

اثر سیلی مارین بر اختلالات حافظه و یادگیری القا شده با نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم

نویسندگان: پرستو بهرام کلهری^۱، اکبر حاجی زاده مقدم^۱، محبوبه زارع^۲، رضا صیرفی^۳

۱. دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
۲. دانشکده‌ی گیاهان دارویی، دانشگاه فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران
۳. دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

* نویسنده مسئول: اکبر حاجی زاده مقدم
E-mail: a.hajizadeh@umz.ac.ir

چکیده

مقدمه و هدف: نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم یکی از پرمصرف‌ترین نانو ذرات است که در زیست پزشکی، لوازم آرایشی و صنعت استفاده می‌شوند. علی‌رغم این چندین مطالعه نشان داده که این نانو ذرات می‌توانند موجب آسیب به هیپوکامپ شوند. سیلی مارین، فلاونوئیدگانی است که از دانه‌های گیاه خارمریم (*Silybum marianum*) به دست می‌آید و به خاطر دارا بودن خاصیت مهار رادیکال‌های آزاد، به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی اثر سیلی مارین بر بهبود اختلالات یادگیری و حافظه القا شده با نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم (TiO_2) است.

مواد و روشها: در این پژوهش موش‌های صحرایی نر به چهار گروه کنترل، شم، مسموم شده با نانو TiO_2 ، (تجویز خوراکی نانو TiO_2 با غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت سه هفته) و گروه مسموم تیمار شده با سیلی مارین (تجویز خوراکی به مدت سه هفته) تقسیم شدند. به منظور بررسی اثر تخریبی نانو ذرات TiO_2 بر حافظه موش صحرایی نر و درمان آن با سیلی مارین از روش یادگیری احترازی غیرفعال (passive avoidance) توسط دستگاه شاتل باکس (Shuttle box) استفاده شد.

نتایج: این مطالعه نشان داد که مصرف خوراکی نانو ذرات TiO_2 موجب کاهش معنی‌دار تأخیر در زمان ورود به اتاق تاریک و افزایش ماندن در اتاق تاریک نسبت به گروه کنترل می‌شود ($p < 0.001$) و تیمار با سیلی مارین سبب برگشت این شاخص‌ها به سطح کنترل می‌گردد ($p < 0.001$).

نتیجه گیری: یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که سیلی مارین احتمالاً به واسطه خواص آنتی‌اکسیدانی خود باعث بهبود اختلال حافظه و یادگیری القاء شده با نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم می‌شوند.

واژگان کلیدی: نانو ذرات TiO_2 ، هیپوکامپ، یادگیری احترازی غیرفعال، سیلی مارین

دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست و پنجم-شماره ۱۳۲
دی ۱۳۹۶

دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۳۰
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۶/۰۹/۱۸
پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۲۵

مقدمه

نانوتکنولوژی توانایی دست‌کاری مواد در سطح تک‌اتم و گروه‌های کوچک اتم، به‌منظور تولید ساختارها، مواد و ابزارهای جدید با خواص بی‌همتای فیزیکی و شیمیایی است (۱). پیشرفت‌های اخیر در نانوتکنولوژی منجر به تولید نانو مواد جدید و گوناگونی شده است. نانو مواد سطح بزرگ‌تری نسبت به واحد حجم، فعالیت شیمیایی زیاد و نفوذپذیری بیشتری به درون سلول دارند. به دلیل این ویژگی‌ها، نانو مواد می‌توانند اثرات پیش‌بینی‌نشده‌ای را بر سلامت انسان بگذارند (۲). نانو ذرات TiO_2 از پرمصرف‌ترین نانو مواد مورد استفاده در مواد آرایشی، داروها، مواد افزودنی غذا و رنگ‌ها می‌باشند. نانو ذرات TiO_2 می‌توانند در کبد، کلیه، طحال، شش، قلب و مغز حیواناتی که در معرض این ذرات قرار گرفته‌اند، تجمع یابند و باعث القاء استرس اکسیداتیو و التهاب و در ادامه آسیب به DNA و آپوپتوز گردد (۳). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که این نانو ذرات می‌توانند در نواحی مختلف سیستم عصبی مرکزی از جمله هیپوکامپ تجمع زیستی یافته و تغییرات آسیب‌شناختی در نورون‌های هیپوکامپ را القاء کنند. بطوریکه قرار گرفتن در معرض نانو ذرات TiO_2 به‌صورت استنشاقی موجب تجمع این نانو ذره در ناحیه هیپوکامپ و کاهش یادگیری و حافظه در مدل حیوانی گردید (۴-۷).

