

Research Paper

In Vitro Evaluation of Protective Effect of Rutin on Acrylamide-Induced Cellular Senescence in NIH3T3 Cells



Mehdi Evazalipour¹, Forough Aghajani Torshkoo², Reza Jafari-Shakib³, Sayeh Gholampour², *Ehsan Zamani²

1. Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.
2. Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.
3. Department of Immunology, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.



Citation Evazalipour M, Aghajani Torshkoo F, Jafari-Shakib R, Gholampour S, Zamani E. In Vitro Evaluation of Protective Effect of Rutin on Acrylamide-Induced Cellular Senescence in NIH3T3 Cells. Journal of Guilan University of Medical Sciences. 2022; 30(4):276-289. <https://doi.org/10.32598/JGUMS.30.4.1676.1>

doi <https://doi.org/10.32598/JGUMS.30.4.1676.1>



Received: 06 Sep 2021
Accepted: 15 Des 2021
Available Online: 01 Jan 2022

Keywords:
Senescence,
Rutin, Acrylamide,
Oxidative stress,
 β -galactosidase
activity, Hydrogen
peroxide

ABSTRACT

Background Aging is one of the important factors in the development of age-related diseases. Acrylamide can be produced during carbohydrate-rich foods prepared at high temperatures. Recently, studies showed that acrylamide can induce cellular senescence. On the other hand, Rutin as a natural flavonoid, has a potent antioxidant activity.

Objective This study aims to evaluate the protective effect of Rutin on oxidative-induced cellular senescence induced by acrylamide.

Methods NIH3T3 mouse embryonic fibroblast cells were used in this study, which treated by different concentrations of acrylamide and Hydrogen Peroxide (H_2O_2). Oxidative stress was assessed by measuring the malondialdehyde and glutathione concentrations. To evaluate the senescence process, β -galactosidase activity was measured by enzyme staining and β -galactosidase activity assay kit. The MTT assay was used to evaluate the cell viability.

Results Exposure of cells to acrylamide and H_2O_2 significantly reduced the cell viability, and Rutin significantly improved cell viability in cells treated by acrylamide ($P < 0.05$). Rutin also increased glutathione level in cells treated by acrylamide and H_2O_2 ($P < 0.05$). The rate of lipid peroxidation was significantly lower in the group treated by rutin and H_2O_2 than in the H_2O_2 group ($P < 0.05$). The β -galactosidase activity was increased in the H_2O_2 and acrylamide groups. The use of rutin with acrylamide significantly reduced the activity of β -galactosidase enzyme compared to the acrylamide group ($P < 0.05$).

Conclusion Oxidative stress may be an important mechanism in acrylamide-induced senescence in NIH3T3 cells. On the other hand, Rutin, as a potent antioxidant, can reduce cellular senescence by inhibition of oxidative damage.

Extended Abstract

1. Introduction

Cellular senescence is a phenomenon that occurs after cell maturation. Senescent cells have no DNA replication and cannot

proceed cell cycle while they are metabolically active [1]. According to various studies, the Reactive Oxygen Species (ROS) have an important role in the induction of cellular senescence [2]. Acrylamide is an industrial chemical compound that can be found in carbohydrate-rich foods during their preparation at high temperatures [3]. Recently, acrylamide's genotoxicity, immunotoxicity and carcinogenicity

* Corresponding Author:

Ehsan Zamani, PhD.

Address: Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

Tel: +98 (13) 33486470

E-Mail: zamani2246@gmail.com

have attracted attentions. Various studies have indicated that oxidative stress is as an important mechanism in acrylamide toxicity [3-5].

Rutin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-rhamnoglucoside) is a flavonoid with high radical scavenging activity and antioxidant capacity [6]. These properties are potentially beneficial in protecting the stability of the genome. However, few information is available on the protective effect of Rutin on cellular senescence. Therefore, this study aims to investigate the capability of acrylamide in the induction of oxidative cellular senescence, and examine the anti-oxidative properties of Rutin attenuating cellular senescence in embryonic fibroblast cell line NIH3T3.

2. Methods

In this experimental study, NIH3T3 cells were incubated at 37 °C under humid atmosphere containing 5% CO₂. After the third passage, the cells were seeded in culture plates and divided into following groups: control (Cells cultured in DMEM medium with 10% FBS, Pen/Strep and vehicle), positive control (cells exposed to 400 μM H₂O₂), acrylamide (cells treated with acrylamide 5 mM), Rutin + acrylamide (cells treated with 50 μM Rutin plus acrylamide), positive control + Rutin (cells treated with 50 μM Rutin plus H₂O₂). After cell treatment, MTT assay was used to evaluate the viability of the cells. Furthermore, senescence-associated β-galactosidase was evaluated by β-galactosidase staining kit and quantitative identification of β-galactosidase activity via ELISA kit (MyBioSource, CAT number: MBS703814). To assess the oxidative stress, lipid peroxidation and glutathione concentration were measured in cell suspensions' homogenates. Malondialdehyde (MDA), as an end product of lipid peroxidation, was calculated by using thiobarbituric acid. Moreover, DTNB reagent was used for measuring glutathione concentration. Finally, the statistical significance was determined using one-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test. The P<0.05 was considered as the significance level [7].

3. Results

Acrylamide and H₂O₂ significantly decreased cell viability in comparison with the control group (P< 0.001). Furthermore, Rutin increased the acrylamide-treated cells' viability at concentrations of 10, 25 and 50 μM (P< 0.05). At concentration above 50 μM, no any significant effect was reported. Hence, 50 μM concentration was selected as the most effective concentration of Rutin.

Staining of cells with β-galactosidase at pH=6 showed that acrylamide and H₂O₂ caused higher level of bluish-

green color compared to the control group. On the other hand, the cells treated with Rutin showed a lower level of bluish-green color. Similarly, both acrylamide and H₂O₂ groups revealed a significant increase in the level of β-galactosidase activity compared to control group evaluated by ELISA kit. Treatment of cells by Rutin significantly decreased β-galactosidase activity in acrylamide-treated cells (P<0.05). Overall, the results showed that Rutin inhibited acrylamide-induced cellular senescence.

After evaluation of oxidative stress parameters, an increased concentration of MDA was observed in cells treated by acrylamide and H₂O₂. Moreover, the amount of cellular glutathione in the acrylamide and H₂O₂ groups had a significant decrease compared to the control group (P<0.05). After treatment by Rutin, the Rutin + acrylamide group (compared to the acrylamide group) and the Rutin + H₂O₂ group (compared to the H₂O₂ group) showed a significantly higher concentration of cellular glutathione (P<0.05).

4. Conclusion

Acrylamide can induce cellular senescence via oxidative stress. Rutin, as a potent natural antioxidant, can efficiently decrease acrylamide-induced cellular senescence in NIH3T3 cell lines. Rutin may be effective in reducing the adverse effects of food impurities, such as acrylamide.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

All procedures in this study were confirmed by the Ethics Committee of Guilan University of Medical Sciences (Code: IR.GUMS.REC.1397.413). Ethical principles are fully observed in this article.

Funding

The present study received financial support from the Deputy for Research and Technology of Guilan University of Medical Sciences.

