتانول مربوط به آسیب اولیه میتوکندری است. یافته‌های حاضر در این پژوهش هم راستا با مطالب فوق بوده و اتانول در تست MTT باعث کاهش قدرت حیاتی و عملکردی میتوکندری‌ها شد، این در حالی است که در تست NR اتانول به غشا آسیب وارد نکرده، پس آسیب اتانول مربوط به آسیب اولیه میتوکندری‌ها است.

از جمله رهیافت‌های موجود جهت نیل به هدف کاهش آسیب‌زایی، استفاده از داروهای گیاهی جهت حصول به نتایج مناسب‌تر می‌باشد. اثر متعدد ضد التهابی در ارتباط با گیاه شیرین بیان در پژوهش‌های قبلی نشان داده شده است. این گیاه به طور گسترده در طب سنتی جهت درمان اختلالات داخلی کاربرد دارد. گیاه شیرین بیان دارای ترکیب‌های متعدد فعال از نظر بیولوژیکی می‌باشد، یکی از مهم‌ترین این ترکیب‌های گلیسیریزیک اسید است. گلیسیریزیک اسید به عنوان جزء اصلی گیاه دارای اثرات ضدالتهابی و ضد ویروسی وسایر اثرات می‌باشد(۵ و۴) . از مدت‌های مدید شیرین بیان به عنوان یک گیاه درمانی با اثرات آرام بخش استفاده شده است. این گیاه دارای خواص ضد التهابی، ضد باکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و خلط‌آور است و در سمیت‌زدایی و حفاظت کبدی مؤثر می‌باشد. یکی از مهم‌ترین ترکیب‌های فعال شیرین‌بیان، گلیسریزیک اسید می‌باشد و می‌تواند در طی اختلالات التهابی، عصبی و نورودژنراتیو تحریک شود و واسطه التهابی متعددی را آزاد کند(۵). مطالعه صورت گرفته به وسیله کای نشان داد که اثر حفاظتی گلیسیریزین درآسیب‌های ایسکمی و استرس اکسیداتیو مشهود می‌باشد و پیش درمانی با گلیسیریزین به طور قابل توجهی باعث کاهش آسیب مغزی می‌شود(۲۰). لوو طبق تحقیقی نشان داد که گلیسیریزین می‌تواند باعث کاهش مرگ سلول عصبی ناشی از اسید کریک در هیپوکمپ موش شود. این عملکرد همراه با سرکوب گلیوز و القا نشانگرهای ضد التهابی بوده است(۲۱). هم‌چنین تحقیق انجام شده به وسیله گونزالز نشان داده شد که اسید گلیسیریزیک باعث کاهش استرس اکسیداتیو و التهاب در هیپوکامپ و لوب‌های بویایی در موش‌های صرعی القا شده با لیتیوم- پیلوکارپین می‌شود(۲۲).

بنابراین در این تحقیق بر آن شدیم که ضمن مطالعه دقیق‌تر اثرات ضدالتهابی گیاه شیرین بیان، اثرات التهابی به وجود آمده به وسیله اتانول را پس از تیمار با گلیسیریزین مورد مطالعه قرار دهیم. یافته‌های حاضر از تستMTT نشان داد، زمانی که سلول‌های نروگلیال به وسیله اسید گلیسیریزیک تیمار شدند در