فلاونوئیدها به عنوان گروهی از ترکیبات پلی فنولی به مقدار فراوان در بخش‌های مختلف گیاهان یافت می‌شوند و به دلیل اثرات حفاظتی متعدد از قبیل آنتی‌اکسیدانی، ضد دیابتی و ضدالتهابی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند (۸). گیاه خار مریم *Silybum marianum* از خانواده‌ی آستراسه است. سیلی مارین، ماده فعال این گیاه عصاره‌ی استاندارد شده متشکل از تقریباً ۷۰-۸۰ درصد فلاونولیکنانهای سیلی مارین (سیلی بین A و B، ایزوسیلی بین A و B و سیلی‌دیانین و سیلی‌کریستین) و فلاونوئیدهای (تاکسیفول و کوئرسیتین) و ۲۰-۳۰ درصد باقیمانده آن شامل

بخش‌های تشکیل شده از ترکیبات پلی‌مریک و پلی فنولیک اکسید شده است. سیلی مارین محدوده‌ی گسترده‌ای از اثرات زیستی و دارویی شامل فعالیت آنتی‌اکسیدانی، تحریک ساخت پروتئین و بازسازی سلول و اثرات قابل توجه ضد سرطانی را داراست. به‌علاوه فعالیت ضد دیابتی، محافظت قلب، ضدالتهابی، کاهشده چربی، نوروتروفیک، حفاظت عصبی و تعدیل ایمنی نیز گزارش شده است (۹). هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر مصرف خوراکی سیلی مارین بر اختلالات حافظه و یادگیری ناشی از نانو ذرات TiO_2 در موش صحرائی نر نژاد ویستار است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نانو ذرات TiO_2

در این پژوهش نانو ذرات TiO_2 به روش سل-ژل ساخته شده است. ۵ میلی‌لیتر محلول $TiCl_4$ ، به ۵۰ میلی‌لیتر محلول اتانول در دمای صفر درجه سانتی‌گراد اضافه شد. سپس برای تکمیل فرآیند آبکافت محلول در مدت ۲ ساعت در دمای محیط بر روی همزن مغناطیسی قرار داده شد تا به محلول ژلاتینی زرد روشن تبدیل شود. پس از اتمام زمان ژلاتینه شدن، محلول ژلاتینی به مدت ۳ روز در دمای ۸۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پودر سفیدرنگ به‌دست‌آمده برای فرآیند کلسینه کردن در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد در کوره الکتریکی، به مدت ۲ ساعت قرار گرفت (۱۰).

حیوان‌ها و گروه‌های آزمایشی

در این پژوهش ۲۸ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار با وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم از پژوهشکده انستیتو پاستور آمل خریداری و به اتاق حیوانات گروه زیست‌شناسی دانشگاه مازندران انتقال داده شدند. حیوانات پس از انتقال به آزمایشگاه با دوره‌ی روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و دمای 24 ± 3 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و در طول دوره‌ی آزمایش به آب و غذای کافی دسترسی داشتند. آزمایش‌ها یک هفته بعد از انتقال موش‌ها به منظور سازگاری با محیط انجام گرفت. موش‌های

شود. بلافاصله بعد از ورود موش به قسمت تاریک دریاچه بسته شده و شوک الکتریکی با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۱/۲ میلی آمپر به مدت ۳ ثانیه به پای حیوان وارد گردید. سپس موش از بخش تاریک خارج و به قفس برگردانده شد.