Authors' contributions

All authors had contribution in preparing this article. Designing the experiments: Ehsan Zamani and Mehdi Evazalipour; Designing the methods: Ehsan Zamani, Reza Jafari-Shakib and Mehdi Evazalipour; Implementing the research: Forough Aghajani Torshkooh, Saye Gholampour and Mehdi Evazalipour; Preparing the initial draft: Ehsan Zamani and Forough Aghajani Torshkooh; Revising and reviewing the draft: and Mehdi Evazalipour and Ehsan Zamani.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This study was extracted from Ms. Sayeh Gholampour's PhD thesis and supported by the research council of Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

مقاله پژوهشی

بررسی برون تن اثر محافظتی روتین بر فرایند پیری اکسیداتیو القا شده با آکریل آمید در سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش (NIH3T3)

مهدی عوضعلی پور^۱، فروغ آقاجانی ترشکوه^۲، رضا جعفری شکیب^۳، سایه غلامپور^۳، احسان زمانی^۳

۱. گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.
۲. گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.
۳. گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۵ شهریور ۱۴۰۰
تاریخ پذیرش: ۲۴ آذر ۱۴۰۰
تاریخ انتشار: ۱۱ دی ۱۴۰۰

زمینه: پیری یکی از عوامل مهم در بروز بیماری‌های مرتبط با سن می‌باشد که توسط عوامل مختلفی تسریع می‌شود. آکریل آمید به‌عنوان یک آلودگی غذایی می‌تواند طی فرایند تولید حرارتی مواد غذایی حاوی کربوهیدرات به وجود بیاید. اخیراً مطالعات نشان دادند آکریل آمید می‌تواند موجب بروز پیری سلولی شود. همچنین روتین یک فلاونوئید گیاهی می‌باشد که دارای اثرات آنتی‌اکسیدانتی قوی است.

هدف: در این مطالعه، اثر محافظتی روتین بر پیری اکسیداتیو القا شده توسط آکریل آمید مورد بررسی قرار گرفته است.

روش‌ها: برای انجام مطالعه از سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش (NIH3T3) استفاده شد که تحت تأثیر غلظت‌های مختلف آکریل آمید و H₂O₂ قرار گرفته است. برای ارزیابی میزان آسیب اکسیداتیو، غلظت مالون دی‌آلدهید و سطح گلوکوتائون مورد ارزیابی قرار گرفت. برای ارزیابی فرایند پیری، فعالیت بتاگالاکتوزیداز با رنگ‌آمیزی آنزیم و کیت سنجش فعالیت بتاگالاکتوزیداز بررسی شد. میزان بقای سلولی به روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: تماس با آکریل آمید و H₂O₂ موجب کاهش معنادار بقای سلولی شد که استفاده از روتین موجب افزایش بقای سلولی در گروه‌های تحت درمان با آکریل آمید شد (P<۰/۰۵). روتین به صورت معنادار موجب افزایش سطح گلوکوتائون در سلول‌های تحت درمان با آکریل آمید و H₂O₂ شد. میزان پراکسیداسیون لیپیدی به صورت معناداری در گروه تحت درمان با روتین و H₂O₂ نسبت به گروه H₂O₂ به تنهایی کمتر بود (P<۰/۰۵). میزان فعالیت بتاگالاکتوزیداز در گروه H₂O₂ و آکریل آمید افزایش داشت. استفاده از روتین به همراه آکریل آمید، میزان فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز را به‌طور معناداری نسبت به گروه آکریل آمید کاهش داد (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: براین اساس، استرس اکسیداتیو به‌عنوان یک مکانیسم مهم در القای پیری در سلول‌های فیبروبلاست (NIH3T3) می‌تواند مطرح باشد. از طرفی، روتین (آنتی‌اکسیدانت قوی) می‌تواند با مهار آسیب اکسیداتیو از پیری جلوگیری کند.

کلیدواژه‌ها:

پیری، روتین، آکریل آمید، استرس اکسیداتیو، فعالیت بتاگالاکتوزیداز، H₂O₂

مقدمه

گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) را در القای پیری سلولی نشان می‌دهد [۲، ۳]. آکریل آمید یک ترکیب شیمیایی صنعتی مورداستفاده در زمینه‌های مختلف مانند تهویه خاک، صنایع نساجی، کاغذ و لوازم آرایشی است [۴].

اخیراً، سطوح مختلف آکریل آمید در غذاهای دارای کربوهیدرات بالا که در دمای بالای ۱۲۰ درجه طبخ می‌شوند، گزارش شده است که توجه به بررسی مسمومیت و مسیره‌های

پس از تکامل و بلوغ سلول‌ها، پیری^۱ اتفاق می‌افتد. به این معنی که تقسیم سلول‌های بالغ عمدتاً به دلیل عدم وجود تکثیر DNA و تغییرات غیر معمول در بیان ژن متوقف می‌شود، در حالی که آن‌ها از نظر متابولیسمی فعال هستند [۱]. شواهدی وجود دارد که نقش کلیدی تولید داخل سلولی

2. ROS: Reactive Oxygen Species

1. Aging

* نویسنده مسئول:

احسان زمانی

نشانی: رشت، انتهای جاده لاکان، اتوبان فومن-سراوان، پردیس دانشگاهی علوم پزشکی گیلان، دانشکده داروسازی.

تلفن: +۹۸ ۳۳۴۸۶۴۷۰ (۱۳)

رایانامه: zamani2245@gmail.com

دارند. از سوی دیگر، فعالیت برخی پراکسیدازها^{۱۱} مانند روتین گلیکوزیداز^{۱۱} در شرایط استرس، سلول را از آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کند [۱۱]. مطالعات زیادی اثرات آنتی‌اکسیدانتی روتین را نشان داده‌اند [۱۳]. به‌عنوان مثال: مطالعات نشان می‌دهد روتین از طریق فعالیت آنتی‌اکسیدانتی و با تنظیم بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانت از قبیل پاراکسنز-۱^{۱۲} و گلوکوتایون-S-ترانسفراز^{۱۳} موجب بهبود سمیت کبدی در موش‌های ویستار با کلسترول بالا می‌شود [۱۴] در مطالعه‌ای دیگر روتین موجب کاهش استرس اکسیداتیو، آپوپتوز و التهاب ناشی از تتراکلرید کربن در موش می‌شود [۱۵]. همچنین مطالعات زیادی مؤید نقش مؤثر روتین (به علت اثرات آنتی‌اکسیدانتی) در جلوگیری از ایسکمیک^{۱۴} در بافت‌های مختلف می‌باشد [۱۶، ۱۷].

سلول‌های فیبروبلاست^{۱۵} جنینی موش را در تمام بافت‌های موجود در موش می‌توان مشاهده کرد. این سلول‌ها نقش مهمی در رشد و توسعه اندام‌ها دارند. بنابراین، در مطالعات برون‌تنی مربوط به پیری سلولی و نیز مطالعات بررسی چرخه سلول از سلول‌های فیبروبلاست به‌عنوان مدل استفاده می‌شود (۱۷). بر این اساس، مطالعه حاضر با هدف بررسی توانایی احتمالی آکريل امید در القا استرس اکسیداتیو و پیری سلولی و نیز برای بررسی اثرات روتین در کاهش پیری سلولی ناشی از آکريل امید در رده سلولی فیبروبلاست جنینی (NIH3T3) انجام شده است.

روش‌ها

مواد شیمیایی

روتین (سیگما، خلوص ۹۸) و آکريل امید (سیگما، ۸۸۸۷ A، خلوص ≤ 98) از شرکت شیمیایی سیگما (سنت لوئیس، ایالات متحده آمریکا) خریداری شد. تمامی مواد و معرف‌های دیگر استفاده شده در این مطالعه از درجه دارویی و یا HPLC شرکت مرک تهیه شد.

