

The Effect of Silybinin on the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Integrin-linked kinase (ILK) in the Olfactory Ensheathing Cells under Normal and High Glucose Conditions

Saeedeh Rashidi¹, Monireh Azizi², Naser Abbasi³, Somayeh Heidarizadi⁴

1.MSc of Anatomy, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran. ORCID ID: 0000-0002- 6765- 4696

2.Associate Professor of Anatomy, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran, (Corresponding Author), Tel: 084-32235716, Email: azizi-m@medilam.ac.ir. ORCID ID: 0000-0003-3090-867X

3.Associate Professor of pharmacology, Biotechnology and Medicinal Plants Research Center, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran. ORCID ID: 0000-0003-4457-3997

4.MSc of Anatomy, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran. ORCID ID: 0000-0001-8934-7091

ABSTRACT

Background and Aim: Diabetes is a metabolic disease with high blood sugar levels. Olfactory ensheathing cells (OECs) are able to express various growth factors and integrin-linked kinase (ILK) plays an important role in regulating various processes of cells. In this study, we investigated the effects of silybinin on the expression of vascular-endothelial growth factor (VEGF) and ILK under normal and high glucose conditions in OECs.

Materials and Methods: In this study, OECs were extracted from the olfactory mucosa of neonatal rats and cultured. Low (1,5M) and high (50,75 μ M) concentrations of silybinin were added to the cell culture media under normal and high glucose conditions. At the end of the study, we measured the expression of VEGF and ILK proteins using western blot technique. Data were analyzed by ANOVA test.

Results: Under high glucose conditions, low concentrations of silybinin maintained expression and at high concentrations silybinin caused a dose-dependent decrease in ILK significantly. However, under high glucose conditions, low concentrations of silybinin significantly decreased expression of VEGF but high concentrations of silybinin caused a significant dose- dependent increase in VEGF expression.

Conclusion: High glucose condition increased ILK and VEGF expression in the OECs, and treatment with lower concentrations of silybinin maintained ILK expression and decreased VEGF expression. Therefore, it seems that lower concentrations of silybinin can be effective in protecting cells from cytotoxicity due to diabetes hyperglycemia by stabilizing ILK and reducing VEGF levels.

Keywords: Silybinin, Integrin-link kinase, Growth factors, Olfactory ensheathing cells, High glucose

Received: June 3, 2021

Accepted: Oct 26, 2021

How to cite the article: Saeedeh Rashidi, Monireh Azizi, Naser Abbasi, Somayeh Heidarizadi. The Effect of Silybinin on the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Integrin-linked kinase (ILK) in the Olfactory Ensheathing Cells under Normal and High Glucose Conditions. *JKU* 2022;27(5):1-9.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

تأثیر سیلینین بر میزان بیان فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و کیناز وابسته به اینتگرین (ILK) در سلول‌های غلاف کننده بویایی در شرایط گلوکز نرمال و بالا

سعیده رشیدی¹، منیره عزیزی²، ناصر عباسی³، سمیه حیدری زاده⁴

1. کارشناسی ارشد علوم تشریح، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران. کد ارکید: 6765-0002-0000-4696
2. دانشیار علوم تشریح، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران. (مؤلف مسئول)، تلفن ثابت: 32235716-084، پست الکترونیک: azizi.moaz@gmail.com. کد ارکید: 867-3090-0003-0000 x
3. دانشیار فارماکولوژی، مرکز تحقیقات زیست شناسی و گیاهان دارویی، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران. کد ارکید: 3997-4457-0003-0000
4. کارشناسی ارشد علوم تشریح، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران. کد ارکید: 8934-0001-0000-7091

چکیده

زمینه و هدف: دیابت یک بیماری متابولیک با افزایش سطح قند خون می‌باشد. سلول‌های غلاف کننده بویایی (OECs) قادر به بیان انواع فاکتورهای رشد می‌باشند و کیناز وابسته به اینتگرین (ILK) نیز در تنظیم فرآیندهای مختلف سلول نقش دارد. لذا در این مطالعه اثرات غلظت‌های پایین و بالای سیلینین بر میزان بیان فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و ILK در شرایط گلوکز نرمال و بالا در سلول‌های OEC مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه سلول‌های OEC از مخاط بویایی نوزاد موش صحرایی استخراج و کشت داده شد. غلظت‌های پایین ($15 \mu\text{M}$) و بالا (50 و $75 \mu\text{M}$) سیلینین در شرایط گلوکز نرمال و بالا به محیط کشت سلول‌ها اضافه گردید. در پایان مطالعه، میزان بیان پروتئین‌های VEGF و ILK با استفاده از وسترن بلات تعیین گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از روش ANOVA انجام شد.