مرحله یادآوری: پس از ۲ دقیقه موش مجدداً در ناحیه‌ی روشن قرار گرفت تا تست یادگیری انجام شود. عدم ورود موش به قسمت تاریک به مدت ۱۲۰ ثانیه به عنوان یادگیری موفق در نظر گرفته شد. در صورت ورود مجدد حیوان به بخش تاریک دریاچه برای بار دوم بسته و شوک به صورت قبل وارد گردید و این کار آنقدر تکرار شد تا موش یاد بگیرد وارد محفظه‌ی تاریک نشود.

مرحله‌ی به خاطر آوری برای ارزیابی حافظه ۲۴ ساعت بعد از دریافت شوک انجام شد. حیوان در بخش روشن قرار گرفت، درحالی که دریاچه‌ی بین دو اتاق باز بود و تأخیر زمانی برای اولین ورود به اتاق تاریک و مجموع زمان سپری شده در هر یک از اتاق‌های تاریک و روشن ثبت گردید. سقف زمانی در این مرحله ۳۰۰ ثانیه بود. طولانی‌تر بودن تأخیر زمانی برای اولین ورود به اتاق تاریک و مجموع زمان سپری شده در اتاق روشن و همچنین کوتاه بودن مجموع زمان سپری شده در اتاق تاریک نشانه‌ی یادگیری و حافظه‌ی بهتر است (۱۴-۱۱).

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه بین گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون Tukey استفاده شد. تمامی محاسبات با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۰ انجام شد و سطح معنی دار آزمون‌ها P کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار سیگما پلات با ویرایش ۱۲/۵ استفاده گردید.

نتایج

با توجه به شکل ۱ میانگین اندازه نانو ذرات TiO₂ ساخته شده به وسیله‌ی میکروسکوپ روبشی در محدوده ۳۰ نانومتر است (شکل ۱).

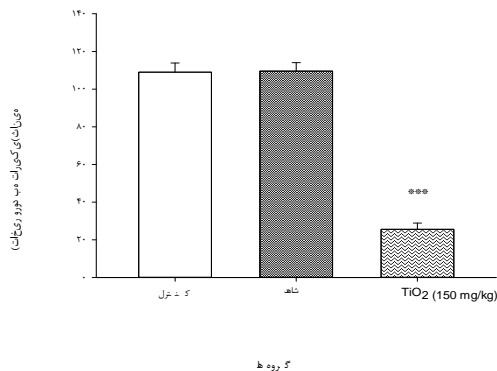
صحرائی به صورت تصادفی به چهار گروه هفت تایی کنترل، شم، مسموم شده با نانو TiO₂ و گروه مسموم تیمار شده با سیلی مارین تقسیم شدند. گروه کنترل هیچ محلولی را به صورت گاوآژ دریافت نکرد. گروه شاهد حلال نانو TiO₂ و سیلی مارین را به صورت گاوآژ دریافت کردند. دو گروه دیگر ابتدا ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم نانو TiO₂ روزانه به مدت سه هفته و به صورت گاوآژ دریافت نمودند در ادامه یکی از گروه‌های مسموم، سیلی مارین را با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن روزانه به مدت سه هفته به صورت گاوآژ دریافت کرد. ۲۴ ساعت بعد از آخرین تیمار با سلی مارین تست رفتاری شاتل باکس به منظور ارزیابی اختلال حافظه و یادگیری انجام شد.