کشت سلولی

در این مطالعه آزمایشگاهی، سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش مورد استفاده قرار گرفت. این سلول‌ها به‌عنوان یک مدل مهم و کارا در بسیاری از مطالعات سم‌شناسی قابل استفاده می‌باشد [۱۷]. سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش رده سلولی (NIH3T3) از انستیتو پاستور ایران^{۱۶} تهیه شد. این سلول‌ها

بیماری‌زایی آن را افزایش داده است. از سوی دیگر، چندین مطالعه نشان داد آکريل امید می‌تواند باعث ایجاد سمیت عصبی، سمیت باروری، سمیت ژنتیکی، سمیت ایمنی و سرطان‌زایی در رده‌های سلولی یا مدل‌های حیوانی شود [۵]. چندین آزمایش از استرس اکسیداتیو به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های سمیت آکريل امید نام برده‌اند [۵، ۶].

عدم تعادل بین عوامل اکسیدکننده و آنتی‌اکسیدان ناشی از انتشار رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن فعال منجر به استرس اکسیداتیو و آسیب‌های ناشی از آن می‌شود [۷]. آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند آسیب اکسیداتیو را کاهش داده و از جهش‌زایی، سرطان‌زایی و پیری عمدتاً به دلیل فعالیت مهارکننده رادیکال جلوگیری کنند [۸].

به هر ماده‌ای که سبب مهار یا به تأخیر افتادن آسیب‌های اکسیداتیو در ملکول هدف باشد، آنتی‌اکسیدانت می‌گویند. بدن انسان دارای چندین مکانیسم برای مقابله با آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو می‌باشد [۹]. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که می‌توانند با مسدود کردن مسیرهای تشکیل رادیکال آزاد یا جلوگیری از آسیب رادیکال‌های آزاد از طریق چندین مکانیسم از اکسیداسیون جلوگیری کنند و یا آن را به تعویق اندازند [۱۰]. ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی مانند فلاونوئیدها^۱، اسیدهای فنولیک^۲، کاروتنوئیدها^۳، پلی‌ساکاریدها^۴، و توکوفرول‌ها^۵ با حذف رادیکال‌های آزاد نقش کاهش‌دهنده را بازی می‌کنند [۱۱]. بنابراین، نقش فیزیولوژیکی این ترکیبات، محافظت از اجزای سلولی در برابر آسیب واکنش‌های شیمیایی ناشی از رادیکال‌های آزاد می‌باشد [۱۰].

روتین (۷، ۵، ۴۰، ۳۰، ۳-پنتاهیدروکسی‌فلاون-۳-رامنوگلوکزید)^۱، یک فلاونول^۱ است که به وفور در گیاهانی از قبیل گندم سیاه، چای و سیب یافت می‌شود [۱۲]. روتین، فعالیت‌های دارویی زیادی از خود نشان می‌دهد، از جمله آن‌ها اثرات آنتی‌باکتریال، ضدتومور، ضدالتهاب، ضداسهال، ضدزخم، ضدموث‌انسیسته، محافظ عضله قلبی، بازکننده عروق و تعدیل‌کننده سیستم ایمنی و محافظت کبدی می‌باشند [۱۱]. در مطالعات مشاهده شده است نیمی از ذخایر روتین از لایه اپیدرم بالایی برگ گیاه گندم سیاه به دست می‌آید. غلظت روتین بلافاصله پس از تابش فرابنفش افزایش می‌یابد [۱۱]. این یافته نشان می‌دهد روتین نقش مهمی در زمان تابش فرابنفش دارد و این یکی از نشانه‌هایی است که می‌تواند ثابت کند فلاونوئیدها نقش محافظت از سلول در برابر تابش فرابنفش

10. Peroxidases
11. Rutin Glycosidase
12. Paraoxonase 1
13. Glutathione S-transferase
14. Ischemia Reperfusion
15. fibroblast
6. ATCC Number: CRL-1658

3. Flavonoids
4. Phenolic acids
5. Carotenoids
6. Polysaccharides
7. Tocopherol
8. 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-rhamnoglucoside
9. Flavonols

قابل تشخیص است. تشخیص این فعالیت وابسته به pH است و ارزیابی این فعالیت در pH6 انجام شده است [۲۲]. در این مطالعه، سلول‌ها در پلیت‌های ۶ خانه کشت داده شدند و بر طبق گروه‌هایی که قبلاً ذکر شد طبقه‌بندی شدند. پس از آن، سلول‌ها با استفاده از PBS دو بار شست‌شو داده شدند و سپس محلول تثبیت‌کننده (۲۰ درصد فرمالدئید^{۲۳} ۲ درصد گلو تار آلدئید^{۲۴}) به آن اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق انکوبه شدند. در مرحله بعد، محلول تثبیت‌کننده حذف شد و سلول‌ها دوبار با PBS شست‌شو داده شدند. سپس آن‌ها با رنگ آمیزی گالاتوزیداز رنگ آمیزی و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در طول شب (۱۲ تا ۱۶ ساعت) انکوبه شدند. سلول‌ها در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی 200x مورد بررسی قرار گرفتند. مشاهده رنگ آبی مایل به سبز تأییدکننده وجود سلول‌های پیر می‌باشد [۲۲].

شناسایی کمی فعالیت آنزیم بتاگالاتوزیداز مرتبط با پیری (SA-β-gal)

از کیت گالاتوزیداز مخصوص موش^{۲۵} برای تعیین فعالیت آنزیم بتاگالاتوزیداز در سلول‌های جنینی موش استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر استاندارد موجود در کیت با نمونه سوسپانسیون سلولی به هر چاهک اضافه شد و سپس به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از خارج کردن مایع از هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی بیوتینه اضافه شد. سپس انکوباسیون به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. چاهک‌ها تخلیه و شست‌شو شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر HRP-avidin (X1) به هر چاهک اضافه شد و به دنبال آن انکوباسیون دیگری به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس، دوباره مراحل تخلیه و شست‌شو انجام شد و ۹۰ میکرولیتر تترامتیل بنزیدین^{۲۶} به هر چاهک اضافه شد و آن‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در مکانی تاریک انکوبه شدند. در نهایت، ۵۰ میکرولیتر محلول توقف به هر چاهک اضافه شد و میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه خوانش میکروپلیت^{۲۷} خوانده شد.

اندازه گیری پارامترهای مرتبط با استرس اکسیداتیو

ارزیابی لیپید پراکسیداسیون

برای بررسی میزان آسیب اکسیداتیو به غشاهای لیپیدی،

در محیط کشت سلولی DMEM-HG^{۱۷} و انکوباتور با دمای ۳۷ درجه و CO₂ ۵ درصد تکثیر شدند. پس از سومین پاساژ، سلول‌های تکثیر یافته در فلاسک به پلیت‌های ۹۶ خانه (برای تست^{۱۸} MTT) و پلیت‌های ۶ خانه (برای سنجش بتاگالاتوزیداز^{۱۹} و استرس اکسیداتیو) منتقل و به ترتیب با تعداد ۱۰^۴ × ۲ و ۱۰^۵ × ۲ سلول کشت داده شدند. نمونه‌های آزمایشگاهی به صورت گروه‌های زیر طبقه‌بندی شدند:

گروه کنترل: سلول‌های NIH3T3 در محیط کشت DMEM-HG و دریافت‌کننده حلال (PBS) به همراه حداکثر ۱ درصد (DMSO)

گروه کنترل مثبت: H₂O₂ با غلظت ۴۰۰ میکرومولار^{۲۰} (به مدت ۲ ساعت) [۱۱]

گروه آکریل آمید: IC₅₀ آکریل آمید (به مدت ۲ ساعت) [۱۸]

گروه روتین + آکریل آمید: حداقل غلظت موثر (براساس پری تست و مقالات مشابه [۱۹، ۲۰]) روتین به همراه IC₅₀ آکریل آمید

گروه H₂O₂ + روتین: H₂O₂ به همراه حداقل غلظت موثر روتین.

