

بررسی میزان تاثیر سیلیبینین بر استرس اکسیداتیو در سلول‌های غلاف‌کننده بویایی نوزاد موش صحرایی

منیره عزیزی^{۱*}، ناصر عباسی^۲، سعیده رشیدی^۲

^۱دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

^۲دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

*نویسنده‌ی مسئول: گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران. ایمیل: azizi.moaz@gmail.com

دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۰۲ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۰۷

چکیده

مقدمه: امروزه سلول درمانی یکی از مهم‌ترین استراتژی‌های درمانی در سیستم عصبی است. در این میان پیوند سلول‌های غلاف‌کننده بویایی (olfactory ensheathing cells; OECs) به دلیل دسترسی آسان مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است. سیلیبینین ماده مؤثره گیاه *Silybum marianum* دارای خواص متنوعی از جمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی است.

اهداف: در این مطالعه، اثرات آنتی‌اکسیدانی سیلیبینین بر استرس اکسیداتیو در سلول‌های OEC بررسی شد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های OEC از مخاط بویایی نوزاد موش صحرایی استخراج و کشت داده شد. ماهیت سلول‌ها از طریق ایمونوسیتوشیمی با استفاده از مارکرهای P75^{NTR} و S-100 تایید شد. غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ میکرومول سیلیبینین تهیه و به سلول‌های کشت شده اضافه شد. دوزهای محافظتی و سمی سیلیبینین توسط تست (Dimethyl) MTT شناسایی گردید. غلظت‌های محافظتی (۱ و ۵ میکرومول) و سمی (۵۰ و ۷۵ میکرومول) به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد و میزان تولید نیتریک اکسید (nitric oxide; NO) و گونه‌های فعال اکسیژن (reactive oxygen species; ROS) به ترتیب با استفاده از روش‌های گریس و فلوریمتری ارزیابی گردید.

نتایج: ایمونوسیتوشیمی ماهیت OEC بودن سلول‌های کشت‌شده را تایید نمود. نتایج MTT حفظ بقای سلول‌ها را به دنبال استفاده از دوزهای پایین سیلیبینین نشان داد. غلظت‌های محافظتی سیلیبینین مانع از افزایش تولید NO، ROS در سلول‌های OEC شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه حفظ بقا و خاصیت آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های پایین سیلیبینین را در سلول‌های OEC تایید نمود.

کلمات کلیدی: سیلیبینین، *Silybum marianum*، سلول‌های غلاف‌کننده بویایی، بقای سلولی، استرس اکسیداتیو

۱. مقدمه

طریق آن‌ها باعث محافظت نورونی و بازسازی مجدد آکسون‌ها می‌گردند به‌طور کامل مشخص نشده است، اما تعدیل فعالیت مجدد آستروسیت‌ها، کاهش بیان پروتئوگلیکان‌ها، افزایش آنژیوژنز، بازسازی آکسون‌ها، میلین‌سازی مجدد و افزایش سطح فاکتورهای نوروتروفیک به دنبال پیوند آن‌ها گزارش شده است (۲-۴).

گونه‌های فعال نیتروژن (RNS) reactive nitrogen spices و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) reactive oxygen spices در مجموع به عنوان گونه‌های فعال نیتروژن و اکسیژن reactive nitrogen and oxygen spices (RNOS) مشهورند در اصل محصولات متابولیسم نرمال سلولی هستند (۵، ۶). گونه‌های فعال

بیماری‌های نورودژنراتیو باعث آسیب‌های اجتماعی و اقتصادی بی‌شماری در جامعه می‌گردند و سالانه هزینه‌ای بیش از ۱۵۰ میلیون دلار بر اقتصاد تحمیل می‌کنند (۱).

پیوند سلول‌های غلاف‌کننده بویایی (olfactory ensheathing cells (OECs)) یک درمان تجربی امیدوارکننده را در مداوای بیماری‌های نورودژنراتیو فراهم کرده است. این سلول‌های بنیادی پرطرفیت، برخلاف سلول‌های الیگودندروسیت و شوان که به ترتیب فقط در سیستم اعصاب مرکزی (CNS) central nervous system و محیطی (PNS) peripheral nervous system وجود دارند در تمام طول بخش‌های محیطی و مرکزی عصب بویایی مشاهده می‌شوند (۲). اگرچه که مکانیزم‌هایی که این سلول‌ها از

عمده‌ترین (۸۰-۷۰ درصد) و فعال‌ترین ترکیب سیلیمارین است (۱۴) که از دو ایزومر A و B به نسبت ۱:۱ تشکیل شده است (۱۵). سیلیبینین دارای اثرات فارماکولوژیکی متعددی از قبیل اثرات ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌باکتریال، آنتی‌تومورال، آدیپوژنز، هپاتوپروتکتیو و اثرات حفاظتی بر سیستم عصبی مرکزی است (۱۶، ۱۷). هم‌چنین فعالیت آنتی‌لیپوپراکسیداتیو با فعالیت‌های ضدآلرژیک و آنتی‌اکسیدانی از طریق تخلیه انواع رادیکال‌های آزاد برای آن ذکر شده است (۱۸). براساس مطالعات گذشته، سیلیبینین احتمالاً از طریق تنظیم فاکتورهای استرس اکسیداتیو، مهار فعالیت استیل کولین استراز و تجمع A β (۱۹) یا از طریق افزایش سطح BDNF و NGF و کاهش میزان NO/ROS از مرگ نورون‌ها پیشگیری نموده و در بهبود یادگیری و حافظه در مدل حیوانی آلزایمر مؤثر است (۲۰).

سیلیبینین با پاکسازی رادیکال‌های آزاد تولیدشده در طی متابولیسم از آسیب اکسیداتیو جلوگیری می‌کند (۲۱). هم‌چنین با مهار فعال‌سازی NF- κ B و جلوگیری از تولید ROS مانع از پیری ناشی از D-گالاکتوز در موش می‌شود (۲۲).

۲. اهداف

با توجه به مطالب فوق‌الذکر در پژوهش حاضر، اثر غلظت‌های مختلف سیلیبینین بر میزان بقا، تولید NO و ROS در سلول‌های OEC استخراج شده از مخاط بویایی نوزاد موش صحرایی بررسی گردید تا در صورت مشاهده تأثیرات آنتی‌اکسیداتیو سیلیبینین در سلول‌های OEC در مطالعات بعدی به‌صورت توأم با سلول‌های OEC در مطالعه بیماری‌های نورودژنراتیو استفاده گردد.