آزمون رفتاری

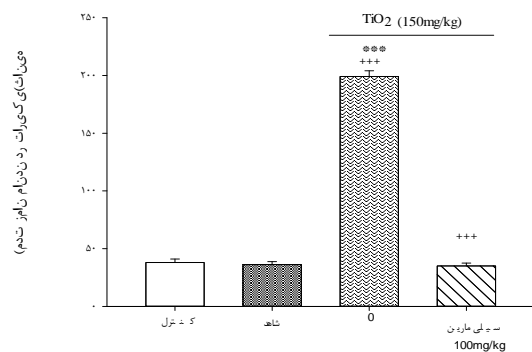
دستگاه یادگیری احترازی غیرفعال، شاتل باکس نام دارد و شامل جعبه دو قسمتی از جنس پلکسی گلاس دارای بخش روشن و بخش تاریک است. ابعاد (سانتی متر ۲۰×۲۰×۲۰) دو قسمت با هم برابر بوده و با یک دریاچه‌ی (سانتی متر ۸×۸) در ارتباط با هم می‌باشند. در کف هر دو بخش، میله‌های فلزی از جنس فولاد ضدزنگ به فاصله‌ی ۱ سانتی متر از هم قرار دارند، شوک از طریق آن‌ها و در قسمت تاریک به پای حیوان وارد می‌شود. لامپ ۶۰ وات به منظور روشنایی قسمت روشن مورد استفاده قرار گرفت.

مرحله سازش: سه هفته پس از شروع گاوآژ سیلی- مارین، آزمون حافظه و یادگیری احترازی غیرفعال طی چند مرحله انجام شد. به منظور سازش و عادت حیوان با محیط ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش حیوان در محیط آزمایشگاه قرار گرفت. همچنین در مرحله سازش حیوان در محیط روشن دستگاه قرار داده شد و بعد از ۳۰ ثانیه درب گیوتینی را باز نموده تا موش در هر دو اتاق آزادانه رفت و آمد کند.

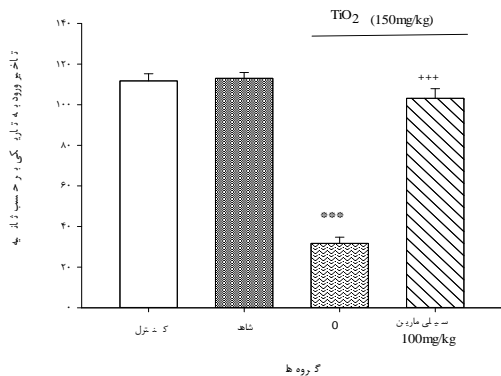
مرحله‌ی اکتساب: این مرحله ۶۰ دقیقه پس از عادت انجام شد. موش را در قسمت روشن جعبه گذاشته و دو دقیقه به حیوان مهلت داده شد تا وارد محفظه‌ی تاریک



نمودار ۲. بررسی اثر نانو TiO₂ بر اختلالات یادگیری برحسب تأخیر ورود به تاریکی (Mean±SD و n=7) ***کاهش معنی دار در مقایسه با گروه کنترل (p<0/001)

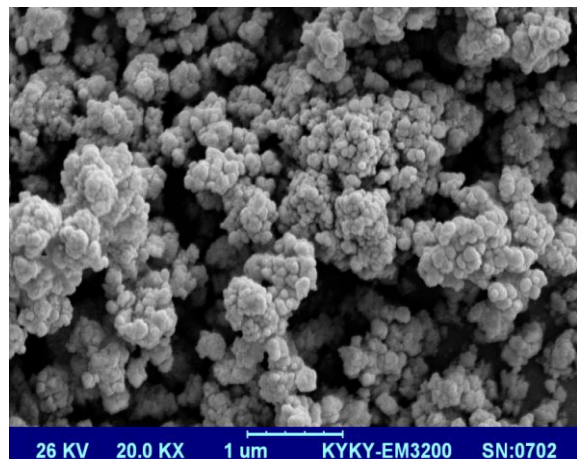


نمودار ۳. بررسی اثر سیلی مارین بر اختلالات یادگیری برحسب ماندن در تاریکی (Mean±SD و n=7) ***افزایش معنی دار در مقایسه با گروه کنترل (p<0/001) +++کاهش معنی دار در مقایسه با گروه بیمار (p<0/001)