ارزیابی سمیت سلولی با روش MTT

برای ارزیابی سمیت سلول‌های تحت درمان، از روش MTT استفاده شد. بدین منظور سلول‌ها با غلظت‌های مختلف روتین (۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند [۲۰]. تیمار سلول با آکریل آمید و H₂O₂ به مدت ۲ ساعت انجام شد. پس از انکوباسیون^{۲۱}، سلول‌ها دو بار با استفاده از PBS شست‌شو شدند. سپس محلول MTT اضافه شد و انکوباسیون مجدد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در مرحله بعد پلیت تخلیه و ۱۵۰ میکرولیتر محلول DMSO به هر چاهک اضافه شد. در نهایت میزان جذب نوری با دستگاه خوانش میکروپلیت^{۲۲} در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. قابلیت زنده ماندن تمام گروه‌های تحت تیمار در مقایسه با گروه کنترل (۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد) گزارش شد [۲۱].

ارزیابی میزان بروز فرایند پیری

شناسایی کیفی فعالیت آنزیم بتاگالاتوزیداز مرتبط با پیری (SA-β-gal)

فعالیت آنزیم بتاگالاتوزیداز فقط در سلول‌های پیر شده

23. Formaldehyde
24. Glutaraldehyde
25. MyBioSource, betaGAL kit – Cat number: MBS 703814
26. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
27. Epoch™ Microplate Spectrophotometer, BioteK, USA

17. DMEM-HG: Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose
18. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
19. β-galactosidase
20. micromolar
21. incubation
23. Epoch™ Microplate Spectrophotometer, BioteK, USA

اسپکتروفتومتر^{۳۳} در طول موج ۴۱۲ نانومتر خوانده شد.

تحلیل آماری

نتایج بر حسب میانگین \pm انحراف معیار با حداقل سه بار تکرار گزارش شد. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸ و تحلیل واریانس یک‌طرفه تجزیه و تحلیل در صورت معناداری اختلاف از آزمون تعقیبی توکی استفاده می‌شود. سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج ارزیابی سمیت سلولی

همان‌طور که در تصویر شماره ۲ نشان داده شده است، آکريل امید توانست به‌طور قابل توجهی زنده ماندن سلول‌ها را در مقایسه با گروه کنترل کاهش دهد ($P < 0.001$). روتین در همه غلظت‌ها زنده ماندن سلول‌های تحت درمان با آکريل امید را نسبت به گروه آکريل امید افزایش داد ($P < 0.05$). همان‌طور که اطلاعات نشان می‌دهد، H_2O_2 به عنوان کنترل مثبت نیز زنده ماندن سلول‌ها را به صورت معنادار نسبت به گروه کنترل کاهش داد ($P < 0.05$). بر اساس نتایج به‌دست آمده از MTT با توجه به این که بیشترین اثر محافظتی در غلظت ۵۰ میکرومولار روتین مشاهده شد، این غلظت به‌عنوان غلظت مؤثر در سایر تست‌ها مورد استفاده قرار گرفت (تصویر شماره ۱).

33. Cary 60 UV-Vis spectrophotometer, agilent technologies

غلظت محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی^{۲۸}، مالون‌دی‌آلدهید^{۲۹} از طریق روش تیوباربیتوریک اسید^{۳۰} مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش، سلول‌ها همگن و با ۸۰۰ میکرولیتر اسید تری کلرواستیک مخلوط شدند و با دور ۱۵۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ۱۵۰ میکرولیتر تیوباربیتوریک اسید^{۳۱} به مایع رویی اضافه شد و مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر آن-بوتانول به آن اضافه شد و در نهایت میزان جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانش میکروپلیت خوانده شد [۲۳].

اندازه‌گیری محتوای گلوتاتیون

تری پتید گلوتاتیون^{۳۲} یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدانت‌های ذاتی سلول‌ها است. چنانچه به هر دلیلی سطح آن در سلول کاهش یابد، نشان‌دهنده بروز آسیب استرس اکسیداتیو در سلول است [۲۳]. در این مطالعه، برای اندازه‌گیری غلظت گلوتاتیون سلولی، ابتدا سلول‌ها با استفاده از یک هموژنایزر مکانیکی شیشه‌ای همگن شدند. هموژن سلولی با بافر Tris-EDTA مخلوط شد و به آن DTNB افزوده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق در مکانی تاریک انکوبه شد. سپس سانتریفیوژ در دور ۳۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد و جذب مایع رویی با دستگاه

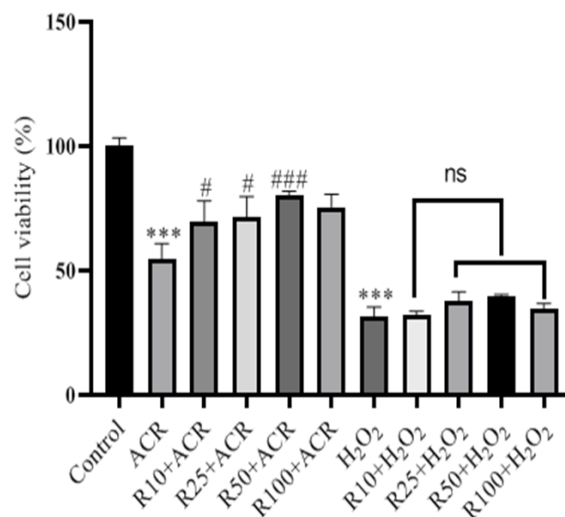
28. Lipid peroxidation

29. MDA

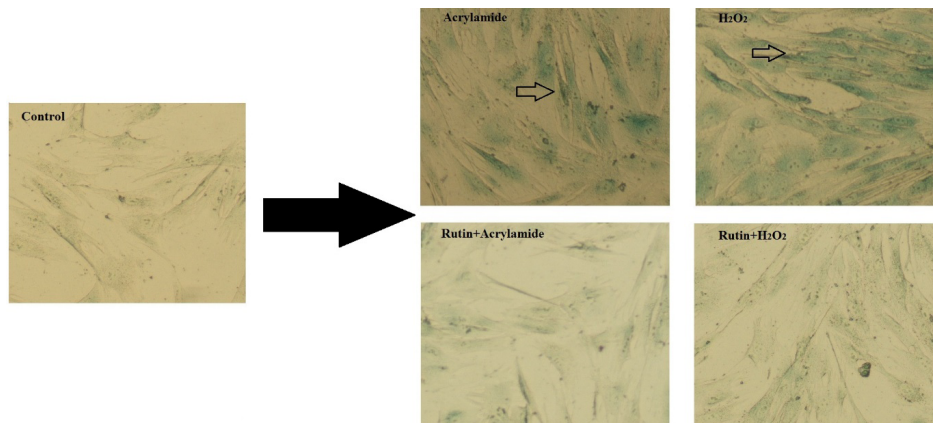
30. Thiobarbituric acid

31. TBA

32. Glutathione



تصویر ۱: نمودار بررسی اثر محافظتی روتین در سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش در تماس با آکريل امید و H_2O_2 داده‌ها به صورت انحراف معیار \pm میانگین بیان شده‌اند. *** اختلاف معنادار با گروه کنترل ($P < 0.001$). # اختلاف معنادار با گروه آکريل امید ($P < 0.05$). ### اختلاف معنادار با گروه آکريل امید ($P < 0.001$). آن‌اس: غیر معنادار. ACR: آکريل امید (۵ میلی مولار). R 10: روتین با غلظت ۱۰ میکرومولار. R 25: روتین با غلظت ۲۵ میکرومولار. R 50: روتین با غلظت ۵۰ میکرومولار. ۱۰۰: روتین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار.