۳. مواد و روش‌ها

۳.۱. کشت سلول‌های غلاف‌کننده بویایی

در این مطالعه برای کشت سلول‌هایی با قدرت تکثیر بالا از مخاط بویایی نوزاد هشت‌روزه موش صحرایی استفاده گردید، زیرا با افزایش سن حیوان با وجود ثابت ماندن تعداد سلول‌ها، پتانسیل تکثیر آن‌ها به‌میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد. کشت سلول براساس مطالعات قبل انجام شد (۲۳) که در اینجا به‌طور خلاصه به آن اشاره می‌شود. حیوانات توسط مخلوط کتامین/ایلزین (۱۰/۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. فک فوقانی جهت ورود به حفره بینی برداشته شد. سپتوم بینی جدا شد. چندین بار با محلول تازه بافر نمکی (phosphate buffer saline (PBS) و بدون آنتی‌بیوتیک ۱ درصد شستشو داده شد. مخاط بویایی یک سوم خلفی سپتوم جدا و به قطعات کوچک تبدیل شد. هضم آنزیمی با تریپسین ۰/۲۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور

از طریق واکنش با مولکول‌های حیاتی از قبیل اسیدنوکلیک، پروتئین‌ها، لیپیدهای غشایی و با تغییرات برگشت‌ناپذیر عملکرد آن‌ها می‌توانند منجر به مرگ سلول گردند (۶).

گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، بیان‌کننده رادیکال‌های آزاد مشتق از اکسیژن مانند آنیون سوپراکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل و گونه‌های غیررادیکالی مشتق از اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن است که به‌طور مداوم در ارگانیسم‌ها تولید می‌شوند (۵).

گونه‌های فعال نیتروژن (RNS) مانند نیتریک اکسید nitric oxide (NO) نیز به‌عنوان رادیکال‌های مهم شناخته می‌شوند. Nitric oxide گازی با نیمه عمر کوتاه (چند ثانیه) است که در بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیک نرمال بدن نقش دارد و توسط آنزیم نیتریک اکسیداستناز nitric oxide synthases (NOS) طی تبدیل اسید آمینه ال-آرژنین به ال-سیترولین سنتز می‌شود (۶، ۷). تأثیر NO بر پروسه‌های سلولی بسیار وابسته به دوز است، به‌طور مثال سطوح فیزیولوژیک NO در سیستم عصبی مرکزی به‌عنوان نورومدولاتور یا نوروترانسمیتر عمل می‌کند (۸)، اما در شرایط استرس، میزان آزادسازی آن به بالاتر از حد نرمال می‌رسد (۹). Nitric oxide اگر چه به‌عنوان یک ماده نوروپروتکتیو در نظر گرفته می‌شود اما سطوح بالاتر از حد نرمال آن نوروتوکسیک است (۱۰). افزایش میزان NO در بسیاری از شرایط پاتولوژیک مانند بیماری‌های نورودژنراتیو، التهابی و ایسکمی، هم‌زمان با استرس اکسیداتیو/نیتروژاتیو اتفاق می‌افتد (۶). خواص سیتوتوکسیک NO عمدتاً ناشی از واکنش با سوپراکسید و تولید ماده اکسیدان قوی به‌نام پروکسیل نیتريت (peroxyl nitrite) است (۱۱).

آنتی‌اکسیدان‌های سلولی در سم‌زدایی گونه‌های فعال نیتروژن و اکسیژن نقش دارند، اما هنگامی که تعادل میان میزان اکسیدان/آنتی‌اکسیدان از بین رود، شرایط استرس اکسیداتیو ایجاد می‌گردد. با ادامه استرس اکسیداتیو، بیومولکول‌های حیاتی مانند ژنوم، دچار آسیب‌های اکسیداتیو می‌شوند که دارای اثرات بیولوژیکی مخربی از قبیل تغییر در انتقال پیام و بیان ژن، جهش و مرگ سلولی است (۱۲). نتایج کشت سلول‌ها و بافت مغز بیماران مبتلا به بیماری‌های نورودژنراتیو از قبیل آلزایمر و پارکینسون، استرس اکسیداتیو را به‌عنوان یک عامل اساسی در تغییر مسیرهای سیگنالی سلول‌های عصبی نشان داده است (۱۳). گیاه دارویی *Silybum marianum*، گیاهی دوساله، بدون کرک با گل‌های صورتی ارغوانی است که در اغلب مناطق معتدل و گرمسیر نیمکره شمالی می‌روید. عصاره دانه خشک گیاه دارای ۱ الی ۴ درصد سیلیمارین بوده که شامل فلاونویدهایی مانند سیلیبینین A و B، سیلی دیانین، سیلی کریستین و دی‌هیدروسیلیبینین است. سیلیبینین

حاصل از پاساژ دوم، به هر یک از چاهک‌های پلیت ۱۲ خانه‌ای اضافه گردید. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد، محیط رویی دور ریخته شد و غلظت‌های (۱، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ میکرومول) سیلیبینین با محیط DMEM تهیه و به چاهک‌های مورد نظر برای هر غلظت، اضافه گردید. چاهک‌های حاوی DMEM فاقد سیلیبینین به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. ۴۸ ساعت بعد، محیط کشت چاهک‌ها تخلیه شد. ۵۰۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر از DMEM جایگزین شد و ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از چهار ساعت، محتوای چاهک‌ها تخلیه و به هر چاهک ۱ میلی‌لیتر از dimethyl sulfoxide (DMSO) اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شد. نمونه‌های داخل چاهک‌ها به پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای منتقل شد و جذب نوری نمونه‌ها توسط دستگاه الیزایدر (ELX, Biotek, USA) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. براساس نتایج این تست، غلظت‌های ۱۰ میکرومول و کمتر دارای اثرات محافظتی و غلظت‌ها ۲۵ میکرومول و بالاتر دارای اثرات سمی بودند، لذا دو غلظت از هر یک از غلظت‌های محافظتی (۱ و ۵ میکرومول) و سمی (۵۰ و ۷۵ میکرومول) جهت ارزیابی میزان تولید ROS و NO در سلول‌ها انتخاب گردید.