نمودار ۴. بررسی اثر سیلی مارین بر اختلالات یادگیری برحسب تأخیر ورود به تاریکی (Mean±SD و n=7) ***افزایش معنی دار در مقایسه با گروه بیمار (p<0/001) +++کاهش معنی دار در مقایسه با گروه کنترل (p<0/001)

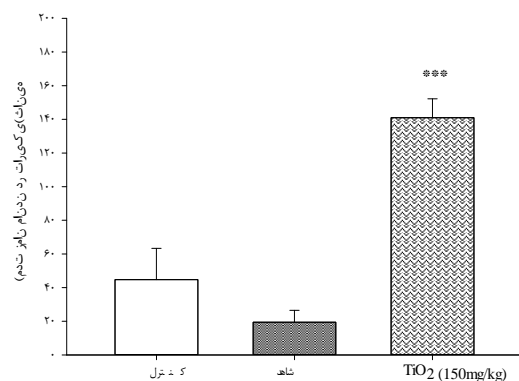
گروه مسموم تیمار شده با سیلی مارین تفاوت معنی داری در مدت زمان تأخیر و توقف در اتاق تاریک در مقایسه با گروه کنترل نشان نداده است.



شکل ۱. تصویر SEM از نمونه پودرهای TiO₂

نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف خوراکی نانو ذرات TiO₂ موجب کاهش معنی دار تأخیر در زمان ورود به اتاق تاریک تاریک (p<0/001) و افزایش ماندن در اتاق تاریک نسبت به گروه کنترل می شود (p<0/001).

همچنین گروه بیمار تیمار شده با سیلی مارین در شاخص مدت زمان توقف در اتاق تاریک نسبت به گروه بیمار کاهش معنی داری (p<0/001) نشان داده است شده. در گروه مسموم تیمار شده با سیلی مارین نسبت به گروه مسموم افزایش معنی داری در مدت زمان تأخیر در ورود به اتاق تاریک نشان داد. همچنین کاهش معنی دار در مدت زمان توقف در اتاق تاریک نسبت به گروه مسموم مشاهده می شود (p<0/001). (نمودار ۱، ۲، ۳ و ۴).



نمودار ۱. بررسی اثر نانو TiO₂ بر اختلالات یادگیری برحسب ماندن در تاریکی (Mean±SD و n=7) ***افزایش معنی دار در مقایسه با گروه کنترل (p<0/001)

بحث

موش می‌شود که منجر به آپوپتوز نورون‌های هیپوکامپ و در نهایت اختلال حافظه و یادگیری و آسیب ساخت فضایی می‌شود (۱۸).

سیلی‌مارین در حفاظت نورونی علیه استرس اکسیداتیو و استرس نیتروساتیو دخیل است. گزارش شده که سیلی‌مارین، اثر مستقیمی بر وضعیت اکسیداتیو عصبی اعمال می‌کند. در مطالعه‌ای مشاهده شده که سیلی‌مارین سمیت نورونی و استرس اکسیداتیو القاء شده به واسطه استامینوفن و منگنز در مدل‌های حیوانی را با افزایش فعالیت شاخص‌های آنتی‌اکسیداتیو آنزیمی و غیر آنزیمی خنثی می‌کند (۱۹). همچنین در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۴ گزارش شده است که سیلی‌مارین می‌تواند استرس اکسیداتیو را با پاک‌سازی و رفع ROS کاهش دهد، مانع آبخار پراکسیداسیون لپید و نیترولیزاسیون پروتئین شود و حفاظت آنتی‌اکسیداتیو را افزایش دهد. علاوه بر این، سیلی‌مارین مهار بیان $TNF-\alpha$ ، اثرات استروژنی و ضدالتهابی را نشان می‌دهد (۲۰).