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019

بین غلظت ۱۰ و ۲۵ با غلظت ۵ میکرو مولار اختلاف معنی‌دار($p<0/05$) دیده شد. پس اسید گلیسیریزیک در غلظت ۵ میکرومولار به میتوکندری‌ها آسیب وارد کرده است و موجب کاهش عملکرد آنها و هم‌چنین باعث کاهش قدرت حیاتی و قدرت تکثیر سلول‌هایB92 شده است. در تیمار سلول‌ها با سه غلظت(۲۵ و ۱۰، ۵) میکرومولار اسید گلیسیریزیک و سپس مجاور کردن با اتانول ۸۶ میلی‌مولار به مدت ۸۰ دقیقه در تست MTT، اختلاف معنی‌داری($p<0/05$) در بین گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۲۵ و ۱۰ با گروه تیمار شده با غلظت ۵ وجود داشت. در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۲۵ و ۱۰ افزایش جذب نوری مشاهده شد که نشانگر نقش حفاظتی این دو غلظت در برابر اتانول بوده است، ولی غلظت ۵ میکرو مولار اثر حفاظتی از خود در مجاورت اتانول نشان نداد. نتایج مطالعه حاضر تست NR نیز نشان داد که در زمانی که سلول‌های نروگلیال B92 به وسیله گلیسیریزیک اسید تیمار می‌شوند، بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد، یعنی اسیدگلیسیریزیک وقتی به سلول‌های سالم و بدون اتانول اضافه شد در عملکرد غشایی تغییری ایجاد نکرد و هیچ اثر سمی بر روی سلول‌ها نداشت. هم‌چنین در این تست که سلول‌ها با سه غلظت گلیسیریزین (۲۵ و ۱۰، ۵ میکرومولار) تیمار شدند و سپس با اتانول ۸۶ میلی‌مولار به مدت ۸۰ دقیقه مجاور، اثر حفاظتی گلیسیریزین در غلظت ۱۰ مشاهده شد، ولی در غلظت ۵ از خود این اثر را نشان نداد. افزودن اتانول به محیط کشت باعث کاهش قابل توجه قدرت تکثیر سلول‌ها شد و افزودن اسید گلیسیریزیک توانست با اثرات سمی مقابله کند. بررسی این دو تست نشان داد که گلیسیریزین اثرات سمی بر سلول نداشته حتی در برخی غلظت‌ها هم باعث افزایش رشد و تکثیر شده است، ولی اتانول دارای قدرت تخریب اثر است اتانول قادر است به علت داشتن خواص چربی‌زدایی، به غشا که از جنس فسفو لیپیدی است آسیب بزند در غلظت‌های پایین اسید گلیسیریزیک که ۵ میکرو مولار است نتوانست اثر حفاظتی در مقابل اتانول اعمال کند، ولی با افزایش غلظت از ۵ به سمت ۱۰ و ۲۵ میکرو مولار اسید گلیسیریزیک توانست اثرات حفاظتی در مقابل اثر سمیت اتانول باشد و باعث حفظ عملکرد غشا و میتوکندری‌ها شود. در تست NR و MTT پژوهش حاضر به این نتیجه رسیدیم که مصرف اتانول باعث تخریب و کاهش سلول‌ها می‌شود در واقع نتایج گرفته شده هم راستا با نظرات سایر پژوهش‌ها می‌باشد.

رنگ‌آمیزی فلوروسنت دوگانه با آکریدین اورنج و پروپیدیوم آیوداید یکی از راهکارهای دقیق و آسان جهت تشخیص آسیب‌های وارده می‌باشد. یافته‌های حاضر در این پژوهش نشان داد که سلول‌ها B92 که به تنهایی در مجاورت گلیسیریزین با غلظت ۱۰ میکرومولار قرار گرفته‌اند سالم می‌باشند و هسته دوکی شکل و سبز رنگ دارند، ولی سلول‌هایی که به تنهایی در مجاورت اتانول قرار گرفته بودند، دچارمرگ سلولی بر اثر آسیب شدند و در نهایت سلول‌هایی که ابتدا با گلیسیریزین ۱۰ میکرومولار

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019

تیمار سپس با اتانول ۸۶ میلی‌مولار مجاور شده بودند اثرات حفاظتی از خود نشان دادند و گلیسیریزین مانع از تخریب سلول‌های B92 به وسیله اتانول شدند. این نتایج با پژوهش‌های فوق هم راستا می‌باشد.

پیشنهاد می‌شود فواید گیاه شیرین بیان و ماده موثره آن(گلیسیریزین) در سایر آسیب‌های سلولی بررسی شود.

از سایر غلظت‌های ماده گلیسیریزین در بررسی این آسیب استفاده شود، تحقیقات بالینی به منظور استفاده این گیاه و ماده مؤثری آن انجام شود.