۴.۳ بررسی تاثیر سیلیبینین بر میزان تولید Reactive Oxygen Species

جهت بررسی اثرات غلظت‌های محافظتی (۱ و ۵ میکرومول) و سمی (۵۰ و ۷۵ میکرومول) سیلیبینین بر میزان تولید ROS در سلول‌ها از روش فلوریمتری استفاده گردید (۲۰). ابتدا به هر یک از چاهک‌های پلیت ۶ خانه‌ای 4×10^4 سلول اضافه گردید. برای چسبیدن سلول‌ها ۷۲ - ۴۸ ساعت زمان در نظر گرفته شد. سپس محیط کشت چاهک‌های پلیت‌ها تخلیه شد و با غلظت‌های مختلف سیلیبینین در محیط DMEM تیمار شد. چاهک‌های حاوی DMEM به تنهایی به‌عنوان گروه کنترل منفی در نظر گرفته شد. پس از ۴۸ ساعت، محیط کشت چاهک‌ها تخلیه شد. ۱ میلی‌لیتر از دی‌کلروفلورسئین (DCF) ۱۰ نانومولار اضافه شد و ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس نمونه‌ها جهت سنجش با دستگاه فلوریمتر (FLX800, Biotek, USA) به پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل گردید و خوانش نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر انجام شد.

۵.۳ بررسی تاثیر سیلیبینین بر میزان تولید Nitric Oxide

جهت بررسی اثرات غلظت‌های محافظتی (۱ و ۵ میکرومول) و سمی (۵۰ و ۷۵ میکرومول) سیلیبینین بر میزان تولید NO در

انجام شد. فعالیت آنزیم با اضافه کردن سرم جنین گاوی fetal bovine serum (FBS) متوقف و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شد. سلول‌های به‌دست‌آمده در ۴ میلی‌لیتر از محیط کشت (DMEM) dulbecco's modified eagle medium حاوی FBS ۵ درصد و آنتی‌بیوتیک (۱ pen/strep درصد) و فاکتور میتوژن فورسکولین ۵ میکرومول سوسپانسیون گردید و پس از انتقال به فلاسک در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد نگهداری شد.

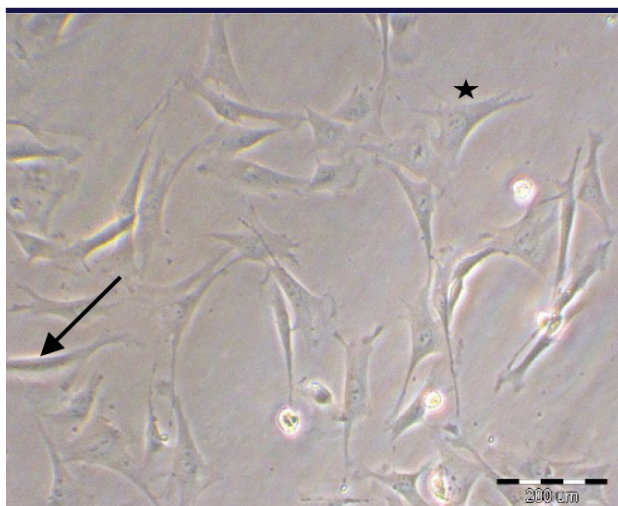
۲.۳ ایمونوسیتوشیمی (Immunocytochemistry)

به‌منظور تایید ماهیت سلول‌های کشت‌شده، از روش ایمونوسیتوشیمی برای مارکرهای P75^{NTR} و S-100 و همچنین رنگ‌آمیزی افتراقی هسته با استفاده از 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) استفاده شد (۲۳). جهت انجام این روش از آنتی‌بادی‌های اولیه Anti-p75 (Rabbit, sigma, 1:200) و Anti-S100 (Mouse, Abcam, 1:200) و آنتی‌بادی‌های ثانویه Alexa flour 568 goat anti rabbit و Alexa flour 488 goat anti mouse (هر دو از شرکت sigma و با غلظت ۱:۱۰۰۰) استفاده گردید. بدین منظور 5×10^4 سلول روی لامل با پوشش پلی‌ال-لیزین به مدت ۷۲ ساعت کشت شد. پس از ۷۲ ساعت، فیکس اولیه (۲ دقیقه) و سپس فیکس ثانویه (۱۰ دقیقه) با پارافمالدئید ۴ درصد در دمای اتاق انجام شد. جهت نفوذپذیر نمودن سلول‌ها به آنتی‌بادی اولیه، انکوباسیون سلول‌ها با تربیتون-X100 به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. جهت کاهش اتصالات غیراختصاصی، سلول‌ها به مدت ۱ ساعت با سرم بز (Goat serum) ۱۰ درصد انکوبه شدند. سپس، با آنتی‌بادی‌های اولیه (۲۴ ساعت در دمای ۲۰-۸ درجه سانتی‌گراد) و آنتی‌بادی‌های ثانویه (۱ ساعت در دمای اتاق) انکوبه شدند. رنگ‌آمیزی افتراقی هسته سلول‌ها با DAPI به میزان ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۵ دقیقه انجام شد. سه‌بار شست‌وشوی نمونه‌ها با محلول فسفات‌بافر (pH = ۷/۴ و ۰/۱ M) و سپس یک‌بار با آب دیونیزه (هر یک به مدت ۱۰ دقیقه) انجام شد. ماونت نمونه‌ها، با استفاده از بافر گلیسرول انجام شد و توسط میکروسکوپ فلورسنت (Olympus AX70, Japan) بررسی انجام شد. لازم به ذکر است که بعد از مواجهه سلول‌ها با تربیتون-X-100، در فواصل هر یک از مراحل، سه‌بار شست‌وشو با محلول فسفات‌بافر به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. همچنین کلیه مراحل مربوط به اضافه کردن آنتی‌بادی‌های ثانویه و بعد از آن در تاریکی انجام شد (۲۳).

۳.۳ بررسی اثر سیلیبینین بر توان حیاتی

جهت تعیین توان حیاتی (viability) و سمیت (toxicity) غلظت‌های مختلف سیلیبینین در سلول‌های OEC از تست MTT استفاده شد (۲۰). بدین منظور تعداد 4×10^4 سلول

همانطور که در تصویر ۱ مشاهده می‌شود، سلول‌های OEC استخراج شده از مخاط بویایی، پس از ۷۲-۴۸ ساعت از کشت و چسبیدن به کف فلاسک، دو فنوتیپ شبه شوان (دوکی شکل) و شبه آستروسیت (ظاهر پهن و زوائد متعدد) را نشان دادند (تصویر ۱).



تصویر ۱. تصویر سلول‌های olfactory ensheathing cells (OEC) کشت شده توسط میکروسکوپ فاز کنتراست. در تصویر دو فنوتیپ متفاوت: شبه آستروسیت با ظاهر پهن و زوائد متعدد (علامت ستاره) و شبه شوان دوکی شکل (علامت فلش) مشاهده می‌شود.