مجله دانشکده علوم پزشکی گیلان

تصویر ۲. رنگ آمیزی آنزیم بتا گالاکتوزیداز در سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش در pH6. (بزرگنمایی: $\times 400$) فلش‌های توخالی نشان‌دهنده فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز در سلول‌های دچار پیری در گروه‌های تحت تیمار با آکریل آمید+ H_2O_2 است.

نتایج ارزیابی میزان بروز فرایند پیری

نتایج ارزیابی کیفی فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری ($SA-\beta-gal$)

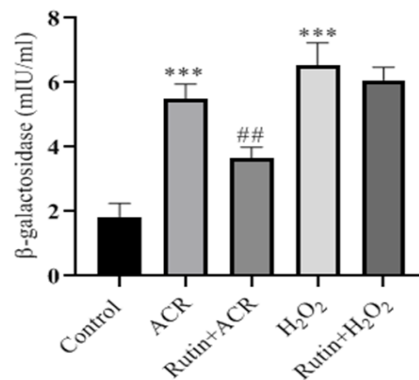
همان‌طور که گفته شد فعالیت آنزیم بتا گالاکتوزیداز یکی از بیواندیکاتورهای $SA-\beta-gal$ مهم در سنجش میزان پیری سلول‌ها می‌باشد و میزان آن در سلول‌های پیر شده، افزایش می‌یابد. به دنبال بررسی کیفی سلول‌ها با میکروسکوپ نوری و همان‌طور که در تصویر شماره ۱ مشخص شده است، تجمع بیشتر رنگ سبز-آبی در سلول‌های تحت درمان با آکریل آمید و H_2O_2 (مشخص شده با فلش توخالی) در مقایسه با گروه کنترل مشاهده می‌شود که نشانگر افزایش در سطح فعالیت بتا گالاکتوزیداز می‌باشد. از طرف دیگر، تیمار سلول‌ها با روتین، موجب کاهش سطح فعالیت گالاکتوزیداز و در نتیجه کاهش تجمع رنگ شده است که این

تغییر در گروه‌های روتین+آکریل آمید و روتین+ H_2O_2 قابل مشاهده می‌باشد (تصویر شماره ۲).

نتایج ارزیابی فعالیت کمی آنزیم بتاگالاکتوزیداز مرتبط با پیری ($SA-\beta-gal$)

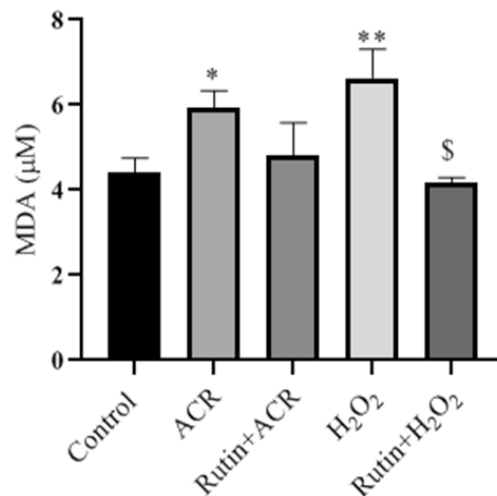
شناسایی کمی فعالیت بتا گالاکتوزیداز در گروه‌های آزمایشی مختلف در نمودار تصویر شماره ۳ نشان داده شده است. بررسی فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز نشان داد گروه آکریل آمید و H_2O_2 دارای اختلاف معنادار با گروه کنترل ($P < 0.05$) است که نشان‌دهنده اثر القایی آن در فرایند پیری سلولی می‌باشد. خوشبختانه تیمار سلول‌ها با روتین (در گروه روتین+آکریل آمید) به شکل چشمگیری این فعالیت را نسبت به گروه تحت تیمار با آکریل آمید به تنهایی کاهش داد ($P < 0.05$) و بیانگر این موضوع است که روتین می‌تواند در فرایند پیری اثر محافظتی داشته باشد (تصویر شماره ۳).

34. Bioindicators



مجله دانشکده علوم پزشکی گیلان

تصویر ۳. میزان میزان فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز در سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش در گروه‌های مورد مطالعه. داده‌ها به صورت انحراف معیار میانگین بیان شده‌اند. *** اختلاف معنادار با گروه کنترل ($P < 0.001$). ## اختلاف معنادار با گروه آکریل آمید ($P < 0.01$). ACR: آکریل آمید (۵ میلی مولار). روتین: با غلظت ۵۰ میکرو مولار.



مجله دانشگاه علوم پزشکی کیلان

تصویر ۴. نمودار بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدی در سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش در گروه‌های مورد مطالعه. داده‌ها به صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شده‌اند. * اختلاف معنادار با گروه کنترل ($P < 0/05$). ** اختلاف معنادار با گروه کنترل ($P < 0/01$). § اختلاف معنادار با گروه در تماس با H_2O_2 ($P < 0/05$). ACR: آکریل آمید (۵ میلی مولار) روتین: با غلظت ۵۰ میکرو مولار.

نتایج اندازه‌گیری پارامترهای استرس اکسیداتیو

به تنهایی و H_2O_2 به تنهایی بود ($P < 0/05$) (تصویر شماره ۴).

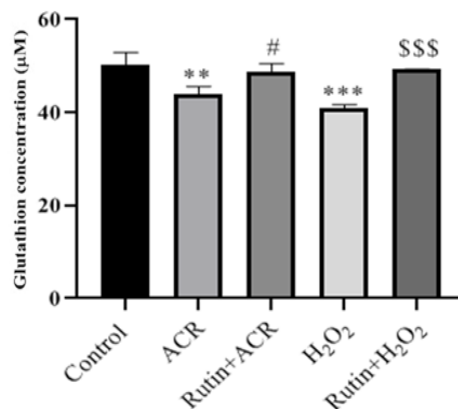
نتایج آزمایش لیپید پراکسیداسیون

نتایج اندازه‌گیری محتوای گلووتاتیون

یکی دیگر از پارامترهای مورد ارزیابی در این مطالعه سطح گلووتاتیون سلولی در سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش بود.