نتیجه گیری

نتایج این طرح نشان داد که اتانول باعث تخریب سلول‌های عصبی از طریق آسیب به میتوکندری و غشا سلولی می‌شود، اما تیمار سلول‌ها با ماده گلیسیریزین در غلظت ۱۰ و۲۵ میکرومولار مانع از آسیب سلول‌ها به وسیله اتانول شد. در مجموع به نظر می‌رسد تیمار سلول‌های B92 با گلیسیریزین می‌تواند موجب تقویت و بهبود عملکرد سلول‌های آسیب دیده با اتانول شود. با توجه به استفاده وسیع از گیاه شیرین بیان در اکثر نقاط جهان به صورت طب سنتی و استفاده آزمایشی آن در سال‌های اخیر بر روی بسیاری از مشکلات از جمله مشکلات عصبی و موفقیت‌آمیز بودن آن در مقایسه با سایر روش‌های درمانی، این ضرورت وجود دارد که این گیاه و ماده مؤثری ارزشمند آن یعنی اسید گلیسیریزیگ را به عنوان یک عامل درمانی و محافظتی مهم به شمار آوریم و از آن در سایر آسیب‌ها به خصوص در آسیب‌های سلولی بیشتر مورد استفاده قرار دهیم.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی گرایش فیزیولوژی جانوری با کد اخلاق ۲/اد/۷۱۵ دانشگاه ارومیه می‌باشد، که با حمایت مالی این دانشگاه اجرا شد. نویسندگان این مقاله از اساتید و کارشناسان محترم آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده علوم و دامپزشکی کمال تشکر را دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019

REFERENCES

1.Kobari M, Fujita K, Katakura T, Ustunomiya T, Pollard RB, Suzuki F. Inhibitory effect of glycyrrhizin on experimental pulmonary metastas: In mice inoculated with B16 melanoma. Anti Cancer Res 2002; 2(2): 4053-8.
2.Shaheen S, Abbas S, Hussain J, Mabood F, Umair M, Ali M, Khan A. Knowledge of medicinal plants for children diseases in the environs of district bannu, khyber pakhtoonkhwa (KPK). Frontiers in Pharmacology 2017; 8(3): 430-45.
3.Haraguchi H. Antioxidative plant constituents. Taylor and Francis Inc 2001; 348- 52.
4.Ojha S, Javed H, Azimullah S, Abul Khair SB, Haque ME. Glycyrrhizic acid attenuates neuroinflammation and oxidative stress in rotenone model of parkinson's disease. Neurotox Res 2016; 29(2): 275-87.
5.Wang C, Duan X, Sun X, Liu Z, Sun P, Yang X, et al. Protective effects of glycyrrhizic acid from edible botanical glycyrrhiza glabra against non-alcoholic steatohepatitis in mice. Food Funct 2016; 7(9): 3716- 23.
6.Oppenheim W. Cell death during development of the nervous system. Annual Review of Neuroscience1991; 14(1): 501-453.
7.Kerr F, Gobé G, Winterford CM, Harmon BV. Anatomical methods in celldeath. In methods in cell bio
logy. Academic Press 1995; 27(46): 62-25.
8.Lu P, Jones LL, Tuszynski MH. BDNF-expressing marrow stromal cells supportextensive axonal growth at sites of spinal cord injury. Experimental Neurology 2005; 191(2): 344-60.
9.Milotová M, Riljak V, Jandová K, Bortelová J, Marešová D, Pokorný J, et al. Changes of hippocampal neurons after perinatalexposure to ethanol. Physiological Research 2008; 57(2): 54-32.
10.Alfonso-Loeches S, Ureña-Peralta JR, Morillo-Bargues MJ, Oliver-De La Cruz J, Guerri C. Role of mitochondria ROS generation in ethanol-induced NLRP3 inflammasome activationand cell death in astroglial cells. Front Cell Neurosci 2014; 8(3): 216-29.
11.Cotran R, Kumar V, Collins T. Robbins pathologic basis of disease. WB Saunders.Ca(2+) channel function in developing CA3 hippocampal pyramidal neurons. Brain Res 1999; 15(16): 904-9.
12.Morton RA, Valenzuela CF. Further characterization of the effect of ethanol on voltage-gated Ca(2+) channel function in developing CA3 hippocampal pyramidal neurons. Brain Res 2016; 15(16): 26-19.
13.Cai L, Bian M, Liu M, Sheng Z, Suo H, Wang Z, et al. Ethanol-inducedneurodegeneration in NRSF/REST neuronal conditional knockout mice. Neuroscience 2011; 18(1): 196-205.
14.Shushtari N, abtahi froushani s. caffeine augments the instruction of anti-inflammatory macrophages by the conditioned medium of mesenchymal stem cells. SM Cell 2017; 19(3): 415-24.
15.Abbasi A, Abtahi Froushani S. Nicotine and caffeine alter the effects of the LPS- primed mesenchymal stem cells on the co-cultured neutrophils. Adv Med Sci 2018; 21(6): 521-35.
16.Pourtayeb S, Abtahi Froushani SM. Nicotine can modulate the effects of the mesenchymal stem cells on neutrophils. Adv Med Sci 2017; 62(1): 165-70.
17.Wang X, Liu Y, Fan Z, Chen G, Xu M, Bower KA, et al. Ethanol induces endoplasmic reticulum stress in the developing brain. Alcohol Clin Exp Res 2011; 35(9): 1574-83.
18.Repetto G, Del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation ofcell viability/cytotoxicity. Nature Protocols2008; 3(7): 1125- 31.
19.Denizot F, Larg R. Rapid colorometric assay for cell growth and survival.modifications to the tetrazolium dey procedure giving improved sensitivity and reliability. Immunol Methods 1986; 89(2): 271-7.
20.Cai X, Wang X, Li J, Chen S. Protective effect of glycyrrhizin on myocardial ischemia/reperfusion injury-induced oxidative stress, inducible nitric oxide synthase and inflammatory reactions through high-mobility group box 1 and mitogen-activated protein kinase expression. Exp Ther Med 2017; 14(2): 1219-26.
21.Luo L, Jin Y, Kim ID, Lee JK . Glycyrrhizin attenuates kainic Acid-induced neuronal cell death in the mouse hippocampus. Exp Neurobiol 2013; 22(2): 107-15.
22.González-Reyes S, Santillán-Cigales JJ, Jiménez-Osorio AS, Pedraza-Chaverri J. Glycyrrhizin ameliorates oxidative stress and inflammation in hippocampus and olfactory bulb in lithium/pilocarpine-induced status epilepticus in rats. Epilepsy Res 2016; 12(6): 126-31.