۲.۴. ایمونوسیتوشیمی

در رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت انجام شده برای مارکرهای S-100, P75^{NTR} به‌طور همزمان، سلول‌هایی که به‌صورت توأم برای هر دو مارکر P75^{NTR} و S-100 مثبت (P75^{NTR}+/S-100+) بودند به‌عنوان OEC در نظر گرفته شدند. در این رنگ آمیزی، سلول‌های P75^{NTR} به رنگ قرمز و سلول‌های S-100⁺ به رنگ سبز مشاهده شدند. براساس نتایج، میزان خلوص سلول‌های کشت شده در این مطالعه حدود ۷/۰ ± ۸۹ درصد بود (تصویر ۲).

سلول‌ها از متد گریس استفاده گردید (۲۰)، ابتدا ۴×۱۰^۴ سلول در هر یک از چاهک‌های پلیت ۶ خانه‌ای اضافه شد و به مدت ۴۸-۷۲ ساعت در انکوباتور نگهداری گردید. پس از چسبیدن سلول‌ها، به هر یک از پلیت‌ها پس از تخلیه محیط کشت شان، یکی از غلظت‌های آماده شده با DMEM اضافه شد و چاهک‌های حاوی DMEM به تنهایی به‌عنوان گروه کنترل منفی در نظر گرفته شد. پس از ۴۸ ساعت از کیت گریس جهت خوانش نمونه‌ها استفاده شد. بدین منظور در ابتدا ۵۰ میکرولیتر از هر یک از نمونه‌ها به چاهک‌های ۹۶ خانه‌ای منتقل شد، سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول‌های سولفانیل آمید و n-(1-naphthyl) ethylenediamine (NED) به چاهک‌ها اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط، با دستگاه پلیت خوان ELISA و اعمال منحنی استاندارد (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۳، ۱/۵۶ میکرومول برای نیتترات سدیم) میزان کل NO در هر نمونه اندازه‌گیری شد.

۶.۳. آنالیز آماری

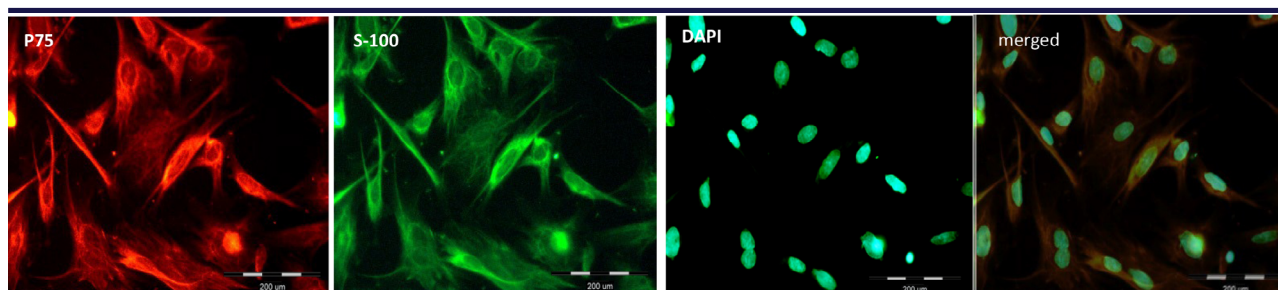
آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰۲۰ انجام گردید. تفاوت معنی دار بین گروه‌ها زمانی عنوان گردید که $P < 0.05$ بود. مقایسه بین گروه‌ها و گروه‌های کنترل با روش one-way ANOVA با سطح معنی دار $P < 0.05$ انجام شد. تمام آزمایشات سه بار تکرار گردید و نتایج به‌صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ گزارش شد.

۷.۳. ملاحظات اخلاقی

این مطالعه براساس اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ایلام و با کد اخلاق (IR.MEDILAM.REC.1395.67) انجام شد.

۴. نتایج

۱.۴. کشت سلول

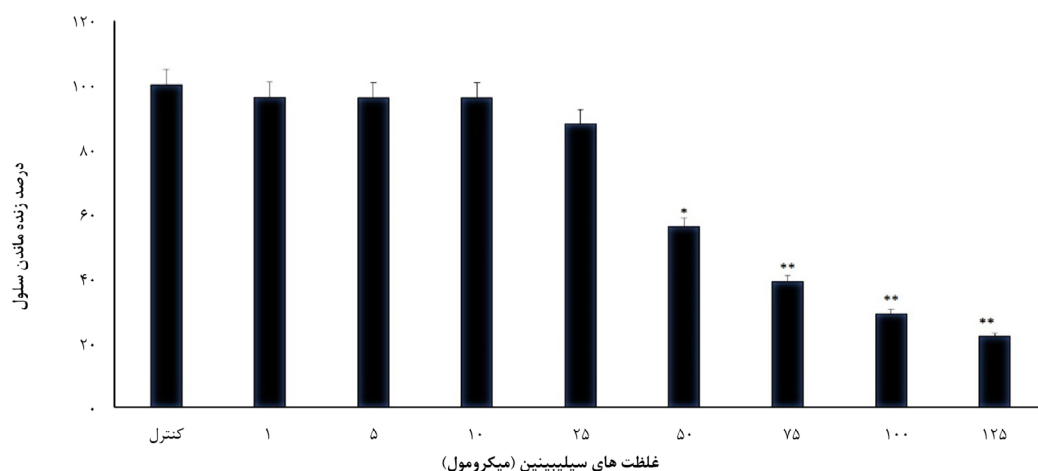


تصویر ۲. رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت سلول‌های olfactory ensheathing cells (OEC) به‌طور همزمان برای دو مارکر P75^{NTR} و S-100 و رنگ آمیزی افتراقی هسته با DAPI سلول‌های P75^{NTR} مثبت (P75^{NTR}+) به رنگ قرمز و سلول‌های S-100 مثبت (S100⁺) به رنگ سبز هستند.

۳.۴. تاثیر سیلیبینین بر توان حیاتی

نتایج تست MTT، نشان داد که با افزایش غلظت سیلیبینین، بقای سلول‌های OEC به صورت وابسته به دوز و به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد ($P = 0/0009$ و $P = 0/048$). همانطور که در **تصویر ۳** مشاهده می‌شود، تفاوت معنی‌داری میان میزان بقا سلول‌های OEC تیمار شده با غلظت‌های کم

(۱، ۵ و ۱۰ میکرومول) و سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های بالای (۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ میکرومول) سیلیبینین مشاهده می‌شود، بنابراین غلظت‌های ۱۰ میکرومول و کمتر از آن به عنوان غلظت‌های محافظتی و غلظت‌های ۲۵ میکرومول و بالاتر به عنوان غلظت‌های سمی سیلیبینین در نظر گرفته شدند (**تصویر ۳**).