با توجه به تصویر شماره ۵، یافته‌ها نشان می‌دهد گروه آکریل آمید و گروه H_2O_2 به صورت معنادار ($P < 0/05$)، سطح گلووتاتیون کمتری را نسبت به گروه کنترل دارد. استفاده از روتین + آکریل آمید نسبت به گروه آکریل آمید به‌طور چشمگیری موجب بهبود این آسیب شد و سطح گلووتاتیون بالاتری را موجب شد ($P > 0/05$). مشابه این اتفاق در گروه‌های تحت درمان با H_2O_2

یکی از پارامترهای بررسی استرس اکسیداتیو در این مطالعه بررسی میزان لیپید پراکسیداسیون در سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش بعد از تماس با آکریل آمید می‌باشد. براساس تصویر شماره ۴، با اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدهید که محصول نهایی لیپید پراکسیداسیون می‌باشد، مشخص شد تماس با آکریل آمید و H_2O_2 موجب افزایش MDA^+ در سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش می‌شود. در گروه‌های روتین + آکریل آمید و روتین + H_2O_2 میزان MDA به طور معناداری کمتر از گروه آکریل آمید



مجله دانشگاه علوم پزشکی کیلان

تصویر ۵. نمودار بررسی سطح گلووتاتیون در سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش در گروه‌های مورد مطالعه داده‌ها به صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شده‌اند. ** اختلاف معنادار با گروه کنترل ($P < 0/01$). *** اختلاف معنادار با گروه کنترل ($P < 0/001$). # اختلاف معنادار با گروه آکریل آمید ($P < 0/05$). SSS اختلاف معنادار با گروه در تماس با H_2O_2 ($P < 0/001$). روتین: با غلظت ۵۰ میکرو مولار؛ ACR آکریل آمید (۵ میلی مولار).

روتین + H₂O₂ مشاهده شد (P < ۰/۰۵) (تصویر شماره ۵).

بحث و نتیجه گیری

پیری یک فرایند ذاتی و پیشرو است که همراه با تجمع تدریجی آسیب‌های مختلف و کاهش کارایی عملکردی و هموستاز در سلول‌ها و بافت‌ها در طول زمان است [۲۴]. پیری سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو یک حالت پایدار توقف چرخه سلولی است که در تکثیر سلول‌ها به‌عنوان پاسخی به شرایط استرس‌زا اتفاق می‌افتد. در سلول‌های پیر شده توقف تقسیم سلولی، مقاومت در آپوپتوز و اصلاح الگوی بیان ژن دیده می‌شود [۲۵]. این مطالعه نشان داد آکريل امید یک القاکننده برون‌زای پیری سلولی می‌باشد که این اتفاق از طریق بررسی کمی و کیفی فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز ارزیابی شد. همچنین بر اساس این مطالعه، استرس اکسیداتیو به‌عنوان یک مکانیسم مهم در القای پیری در سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش NIH3T3 مطرح شد. از طرف دیگر، مشخص شد روتین (یک آنتی‌اکسیدانت قوی) می‌تواند با مهار آسیب اکسیداتیو پیری، از پیری جلوگیری کند.

در بسیاری از مطالعات پیری سلولی در چندین رده سلولی مورد تحقیق قرار گرفته است. فعالیت بتا گالاکتوزیداز در سلول‌های نامیرا مانند سلول‌های سرطانی غیر قابل تشخیص است مگر اینکه این سلول‌ها برای سنجش پیری با روش‌های ژنتیکی یا شیمیایی دستکاری شوند [۲۱، ۲۲]. فیبروبلاست‌های جنینی برای ارزیابی پیری سلولی مناسب هستند، زیرا آن‌ها در همه اندام‌های حیوانات در دسترس هستند و به‌عنوان یک مدل در بررسی‌های مربوط به پیری سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۲۲]. پیری یک فرایند پیشرو است که همراه با تجمع تدریجی آسیب‌های مختلف، کاهش کیفیت عملکرد و هموستاز سلول‌ها و بافت‌ها در طول زمان است [۲۶، ۲۷]. پیری سلولی نقش کلیدی در پیری و بیماری‌های مربوط به سن دارد [۲۸]. اندازه‌گیری آنزیم بتاگالاکتوزیداز در پیری از زیست‌نشانه‌های ۲۵ مهم برای سنجش پیری در سلول‌های پستانداران می‌باشد [۲۹]. آنزیم بتاگالاکتوزیداز در سلول‌های دچار پیری شده ۳۶ در pH ۶ فعال می‌باشد [۳۰]. در مطالعات برون‌تن و درون‌تن، روش SA-β-gal به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان زیست‌نشانه مهم در تشخیص پیری سلولی مورد استفاده قرار گرفته است [۳۱]. در مطالعه حاضر، فعالیت بتاگالاکتوزیداز با استفاده از روش‌های کمی و کیفی اندازه‌گیری شد [۲۲]. این نتایج مشابه مطالعه قبلی هستند که نشان داد آکريل امید فعالیت گالاکتوزیداز و القا و پیری ۳۷ در سلول‌های اندوتلیال رگ ناف انسان ۳۸ را افزایش می‌دهد [۳۲]. در این مطالعه نیز فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز در سلول‌های تیمار

شده با آکريل امید و H₂O₂ افزایش یافت. همچنین این دو گروه بیشترین و گروه‌های کنترل و گروه‌های تحت درمان با روتین کمترین میزان رنگ‌پذیری را داشتند.

در حال حاضر، عوامل زیادی در رابطه با بروز فرآیند پیری سلولی مطرح است که از مهم‌ترین آن می‌توان به استرس اکسیداتیو اشاره کرد. گونه‌ی فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد با ایجاد تغییرات در بیان یک سری ژن‌ها و مسیرهای هدایت پیام منجر به پیری سلول می‌شوند. بنابراین استرس اکسیداتیو نقش مهمی در بروز پدیده پیری ایفا می‌کند [۲۳]. میتوکندری‌ها به‌عنوان یکی از مهم‌ترین منابع تولید رادیکال‌های آزاد می‌باشند و به آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو نیز بسیار حساس می‌باشند [۳۴]. مطالعات نشان می‌دهند آسیب اکسیداتیو به میتوکندری‌ها موجب القای پیری سلولی ۳۹ و توقف تکثیر سلولی شده و نقش مهمی در بروز پیری سلولی دارد [۳۴، ۳۵]. در این مطالعه پارامترهای آسیب اکسیداتیو از قبیل میزان لیپید پراکسیداسیون و سطح گلوکاتاتیون مورد ارزیابی قرار گرفت. در یک مطالعه مشخص شد رادیکال‌های آزاد با افزایش سطح مالون دی‌آلدهید نقش مهمی در پیری مغز در مغز موش‌های مسن دارند [۳۶]. این مطالعه نشان داد آکريل امید می‌تواند سطح لیپید پراکسیداسیون را افزایش دهد که به خواص القاکنندگی استرس اکسیداتیو این ترکیب نسبت داده می‌شود [۳۷، ۳۸]. درمان با روتین به‌طور مؤثر سطح لیپید پراکسیداسیون در گروه‌های روتین+ آکريل امید و روتین+ H₂O₂ را کاهش داد که نشان‌دهنده نقش آنتی‌اکسیدانتی روتین در پیشگیری از فرایند پیری ناشی از آکريل امید می‌باشد.