مطالعات پیشین نشان داده‌اند که میزان ساخت پروتئین در هنگام شکل‌گیری حافظه افزایش می‌یابد (۲۱). سیلی‌مارین به دلیل شباهت ساختاری با هورمون‌های استروئیدی می‌تواند وارد هسته سلول شود و با اثر بر آنزیم‌های رونویسی، عمل پروتئین‌سازی را تسریع بخشد، همچنین استرادیول و سیلی‌مارین می‌توانند به واسطه افزایش آزادسازی استیل کولین موجب تسهیل در یادگیری شوند (۲۲). یغمایی و همکاران نشان دادند که میانگین تعداد سلول‌ها در ناحیه CA1 هیپوکامپی و سلول‌های گرانولار در ناحیه شکنج دندانه‌ای در تیمار با سیلی‌بین، ماده مؤثر سیلی‌مارین، در مقایسه با گروه کنترل به طور قابل توجهی افزایش یافته است (۲۳). هیرایاما و همکاران اثر سیلی‌مارین را بر ایسکمی بررسی کردند و نتیجه گرفتند که سیلی‌مارین اثر حفاظتی بر تأخیر در مرگ سلول‌های عصبی در هیپوکامپ موش صحرايي نر دارد (۲۴). با توجه به مطالعات پیشین احتمالاً مصرف

در مطالعه حاضر به بررسی اثر سیلی‌مارین بر اختلالات حافظه و یادگیری القا شده با نانو ذرات TiO_2 پرداخته شده است. نتایج نشان داد که مصرف نانو ذرات TiO_2 منجر به کاهش مدت زمان ورود به اتاقک تاریک و افزایش ماندن در اتاقک تاریک می‌شود که نشان‌دهنده اختلال در یادگیری احترازی غیرفعال است. همچنین مشاهده گردید که مصرف سیلی‌مارین موجب افزایش معنی‌داری در مدت زمان تأخیر در ورود به اتاقک تاریک و کاهش در مدت زمان توقف در اتاقک تاریک نسبت به گروه بیمار شد که بیانگر بهبود یادگیری و حافظه احترازی غیرفعال می‌باشد. مطالعات پیشین حاکی از آن است که نانو ذرات TiO_2 می‌تواند به روش‌های مختلف مثل استنشاق، گوارش، پوست و تزریق وارد بدن انسان می‌گردد (۱۵) و همچنین می‌تواند از سد خونی- مغزی عبور کرده و وارد سیستم عصبی مرکزی شوند، نانو ذرات TiO_2 می‌تواند تولید گونه‌های فعال اکسیژن در مغز را تحریک و باعث آسیب عصبی شوند (۱۶). گزارش شده است که استرس اکسیداتیو و آسیب ناشی از نانو ذرات TiO_2 در مغز آبخاری از واکنش‌ها مانند التهاب، پراکسیداسیون لپید، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو، کاهش گلوتامیک اسید و آپوپتوز را باعث می‌شود (۱۷). سلول‌های هیپوکامپی به شدت به ROS ایجادشده توسط نانو ذرات حساس هستند. در مطالعه‌ای هو و همکارانش در سال ۲۰۱۱ گزارش نمودند که تجمع ROS و نقص حافظه ایجادشده به وسیله‌ی نانو ذرات TiO_2 ممکن است با آپوپتوز هیپوکامپ در موش همراه باشد (۵). در سال ۲۰۱۰ نشان داده شد که استنشاق نانو ذرات TiO_2 از راه بینی، تغییرات هیستوپاتولوژی در ناحیه CA1 هیپوکامپ ایجاد کرده و می‌تواند منجر به افزایش پاسخ التهابی با تقویت سطوح $TNF-$ و ایترلوکین شود (۱۶). همچنین در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۴ مشاهده شده است که مواجهه با نانو ذرات TiO_2 موجب رسوب کلسیم در نورون‌ها، تخریب نوروترانسمیترها و آنزیم‌ها در مغز

سیلی مارین موجب بهبود حافظه و یادگیری و جبران اثرات تخریبی نانو ذرات TiO₂ در هیپوکامپ می شود.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه مازندران انجام گردید که بدین به وسیله از این مجموعه قدردانی می شود.