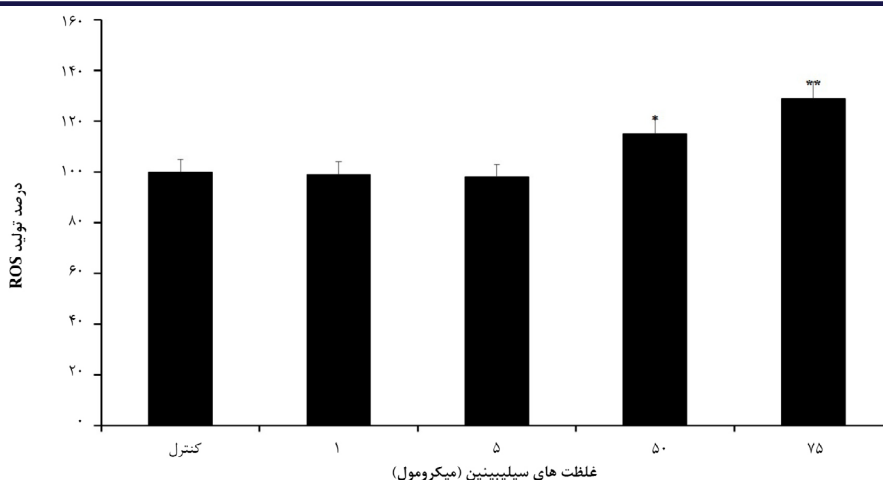
تصویر ۳. تعیین میزان سمیت غلظت‌های مختلف سیلیبینین (۱، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ میکرومول) بر بقای سلول‌های OEC؛ * اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($P = 0/048$), ** اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($P = 0/0009$).

لذا جهت اندازه‌گیری میزان ROS و NO در سلول‌ها، دو غلظت از غلظت‌های کم (۱ و ۵ میکرومول) به عنوان غلظت‌های محافظتی و دو غلظت از غلظت‌های بالا (۵۰ و ۷۵ میکرومول) به عنوان غلظت‌های سمی انتخاب شدند.

۴.۴. تاثیر سیلیبینین بر میزان تولید Reactive Oxygen Species

همانطور که **تصویر ۴** نشان می‌دهد طی آنکوباسیون

سلول‌های OEC با غلظت‌های محافظتی (۱ و ۵ میکرومول) نسبت به غلظت‌های سمی (۵۰ و ۷۵ میکرومول) سیلیبینین، میزان ROS کمتری در سلول‌ها طی ۴۸ ساعت پس از کشت تولید شده است. به عبارت دیگر غلظت‌های محافظتی سیلیبینین مانع از افزایش تولید و غلظت‌های سمی به صورت وابسته به دوز سبب افزایش معنی‌دار تولید ROS در سلول‌های OEC می‌گردند ($P = 0/0008$ و $P = 0/033$) (**تصویر ۴**).

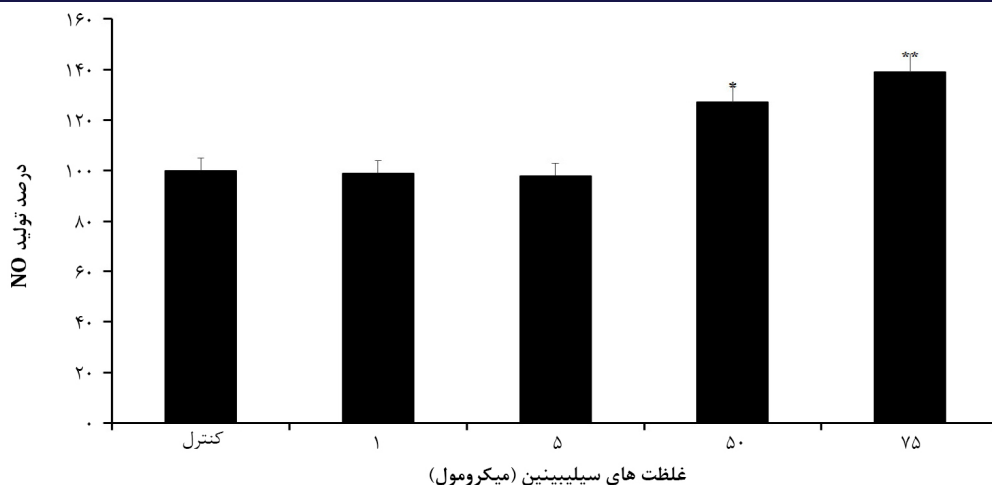


تصویر ۴. تاثیر غلظت‌های محافظتی (۱ و ۵ میکرومول) و سمی (۵۰ و ۷۵ میکرومول) سیلیبینین بر میزان تولید ROS در سلول‌های OEC طی ۴۸ ساعت پس از کشت؛ * اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($P = 0/033$), ** اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($P = 0/0008$).

۵.۴. تاثیر سیلیبینین بر میزان تولید Nitric Oxide

میزان تولید NO در سلول‌ها طی ۴۸ ساعت پس از کشت کمتر است. به عبارت دیگر غلظت‌های محافظتی سیلیبینین مانع از افزایش تولید NO و غلظت‌های سمی به صورت وابسته به دوز سبب افزایش معنی‌دار تولید NO در سلول‌های OEC می‌گردند ($P = 0.025$ و $P = 0.006$) (تصویر ۵).

همانطور که تصویر ۵ نشان می‌دهد در موارد انکوباسیون سلول‌های OEC با غلظت‌های محافظتی (۱ و ۵ میکرومول) سیلیبینین نسبت به غلظت‌های سمی (۵۰ و ۷۵ میکرومول)،



تصویر ۵. تاثیر غلظت‌های محافظتی (۱ و ۵ میکرومول) و سمی (۵۰ و ۷۵ میکرومول) سیلیبینین بر میزان تولید NO در سلول‌های OEC طی ۴۸ ساعت پس از کشت؛ * اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($P = 0.025$)، ** اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($P = 0.006$).

۵. بحث

در مقابل درون تنی (in vivo)، نوع سلول‌های مورد مطالعه (سلول‌های OEC در مقابل سلول‌های هیپوکامپ) و سن حیوانات استفاده شده باشد.