بر اساس مطالعه ساستر ۴۰ و همکاران، غلظت گلوکاتاتیون در سلول‌های دچار پیری کاهش می‌یابد [۳۹]. موجودات مانند پشه، مگس خانگی بالغ، مگس میوه، موش، موش صحرایی و انسان‌ها تنها چند نمونه از موجوداتی هستند که در آن‌ها سطح گلوکاتاتیون به صورت وابسته به سن کاهش می‌یابد [۴۰]. یک رابطه منفی بین غلظت گلوکاتاتیون در مایع مغزی نخاعی و سن مشاهده شده است [۴۱] که نشان‌دهنده نقش کلیدی سطوح گلوکاتاتیون در روند پیری است. در این مطالعه، گروه‌های سلولی تحت تیمار با آکريل امید و H₂O₂ هر دو کاهش سطح گلوکاتاتیون را نشان دادند که با سایر مطالعات مشابه موافق است [۴۰، ۴۱]. به‌عنوان مثال، مطالعه‌ای روی عملکرد ایمنی موش‌ها گزارش شد که آکريل امید توانست سمیت ایمنی را از طریق کاهش غلظت گلوکاتاتیون (و افزایش پراکسیداسیون لیپید) در طحال موش‌ها موجب شود [۴۲]. نقش استرس اکسیداتیو در سمیت ناشی از آکريل امید در سایر مطالعات ثابت شده است [۳۷، ۳۸، ۴۳].

اثرات آنتی‌اکسیدانتی روتین در مقالات مختلف تأیید شده

35. Biomarker
36. Senescent Cells
37. Senescence
38. HUVECs

39. Cell Senescence
40. Sastre

تشکر و قدردانی

این پژوهش به‌عنوان بخشی از طرح پایان‌نامه دکترای خانم سایه غلامپور و با حمایت معاونت تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی گیلان انجام شده است که از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گیلان تشکر می‌کنیم.

است و با توجه به داشتن خاصیت جاروب‌کنندگی رادیکال‌های آزاد می‌تواند رادیکال‌های آزاد را خنثی کرده و از اثرات مضر استرس اکسیداتیو در بدن بکاهد [۱۳، ۴۴]. در این مطالعه، نشان داده شد روتین با کاهش لیپید پراکسیداسیون و افزایش غلظت گلوکوتایون در سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش، نقش مهمی در حفاظت علیه پیری ناشی از آکریل آمید دارد. روتین یک محصول طبیعی با سابقه اثبات شده از تجویز ایمن برای انسان می‌باشد. بنابراین، می‌تواند به‌عنوان یک جایگزین امیدوارکننده برای درمان بالینی در مشکلاتی از قبیل پیری در نظر گرفته شود.

این مطالعه نشان داد آکریل آمید می‌تواند باعث پیری در سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش (NIH3T3) شود. استرس اکسیداتیو نقش مهمی در شروع پیری سلول ایفا کرد. علاوه بر این، نتایج نشان داد روتین می‌تواند به‌طور مؤثر پیری سلول را در سلول NIH3T3 از طریق کاهش استرس اکسیداتیو کاهش دهد، زیرا روتین یک ترکیب طبیعی با ایمنی تأیید شده در انسان است. اثرات مفید روتین ممکن است در کاهش عوارض جانبی آلودگی‌های غذایی مانند سمیت آکریل آمید در انسان مفید باشد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

در این مطالعه کلیه اصول و استانداردهای کمیته ملی اخلاق رعایت شده است. این طرح در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی گیلان با کد IR.GUMS.REC.1397.413 به ثبت رسیده است.

حامی مالی

پژوهش حاضر با حمایت معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گیلان انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان حاضر استحقاق کافی برای حضور در این مقاله را داشته و در محتوای ارائه شده مسئولیت داشتند. طراحی تحقیق: احسان زمانی و مهدی عوضعلی‌پور؛ اجرای روش‌های احسان زمانی و رضا جعفری شکیب و مهدی عوضعلی‌پور؛ اجرای روش کار: فروغ آقاجانی ترشکوه و سایه غلامپور؛ نگارش پیش نویس اولیه: احسان زمانی و فروغ آقاجانی ترشکوه؛ ویرایش و اصلاح مقاله: مهدی عوضعلی‌پور و احسان زمانی.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی در این پژوهش نداشته‌اند.

References

- [1] Trougakos IP, Saridaki A, Panayotou G, Gonos ES. Identification of differentially expressed proteins in senescent human embryonic fibroblasts. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2006; 127(1):88-92. [DOI:10.1016/j.mad.2005.08.009] [PMID]
- [2] Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, et al. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science*. 2005; 309(5733):481-4. [DOI:10.1126/science.1112125] [PMID]
- [3] Lu T, Finkel T. Free radicals and senescence. *Experimental Cell Research*. 2008; 314(9):1918-22. [DOI:10.1016/j.yexcr.2008.01.011] [PMID] [PMCID]
- [4] Friedman M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51(16):4504-26. [DOI:10.1021/jf030204+] [PMID]
- [5] Cao J, Liu Y, Jia L, Jiang LP, Geng CY, Yao XF, et al. Curcumin attenuates acrylamide-induced cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells by ROS scavenging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 56(24):12059-63. [DOI:10.1021/jf8026827] [PMID]
- [6] Jiang L, Cao J, An Y, Geng C, Qu S, Jiang L, et al. Genotoxicity of acrylamide in human hepatoma G2 (HepG2) cells. *Toxicology in Vitro*. 2007; 21(8):1486-92. [DOI:10.1016/j.tiv.2007.06.011] [PMID]
- [7] Jahani M, Shokrzadeh M, Vafaei-Pour Z, Zamani E, Shaki F. Potential role of cerium oxide nanoparticles for attenuation of diabetic nephropathy by inhibition of oxidative damage. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2016; 11(4):226-34. [DOI:10.3923/ajava.2016.226.234]
- [8] Coccimiglio J, Alipour M, Jiang ZH, Gottardo C, Suntres Z. Antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activities of the ethanolic *Origanum vulgare* extract and its major constituents. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016; 2016:1404505. [DOI:10.1155/2016/1404505] [PMID] [PMCID]
- [9] Shahidi F, Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*. 2015; 18(Pt B):757-81. [DOI:10.1016/j.jff.2015.01.047]
- [10] Young IS, Woodside JV. Antioxidant in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*. 2001; 54(3):176-86. [DOI:10.1136/jcp.54.3.176] [PMID] [PMCID]
- [11] Ozsoy N, Candoken E, Akev N. Implications for degenerative disorders: Antioxidative activity, total phenols, flavonoids, ascorbic acid, β -carotene and β -tocopherol in *Aloe vera*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2009; 2:315091. [DOI:10.4161/oxim.2.2.8493] [PMID] [PMCID]
- [12] Korkmaz A, Kolankaya D. Protective effect of rutin on the ischemia/reperfusion induced damage in rat kidney. *Journal of Surgical Research*. 2010; 164(2):309-15. [DOI:10.1016/j.jss.2009.03.022] [PMID]
- [13] Enogieru AB, Haylett W, Hiss DC, Bardien S, Ekpo OE. Rutin as a potent antioxidant: Implications for neurodegenerative disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018; 2018:6241017. [DOI:10.1155/2018/6241017] [PMID] [PMCID]
- [14] Al-Rejaie SS, Aleisa AM, Sayed-Ahmed MM, Al-Shabanah OA, Abuhashish HM, Ahmed MM, et al. Protective effect of rutin on the antioxidant genes expression in hypercholesterolemic male Westar rat. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2013; 13:136. [DOI:10.1186/1472-6882-13-136] [PMID] [PMCID]
- [15] Ma JQ, Liu CM, Yang W. Protective effect of rutin against carbon tetrachloride-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in mouse kidney associated with the ceramide, MAPKs, p53 and calpain activities. *Chemico-Biological Interactions*. 2018; 286:26-33. [DOI:10.1016/j.cbi.2018.03.003] [PMID]
- [16] Wei SM, Yan ZZ, Zhou J. Protective effect of rutin on testicular ischemia-reperfusion injury. *Journal of Pediatric Surgery*. 2011; 46(7):1419-24. [DOI:10.1016/j.jpedsurg.2010.09.044] [PMID]
- [17] Evazalipour M, Safarzadeh Kozani P, Safarzadeh Kozani P, Shabani S, Rezaei Soufi B, Zamani E. Acrylamide induced oxidative cellular senescence in embryonic fibroblast cell line (NIH3T3): A protection by carvacrol. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2021; 16(4):e109399. [DOI:10.5812/jjnpp.109399]
- [18] Sahinturk V, Kacar S, Veyselova D, Kutlu HM. Acrylamide exerts its cytotoxicity in NIH/3T3 fibroblast cells by apoptosis. *Toxicol and Industrial Health*. 2018; 34(7):481-9. [DOI:10.1177/0748233718769806] [PMID]
- [19] Magalingam KB, Radhakrishnan A, Haleagrahara N. Protective effects of quercetin glycosides, rutin, and isoquercitrin against 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced neurotoxicity in rat pheochromocytoma (PC-12) cells. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2016; 29(1):30-9. [DOI:10.1177/0394632015613039] [PMID] [PMCID]
- [20] Patil SL, Swaroop K, Kakde N, Somashekarappa HM. In vitro protective effect of rutin and quercetin against radiation-induced genetic damage in human lymphocytes. *Indian Journal of Nuclear Medicine*. 2017; 32(4):289-95. [DOI:10.4103/ijnm.ijnm_30_17] [PMID] [PMCID]
- [21] Yoon S, Han S, Jeon KJ, Kwon S. Effects of collected road dusts on cell viability, inflammatory response, and oxidative stress in cultured human corneal epithelial cells. *Toxicology Letters*. 2018; 284:152-60. [DOI:10.1016/j.toxlet.2017.12.012] [PMID]
- [22] Baeeri M, Mohammadi-Nejad S, Rahimifard M, Navaei-Nigieh M, Moeini-Nodeh S, Khorasani R, et al. Molecular and biochemical evidence on the protective role of ellagic acid and silybin against oxidative stress-induced cellular aging. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2018; 441(1):21-33. [DOI:10.1007/s11010-017-3172-0] [PMID]
- [23] Zamani E, Mohammadbagheri M, Fallah M, Shaki F. Atorvastatin attenuates ethanol-induced hepatotoxicity via antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2017; 12(4):315-21. [DOI:10.4103/1735-5362.212049] [PMID] [PMCID]
- [24] Dorman HD, Surai P, Deans SG. In vitro antioxidant activity of a number of plant essential oils and phytoconstituents. *Journal of Essential Oil Research*. 2000; 12(2):241-8. [DOI:10.1080/10412905.2000.9699508]