منابع

- Iavicoli I, Leso VE, Fontana LU, Bergamaschi A. Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vitro mammalian studies. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011; 5: 481-508.
- Sheng L, Wang X, Sang X, Ze Y, Zhao X, Liu D, Gui S, Sun Q, Cheng J, Cheng Z, Hu R. Cardiac oxidative damage in mice following exposure to nanoparticulate titanium dioxide. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2013; 11: 3238-46.
- Gao X, Yin S, Tang M, Chen J, Yang Z, Zhang W, Chen L, Yang B, Li Z, Zha Y, Ruan D. Effects of developmental exposure to TiO₂ nanoparticles on synaptic plasticity in hippocampal dentate gyrus area: an in vivo study in anesthetized rats. *Biological trace element research.* 2011; 3: 1616-28.
- Wang J, Liu Y, Jiao F, Lao F, Li W, Gu Y, Li Y, Ge C, Zhou G, Li B, Zhao Y. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. *Toxicology.* 2008; 1: 82-90.
- Hu R, Zheng L, Zhang T, Gao G, Cui Y, Cheng Z, Cheng J, Hong M, Tang M, Hong F. Molecular mechanism of hippocampal apoptosis of mice following exposure to titanium dioxide nanoparticles. *Journal of hazardous materials.* 2011; 1: 32-40.
- Sheng L, Ze Y, Wang L, Yu X, Hong J, Zhao X, Ze X, Liu D, Xu B, Zhu Y, Long Y. Mechanisms of TiO₂ nanoparticle-induced neuronal apoptosis in rat primary cultured hippocampal neurons. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2015; 3: 1141-9.
- Schacter DL, Verfaellie M, Koutstaal W. Memory illusions in amnesic patients: Findings and implications. Guilford Press 2002.
- Shahbazi R, Davoodi H, Esmaeili S. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology* 2013; 7[Text in Persian]
- Javed S, Kohli K, Ali M. Reassessing bioavailability of silymarin. *Altern Med Rev.* 2011; 3: 239-49.
- Jameel N Z, Haider JA, Taha Y. Synthesis of TiO₂ Nanoparticles by Using Sol-Gel Method and its Applications as Antibacterial Agents. *Eng & Tech. Journal.* 2014; 3.
- Nikkhah A, Ghahremanitamadon F, Zargooshnia S, Shahidi S, Asl SS. Effect of Amyloid β -Peptide on Passive Avoidance Learning in Rats: A Behavioral Study. *Avicenna Journal of Neuro Psych Physiology.* 2014; 1
- Lashgari R, Motamedi F, Asl SZ, Shahidi S, Komaki A. Behavioral and electrophysiological studies of chronic oral administration of L-type calcium channel blocker verapamil on learning and memory in rats. *Behavioural brain research.* 2006; 2: 324-8.
- Shahidi S, Komaki A, Mahmoodi M, Atrvash N, Ghodrati M. Ascorbic acid supplementation could affect passive avoidance learning and memory in rat. *Brain research bulletin.* 2008; 1: 109-13.
- Yaghmaei P, Azarfar K, Dezfulian M, Ebrahim-Habibi A. Silymarin effect on amyloid- β plaque accumulation and gene expression of APP in an Alzheimer's disease rat model. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2014; 1: 1.
- Liu S, Xu L, Zhang T, Ren G, Yang Z. Oxidative stress and apoptosis induced by nanosized titanium dioxide in PC12 cells. *Toxicology.* 2010; 1: 172-7.
- Ma L, Liu J, Li N, Wang J, Duan Y, Yan J, Liu H, Wang H, Hong F. Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated nanoparticulate TiO₂ delivered to the abdominal cavity. *Biomaterials.* 2010; 1: 99-105.
- Meena R, Kumar S, Paulraj R. Titanium oxide (TiO₂) nanoparticles in induction of apoptosis and inflammatory response in brain. *Journal of Nanoparticle Research.* 2015; 1: 1-4.
- Ze Y, Sheng L, Zhao X, Ze X, Wang X, Zhou Q, Liu J, Yuan Y, Gui S, Sang X, Sun Q. Neurotoxic characteristics of spatial recognition damage of the hippocampus in mice following subchronic peroral exposure to TiO₂ nanoparticles. *Journal of hazardous materials.* 2014; 264: 219-29.
- Borah A, Paul R, Choudhury S, Choudhury A, Bhuyan B, Das Talukdar A, Dutta Choudhury M, Mohanakumar KP. Neuroprotective potential of silymarin against CNS disorders: insight into the pathways and molecular mechanisms of action. *CNS neuroscience & therapeutics.* 2013; 11: 847-53.
- Patten A, Brocardo PS, Gil-Mohapel J, Christie BR. Oxidative Stress in Fetal Alcohol Spectrum Disorders—Insights for the Development of Antioxidant-Based Therapies. In *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. Springer Berlin Heidelberg. 2014; 645-667
- Kang JS, Jeon YJ, Kim HM, Han SH, Yang KH. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase expression by silymarin in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2002; 1: 138-44.
- Yaghmaei PA, Parivar KA, Darab M, Oryan SH, Abbasi ES. The effect of Silymarin on learning and histological changes of hippocampal regions of rats. *J Qazvin Univ Med Sci.* 2010; 3: 25-30.
- Yaghmaei P, Parivar K, Masoudi A, Darab M, Amini E. The effect of silybin on passive avoidance learning and pathological changes in hippocampal CA1 and DG regions in male Wistar rats offspring. *Journal of Asian natural products research.* 2009; 6: 514-22.
- Hirayama K, Oshima H, Yamashita A, Sakatani K, Yoshino A, Katayama Y. Neuroprotective effects of silymarin on ischemia-induced delayed neuronal cell death in rat hippocampus. *Brain Research.* 2016; 1646: 297-303.