نتایج تست فلوریمتری مطالعه ما نشان داد که غلظت‌های محافظتی سیلیبینین (۱ و ۵ میکرومول) مانع از افزایش تولید ROS در سلول‌های OEC کشت شده می‌شود و با افزایش غلظت سیلیبینین، میزان تولید این فاکتور در سلول‌ها افزایش می‌یابد. در حالیکه مطالعه علی حسینی و همکارانش کاهش وابسته به دوز میزان تولید ROS را در موش‌های صحرایی آلزایمیری دریافت‌کننده سیلیبینین (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) گزارش کردند (۲۰). همانطور که پیش‌تر اشاره شد احتمالاً تفاوت در نتایج گزارش شده ناشی از تفاوت در نوع مطالعات (برون تنی در مقابل درون تنی)، نوع سلول‌ها (سلول‌های OEC در مقابل سلول‌های هیپوکامپ)، حتی سن حیوانات استفاده شده در این مطالعات است.

Muthu و همکارانش هنگام استفاده از سیلیبینین برای جلوگیری از دیس لیپیدمی و نورو توكسیتی ناشی از استرس اکسیداتیو ناشی از آرسنیک، اعلام کردند که سیلیبینین دارای اثر محافظتی روی سمیت عصبی ناشی از استرس اکسیداتیو است. آن‌ها اظهار کردند که سیلیبینین با پاکسازی رادیکال‌های آزاد تولید شده در طی متابولیسم، از آسیب اکسیداتیو

نتایج آزمون MTT مطالعه حاضر نشان داد که تیمار نمودن سلول‌های OEC با غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ میکرومول سیلیبینین سبب حفظ بقای سلول‌ها می‌گردند، در حالی که غلظت‌های بالاتر آن (۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ میکرومول) توکسیک بوده و به صورت وابسته به دوز باعث مهار زنده‌مانی سلول‌های OEC می‌شوند، لذا غلظت‌های کم به عنوان غلظت‌های محافظتی و غلظت‌های ۲۵ میکرومول و بالاتر به عنوان غلظت‌های سمی در نظر گرفته شدند. Wang و همکارانش نشان دادند که سیلیبینین بقای نورون‌ها را در برابر پراکسید هیدروژن افزایش می‌دهد، همچنین آسیب هیپوکسی/ایسکمی و مرگ سلولی اتوفاژیک را در سلول‌های عصبی بعد از ایسکمی رپرفیوژن کاهش می‌دهد (۲۴). این نتایج هم‌راستا با نتایج غلظت‌های محافظتی مطالعه ما است. در حالی که نتایج مطالعه علی حسینی و همکارانش در بررسی تاثیر سیلیبینین بر میزان بقای سلول‌های هیپوکامپ موش‌های صحرایی آلزایمیری القا شده با Aβ 1-40، افزایش بقای وابسته به دوز سلول‌های هیپوکامپ در مواجهه با سیلیبینین (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) را نشان داد (۲۰). به نظر می‌رسد تفاوت در نتایج به دست آمده ناشی از تفاوت در نوع مطالعه از قبیل مطالعه برون تنی (in vitro)

نشان دادند که سیلیبینین بیان بیش از حد mRNA نیتریک اکسیدسنتاز ناشی از تزریق $\text{A}\beta 25-35$ در هیپوکامپ و آمیگدال را مهار می‌کند (۲۸).

Jung و همکارانش بیان کردند که سیلیبینین موجب کاهش سمیت عصبی ناشی از 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) می‌شود. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که درمان با سیلیبینین سبب کاهش سطح مولکول‌های التهابی $\text{Interlukin-1}\beta$ (IL-1 β), $\text{Tumor necrosis factor } \alpha$ (TNF α) و نیتریک اکسیدسنتاز (NOS) افزایش یافته ناشی از MPP+ می‌شود (۲۹). درحالی‌که در مطالعه علی حسینی و همکارانش، کاهش وابسته به دوز میزان تولید NO در موش‌های صحرایی آلزایمری القاشده با $\text{A}\beta 1-40$ به دنبال درمان با غلظت‌های (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) سیلیبینین گزارش شد (۲۰). همانطور که قبلاً اشاره شد تفاوت نتایج می‌تواند ناشی از تفاوت‌های موجود در نوع و ماهیت مطالعات باشد.

۱.۵. نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده تاثیر مثبت غلظت‌های محافظتی سیلیبینین بر حفظ بقا و ممانعت از افزایش استرس اکسیداتیو در سلول‌های OEC است، لذا به نظر می‌رسد که بتوان سیلیبینین را توام با سلول‌های مذکور در درمان بیماری‌های نورودژنراتیو استفاده نمود.

۲.۵. محدودیت‌های پژوهش

کمبود بودجه مواد و طولانی بودن روند دریافت مواد از محدودیت‌های این مطالعه بودند.

تشکر و قدردانی

این پروژه در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، انجام شده است، لذا نویسندگان مقاله از همکاران این مرکز به پاس همکاری و همراهی دلسوزانه‌شان قدردانی می‌کنند. از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه به پاس حمایت مالی از پروژه (کد ۹۵۱۰۲۱/۱۰۸) قدردانی می‌گردد.

مشارکت نویسندگان:

م. الف.: ایده و طراحی پروژه (مفهوم‌سازی و روش‌شناسی)، مدیریت پروژه (همکاری و نظارت بر اجرای پروژه) و نگارش مقاله؛ ن. الف.: همکاری در اجرای پروژه، تجزیه و تحلیل داده‌ها؛ س. ر.: همکاری در اجرای پروژه و جمع‌آوری داده‌ها. همه نویسندگان نسخه نهایی مقاله را خوانده و تأیید کرده‌اند.

جولوگیری می‌کند (۲۱). براساس نتایج این پژوهشگران، تجویز خوراکی سیلیبینین (۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم) روزانه یک‌بار به مدت ۴ هفته توام با آرسنیک (۵ میلی گرم بر کیلوگرم) از تغییرات و کاهش ایجادشده توسط آرسنیک در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوکاتایون پراکسیداز (GPX)، گلوکاتایون S- ترنسفراز (GST)، گلوکاتایون ردوکتاز (GR)، گلوکز ۶-فسفات دی‌هیدروژناز (G6PD)، گلوکاتایون (GSH)، توتال سولفیدریل (TSH) و ویتامین C در مناطق کورتکس، استریاتوم، مخچه، هیپوکامپ و ساقه مغز موش صحرایی جولوگیری می‌کند. در مطالعه آن‌ها میزان تولید ROS در مناطق مختلف مغز موش صحرایی نیز بررسی شد و نتایج نشان داد که مصرف سیلیبینین تجمع ROS را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد. Wang و همکارانش هم نشان دادند که سیلیبینین با مهار فعال‌سازی Nuclear (NF- κ B) factor kappa-B و جولوگیری از تولید ROS از پیری ناشی از D-گالاکتوز در موش ممانعت می‌کند (۲۲).