- [25] Campisi J, Di Fagagna FDA. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007; 8(9):729-40. [DOI:10.1038/nrm2233] [PMID]
- [26] Romano AD, Serviddio G, de Matthaeis A, Bellanti F, Vendemiale G. Oxidative stress and aging. *Journal of Nephrology*. 2010; 23 Suppl 15:S29-36. [PMID]
- [27] Viña J, Borrás C, Miquel J. Theories of ageing. *IUBMB Life*. 2007; 59(4-5):249-54. [DOI:10.1080/15216540601178067] [PMID]
- [28] van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature*. 2014; 509(7501):439-46. [DOI:10.1038/nature13193] [PMID] [PMCID]
- [29] Debacq-Chainiaux F, Borlon C, Pascal T, Royer V, Eliaers F, Ninane N, et al. Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF- β 1 signaling pathway. *Journal of Cell Science*. 2005; 118(4):743-58. [DOI:10.1242/jcs.01651] [PMID]
- [30] Llana-Ruiz-Cabello M, Gutiérrez-Praena D, Puerto M, Pichardo S, Jos Á, Cameán AM. In vitro pro-oxidant/antioxidant role of carvacrol, thymol and their mixture in the intestinal Caco-2 cell line. *Toxicology in Vitro*. 2015; 29(4):647-56. [DOI:10.1016/j.tiv.2015.02.006] [PMID]
- [31] Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology*. 2004; 5(1):1-10. [DOI:10.1023/B:BGEN.0000017682.96395.10] [PMID]
- [32] Sellier C, Boulanger E, Maladry F, Tessier FJ, Lorenzi R, Nevière R, et al. Acrylamide induces accelerated endothelial aging in a human cell model. *Food and Chemical Toxicology*. 2015; 83:140-5. [DOI:10.1016/j.fct.2015.05.021] [PMID]
- [33] Kim DB, Shin GH, Kim JM, Kim YH, Lee JH, Lee JS, et al. Antioxidant and anti-ageing activities of citrus-based juice mixture. *Food Chemistry*. 2016; 194:920-7. [DOI:10.1016/j.foodchem.2015.08.094] [PMID]
- [34] Cui H, Kong Y, Zhang H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Journal of Signal Transduction*. 2012; 2012:646354. [DOI:10.1155/2012/646354] [PMID] [PMCID]
- [35] Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*. 2018; 13:757-72. [DOI:10.2147/CIA.S158513] [PMID] [PMCID]
- [36] Leutner S, Eckert A, Müller W. ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. *Journal of Neural Transmission*. 2001; 108(8-9):955-67. [DOI:10.1007/s007020170015] [PMID]
- [37] Elblehi SS, El Euony OI, El-Sayed YS. Apoptosis and astrogliosis perturbations and expression of regulatory inflammatory factors and neurotransmitters in acrylamide-induced neurotoxicity under ω 3 fatty acids protection in rats. *NeuroToxicology*. 2020; 76:44-57. [DOI:10.1016/j.neuro.2019.10.004] [PMID]
- [38] Yang Y, Zhang L, Jiang G, Lei A, Yu Q, Xie J, et al. Evaluation of the protective effects of *Ganoderma atrum* polysaccharide on acrylamide-induced injury in small intestine tissue of rats. *Food & Function*. 2019; 10(9):5863-72. [DOI:10.1039/C9FO01452G] [PMID]
- [39] Sastre J, Pallardó FV, Viña J. Glutathione, oxidative stress and aging. *Age*. 1996; 19(4):129-39. [DOI:10.1007/BF02434082]
- [40] Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*. 1996; 273(5271):59-63. [DOI:10.1126/science.273.5271.59] [PMID]
- [41] Cudkovicz M, Sexton P, Ellis T, Hayden D, Gwilt P, Whalen J, et al. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of pro-cysteine in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 1999; 52(7):1492-4. [DOI:10.1212/WNL.52.7.1492] [PMID]
- [42] Zamani E, Shokrzadeh M, Ziar A, Abedian-Kenari S, Shaki F. Acrylamide attenuated immune tissues' function via induction of apoptosis and oxidative stress: Protection by L-carnitine. *Human & Experimental Toxicology*. 2018; 37(8):859-69. [DOI:10.1177/0960327117741753] [PMID]
- [43] Manouchehrabadi M, Farhadi M, Azizi Z, Torkaman-Boutorabi A. Carvacrol protects against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in in vivo and in vitro models of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*. 2020; 37(1):156-70. [DOI:10.1007/s12640-019-00088-w] [PMID]
- [44] Yang J, Guo J, Yuan J. In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT-Food Science and Technology*. 2008; 41(6):1060-6. [DOI:10.1016/j.lwt.2007.06.010]

This Page Intentionally Left Blank