The effect of silymarin on memory and learning disorders induced by TiO₂ nanoparticles

Parastu Bahram Kalhori¹, Akbar Hajizade Moghaddam^{1*}, Mahbobe Zare², Reza Sayrafi³

1. Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.
2. Faculty of Herbal Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.
3. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

* Corresponding author e-mail: a.hajizadeh@umz.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Titanium dioxide nanoparticles (NP TiO₂) are one of the most highly used particles in the world. They are used for biomedical and cosmetic goals. Several studies have shown that NP TiO₂ induce oxidative stress in the hippocampus. Silymarin is a flavanolignan that is gained from seed of milk thistle (*Silybum marianum*) and due to its inhibition of free radicals, acts as an antioxidant in central nerves system. Aim of this research was to study the effect of silymarin on memory and learning disorders induced by TiO₂ nanoparticles.

Materials and Methods: In this experimental study, rats were divided into four groups: control, vehicle, toxic group (150 mg/kg of TiO₂ NPs for three weeks orally) as well as silymarin (100 mg/kg for three weeks orally after TiO₂ NPs administration). The destructive effect of Nano TiO₂ and treatment with silymarin were measured by passive avoidance test using shuttle box.

Results: Oral administration of TiO₂ NPs resulted in a significant increase of time of spending in dark box and reduction of time to enter the dark box and silymarin significantly decreased time of spending in dark box ($P > 0.001$) and treatment with silymarin returned the index to the level of control ($P > 0.001$).

Conclusion: The results from the present study indicated that silymarin probably due to its antioxidant effects causes improvement of memory and learning disorders induced by TiO₂ nanoparticles.

Keywords: TiO₂ nanoparticles, Hippocampus, Passive avoidance learning, Silymarin