www.SID.ir

Arc

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

The Protective Role of Glycyrrhizin on Ethanol- Damaged B92 Glial Cells in Vitro

Saleh Haggho L[1], khezri SH[1*], Abtahi Froushani SM[2]

[1]Departmant of Biology, Urmia University, Urmia, Iran. [2]Department of Microbiology, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 21 Nov 2018 Accepted: 14 May 2019

Abstract

Background & aim: Glycyrrhizin is one of the most important pharmacological compounds of the Licorice plant which has anti-inflammatory properties. Ethanol is one of the most damaging substances in the brain, Increasing use of this substance has increases the amount of nerve damage. Therefore the purpose of this study was to investigate the protective effects of glycyrrhizin on ethanol-damaged B92 glial cells.

Methods: The present experimental study was performed in 2018. B92 cells were obtained from the Pasteur institute cell bank of Iran, (1×10^6 cell/ml) were transferred to 96 plates and incubated with various glycyrrhizin concentration (5, 10 and 25 µM) for 24 hours. At that point, the cells were exposed to absolute ethanol for 80 minutes at concentrations of 86 mM. Finally, the viability of the cells was evaluated with neutral red (NR) uptake and MTT tests.

Results: Glycyrrhizin reduced the level of the cell membrane and mitochondrial damages induced by ethanol in a dose-dependent manner, so that 10 and 25 µM concentration of glycyrrhizin reduced the membrane damage and the mitochondrial performance damage, significantly. Nevertheless, Glycyrrhizin at concentration of 5 µM didn't show any protective role so that at this concentration the growth and proliferation of cells reduced.

Conclusion: The results of the present study indicated that licorice extract (glycyrrhizin) had a positive effect on survival rate of the cells and improves the vital capabilities of ethanol-damaged glial cells. Hence, glycyrrhizin dose dependently can protect the B92 cells against ethanol-induced damage.

Keywords: B92 Glial cell, Glycyrrhizin, Ethanol, In vitro, Cellular Damage

[*]**Corresponding Author: Khezri SH,** Departmant of Biology, Urmia University, Urmia, Iran .2 Department of Microbiology, Urmia University, Urmia, Iran
Email: sh.khezri@urmia.ac.ir

Please cite this article as follows:
Saleh Haggho L, khezri SH, Abtahi Froushani SM. The Protective Role of Glycyrrhizin on Ethanol- Damaged B92 Glial Cells in Vitro. Armaghane-danesh 2019; 24(3): 333-345

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 13:38 +0330 on Tuesday November 5th 2019

www.SID.ir