Galhardi و همکارانش نیز نشان دادند که سیلیبینین از طریق کاهش تولید ROS و پراکسیداسیون لیپیدی در مغز مانع فرآیندهای دژنراتیو پاتوژنیک می‌شود (۲۵). براساس نتایج دیگر مطالعات، سیلیبینین در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم باعث کاهش واکنش پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از استرس اکسیداتیو و افزایش گلوکاتایون پراکسیداز با افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز می‌شود (۲۶).

Song و همکارانش نیز نشان دادند که درمان با سیلیبینین باعث افزایش قابل توجه سطح گلوکاتایون و کاهش سطح Malondialdehyde (MDA) در هیپوکامپ موش‌های صحرایی دریافت‌کننده $\text{A}\beta 25-35$ می‌شود. آن‌ها اعلام کردند که سیلیبینین اختلالات شناختی ناشی از $\text{A}\beta 25-35$ در موش‌های صحرایی را از طریق مهار استرس اکسیداتیو، پاسخ التهابی و تنظیم سطح اتوفاجی در هیپوکامپ بهبود می‌بخشد و به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان به پیشگیری و درمان آلزایمر کمک می‌کند (۲۷). در مطالعه ما نیز غلظت‌های محافظتی سیلیبینین پس از ۴۸ ساعت مانع از افزایش میزان ROS تولیدشده در سلول‌های OEC شد.

نتایج تست گریس در مطالعه ما نشان داد که غلظت‌های محافظتی سیلیبینین مانع از افزایش میزان تولید NO در سلول‌های OEC می‌شود و با افزایش غلظت سیلیبینین میزان تولید NO به‌صورت وابسته به دوز در سلول‌ها افزایش می‌یابد. نتایج مطالعه Lu و همکارانش موافق با یافته‌های غلظت‌های محافظتی مطالعه ما است. این محققان طی استفاده از سیلیبینین برای بهبود اختلال حافظه، پاسخ‌های التهابی و استرس اکسیداتیو ناشی از تزریق $\text{A}\beta 25-35$

References

1. Mansergh FC, Wride MA, Rancourt DE. Neurons from stem cells: implications for understanding nervous system development and repair. *Biochem Cell Biol.* 2000;78(5):613-28. [PubMed ID:11103952].
2. Mayeur A, Duclos C, Honore A, Gauberti M, Drouot L, do Rego JC, et al. Potential of olfactory ensheathing cells from different sources for spinal cord repair. *PLoS One.* 2013;8(4):e62860. [PubMed ID:23638158]. [PubMed Central ID:PMC3634744]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062860>.
3. Stamegna JC, Felix MS, Roux-Peyronnet J, Rossi V, Feron F, Gauthier P, et al. Nasal OEC transplantation promotes respiratory recovery in a subchronic rat model of cervical spinal cord contusion. *Exp Neurol.* 2011;229(1):120-31. [PubMed ID:20633558]. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.07.002>.
4. Radtke C, Aizer AA, Agulian SK, Lankford KL, Vogt PM, Kocsis JD. Transplantation of olfactory ensheathing cells enhances peripheral nerve regeneration after microsurgical nerve repair. *Brain Res.* 2009;1254:10-7. [PubMed ID:19059220]. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.11.036>.
5. Chen J, Bhandar B, Kavdia M. Interaction of ROS and RNS with GSH and GSH/GPX Systems. *FASEB J.* 2015;29(S1). https://doi.org/10.1096/fasebj.29.1_supplement.636.7.
6. Tewari D, Sah AN, Bawari S, Nabavi SF, Dehpour AR, Shirooie S, et al. Role of Nitric Oxide in Neurodegeneration: Function, Regulation, and Inhibition. *Curr Neuropharmacol.* 2021;19(2):114-26. [PubMed ID:32348225]. [PubMed Central ID:PMC8033982]. <https://doi.org/10.2174/1570159X18666200429001549>.
7. Liu C, Liang MC, Soong TW. Nitric Oxide, Iron and Neurodegeneration. *Front Neurosci.* 2019;13:114. [PubMed ID:30833886]. [PubMed Central ID:PMC6388708]. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00114>.
8. Hardingham N, Dachtler J, Fox K. The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:190. [PubMed ID:24198758]. [PubMed Central ID:PMC3813972]. <https://doi.org/10.3389/fn-cel.2013.00190>.
9. Niforou K, Cheimonidou C, Trougakos IP. Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance. *Redox Biol.* 2014;2:323-32. [PubMed ID:24563850]. [PubMed Central ID:PMC3926111]. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.01.017>.
10. Morris G, Berk M, Klein H, Walder K, Galecki P, Maes M. Nitrosative Stress, Hypernitrosylation, and Autoimmune Responses to Nitrosylated Proteins: New Pathways in Neurodegenerative Disorders Including Depression and Chronic Fatigue Syndrome. *Mol Neurobiol.* 2017;54(6):4271-91. [PubMed ID:27339878]. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9975-2>.
11. Hannibal L. Nitric Oxide Homeostasis in Neurodegenerative Diseases. *Curr Alzheimer Res.* 2016;13(2):135-49. [PubMed ID:26391043]. <https://doi.org/10.2174/1567205>

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله عدم تعارض منافع خود را اعلام می‌دارند.

بازيابی داده‌ها:

مجموعه داده ارائه شده در مطالعه با درخواست از نویسندگان مربوطه در حین ارسال یا پس از انتشار در دسترس است.

کد اخلاق:

این مطالعه بر اساس راهنمای اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ایلام و با کد اخلاق (IR.MEDILAM.REC.1395.67) انجام شد.

حمایت مالی و معنوی:

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایلام به شماره ۹۵۱۰۲۱/۱۰۸ انجام شده است.

012666150921101250.

12. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol.* 2014;24(10):R453-62. [PubMed ID:24845678]. [PubMed Central ID:PMC4055301]. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>.
13. Borza LR. A review on the cause-effect relationship between oxidative stress and toxic proteins in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 2014;118(1):19-27. [PubMed ID:24741770].
14. Mateen S, Tyagi A, Agarwal C, Singh RP, Agarwal R. Silibinin inhibits human nonsmall cell lung cancer cell growth through cell-cycle arrest by modulating expression and function of key cell-cycle regulators. *Mol Carcinog.* 2010;49(3):247-58. [PubMed ID:19908243]. [PubMed Central ID:PMC3049548]. <https://doi.org/10.1002/mc.20595>.
15. Hogan FS, Krishnegowda NK, Mikhailova M, Kahlenberg MS. Flavonoid, silibinin, inhibits proliferation and promotes cell-cycle arrest of human colon cancer. *J Surg Res.* 2007;143(1):58-65. [PubMed ID:17950073]. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2007.03.080>.
16. Dilpesh Jain DJ, Rahul Somani RS. Silibinin: a bioactive flavanone in milk thistle ameliorate gentamicin induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacologia.* 2015;6(1):38-44.
17. Jain D, Somani R. Silibinin, a bioactive flavanone, prevents the progression of early diabetic nephropathy in experimental type-2 diabetic rats. *Int J Green Pharm.* 2015;9(2). <https://doi.org/10.4103/0973-8258.155060>.
18. Basiglio CL, Sanchez Pozzi EJ, Mottino AD, Roma MG. Differential effects of silymarin and its active component silibinin on plasma membrane stability and he-

- patocellular lysis. *Chem Biol Interact.* 2009;**179**(2-3):297-303. [PubMed ID:19135039]. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.12.008>.
19. Duan S, Guan X, Lin R, Liu X, Yan Y, Lin R, et al. Silibinin inhibits acetylcholinesterase activity and amyloid beta peptide aggregation: a dual-target drug for the treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2015;**36**(5):1792-807. [PubMed ID:25771396]. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.02.002>.
20. Alihosseini T, Azizi M, Abbasi N, Mohammadpour S, Bagheri M. Amelioration of amyloid beta (A β (1-40)) neurotoxicity by administration of silibinin; a behavioral and biochemical assessment. *Iran J Basic Med Sci.* 2023;**26**(7):791-8. [PubMed ID:37396937]. [PubMed Central ID:PMC10311968]. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2023.66831.14665>.
21. Muthu M, Naroem Chanu S, Kalist S, Prabu M. Defensive role of silibinin against arsenic induced oxidative stress mediated dyslipidemia and neurotoxicity in rats. *Int J Pharmacol Toxicol.* 2016;**4**(1):78-88. <https://doi.org/10.14419/ijpt.v4i1.5803>.
22. Wang Q, Zou L, Liu W, Hao W, Tashiro S, Onodera S, et al. Inhibiting NF-kappaB activation and ROS production are involved in the mechanism of silibinin's protection against D-galactose-induced senescence. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011;**98**(1):140-9. [PubMed ID:21167197]. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.12.006>.
23. Azizi M, Farahmandghavi F, Joghataei MT, Zandi M, Imani M, Bakhtiari M, et al. ChABC-loaded PLGA nanoparticles: A comprehensive study on biocompatibility, functional recovery, and axonal regeneration in animal model of spinal cord injury. *Int J Pharm.* 2020;**577**:119037. [PubMed ID:31953081]. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119037>.
24. Wang M, Li YJ, Ding Y, Zhang HN, Sun T, Zhang K, et al. Silibinin Prevents Autophagic Cell Death upon Oxidative Stress in Cortical Neurons and Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. *Mol Neurobiol.* 2016;**53**(2):932-43. [PubMed ID:25561437]. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9062-5>.
25. Galhardi F, Mesquita K, Monserrat JM, Barros DM. Effect of silymarin on biochemical parameters of oxidative stress in aged and young rat brain. *Food Chem Toxicol.* 2009;**47**(10):2655-60. [PubMed ID:19647779]. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.07.030>.
26. Shivani C, Lubhan S, Kedarinath T, Vipul K. Neuroprotective effect of Silibinin against middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia and brain injury in Wistar rats. *J Neuroscience Behav Health.* 2017;**9**(1):10-5. <https://doi.org/10.5897/jnbh2014.0120>.
27. Song X, Zhou B, Cui L, Lei D, Zhang P, Yao G, et al. Silibinin ameliorates A β (25-35)-induced memory deficits in rats by modulating autophagy and attenuating neuroinflammation as well as oxidative stress. *Neurochem Res.* 2017;**42**(4):1073-83. [PubMed ID:28004303]. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2141-4>.
28. Lu P, Mamiya T, Lu LL, Mouri A, Niwa M, Hiramatsu M, et al. Silibinin attenuates amyloid beta(25-35) peptide-induced memory impairments: implication of inducible nitric-oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;**331**(1):319-26. [PubMed ID:19638571]. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.155069>.
29. Jung UJ, Jeon MT, Choi MS, Kim SR. Silibinin attenuates MPP(+)-induced neurotoxicity in the substantia nigra in vivo. *J Med Food.* 2014;**17**(5):599-605. [PubMed ID:24660866]. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.2926>.

Research Article

Investigating the Effect of Silibinin on Oxidative Stress in Olfactory Ensheathing Cells of Rat Pups

Monireh Azizi ^{1,*}, Naser Abbasi ², Saeedeh Rashidi ²

¹Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

²Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

*Corresponding Author: Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran. Email: azizi.moaz@gmail.com

Received 23/09/2024; Accepted 28/06/2025

Abstract

Background: Today, cell therapy is one of the most important therapeutic strategies in the nervous system. Meanwhile, the transplantation of olfactory ensheathing cells (OECs) has attracted the attention of researchers due to their easy access. Silibinin, the active substance of *Silybum marianum*, has various properties, including antioxidant properties.

Objectives: In this study, the antioxidant effects of silibinin on oxidative stress in OEC cells were investigated.

Methods: Olfactory ensheathing cells were extracted from the olfactory mucosa of rat pups and cultured. After determination of the nature of the cells through immunocytochemistry for p75^{NTR} and S100- markers, different concentrations of 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, and 125 μ M of silibinin were prepared and added to the cultured cells. The protective and toxic concentrations of silibinin were determined by the MTT (Dimethyl thiazyl -5 ,2diphenyltetrazolium bromide) test. Protective (5 and 1 μ M) and toxic (50 and 75 μ M) concentrations were added to the cultured cells, and the amount of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) production was evaluated by Griess and fluorometry methods, respectively.

Results: The results of immunocytochemistry confirmed that the cultured cells are OECs. MTT results confirmed the cell survival property of low concentrations of silibinin. Protective concentrations of silibinin prevented the increase in NO and ROS production in OECs.

Conclusion: The results of this study confirmed the antioxidant properties of low concentrations of silibinin in OECs.

Keywords: Silibinin, *Silybum marianum*, Olfactory Ensheathing Cells, Cell Survival, Oxidative Stress