یافته‌ها: در شرایط گلوکز بالا، غلظت‌های پایین سیلینین سبب حفظ بیان معنی دار و غلظت‌های بالای آن سبب کاهش معنادار و وابسته به دوز ILK گردید. اما در شرایط گلوکز بالا غلظت‌های پایین سیلینین سبب کاهش معنادار بیان VEGF و غلظت‌های بالای آن سبب افزایش معنادار و وابسته به دوز بیان VEGF گردید.

نتیجه گیری: گلوکز بالا، سبب افزایش بیان ILK و VEGF در سلول‌های OEC می‌گردد و درمان با غلظت‌های پایین سیلینین سبب حفظ بیان ILK و کاهش بیان VEGF می‌گردد. لذا به نظر می‌رسد که غلظت‌های پایین سیلینین، درمانی موثر در حفاظت سلول‌ها از سمیت سلولی ناشی از هایپرگلیسمی دیابت از طریق تثبیت میزان ILK و کاهش میزان VEGF می‌باشد.

کلمات کلیدی: سیلینین، کیناز متصل به اینتگرین، فاکتور رشد، سلول‌های غلاف کننده بویایی، گلوکز بالا

وصول مقاله: 1400/3/13 اصلاحیه نهایی: 1400/7/12 پذیرش: 1400/8/4

مجدد آکسون‌ها در سیستم عصبی محیطی نیز گزارش شده است (14). کنترل بیان سریع آن در دیابت باعث شده است تا محققان ILK را در پاتوژنز دیابت دخیل بدانند (15). مطالعات نشان داده که خاموش نمودن ژنهای بیان کننده ILK توسط siRNA سبب مهار افزایش VEGF و ICAM1 می‌گردد (16).

سیلینین، فلاونوئید مشتق شده از گیاه خار مریم، عمده ترین (80-70 درصد) و فعال ترین ترکیب سیلیمارین استخراج شده از گیاه خار مریم (*Silybum marianum*) است (17) و دارای اثرات آنتی اکسیدانی، نوروپروتکتیو، ضد سرطانی و ضدالتهابی می باشد (18). خاصیت نوروپروتکتیو سیلینین از طریق بهبود استرس اکسیداتیو و آبخار التهابی می باشد (20 و 19). خاصیت آنتی متاستاتیک سیلینین در سلول های استئوسارکومای انسانی (MG-63) از طریق کاهش چسبندگی سلولی و مهار بیان یوروکیناز فعال کننده ی پلاسمینوژن نوع یک (UPA) و ماتریکس متالوپروتئیناز (MMP-2) گزارش شده است (21). لذا در این مطالعه، اثرات غلظت های پایین و بالای سیلینین استخراج شده از گیاه خار مریم بر میزان بیان VEGF و ILK در سلول های OEC در شرایط گلوکز بالا و نرمال مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

روش بررسی

کشت سلول: در این مطالعه سلول ها مخاط بویایی نوزاد موش صحرایی هشت روزه استخراج و کشت داده شد. ابتدا حیوان با استفاده از مخلوط کتامین / زایلزین (mg/kg 60/10) بیهوش گردید، با برداشتن فک فوقانی، سپتوم بینی جدا و چندین بار با محلول بافر فسفات تازه حاوی 1٪ آنتی بیوتیک (پنی سیلین / استرپتومایسین) و سپس بدون آنتی بیوتیک شست و شو داده شد. مخاط بویایی یک سوم خلفی سپتوم بینی جدا و آستر مخاط آن خرد گردید، هضم آنزیمی با تریپسین 0/25٪ به مدت 20 دقیقه در انکوباتور انجام شد، با اضافه کردن حجم مساوی از سرم جنین گاوی (FBS) هضم آنزیمی متوقف گردید و به مدت 10

دیابت یک بیماری متابولیک با افزایش سطح قند خون می باشد که به دلیل تولید ناکافی انسولین و یا عدم پاسخ مناسب سلول ها به انسولین رخ می دهد (1). سلول های OEC سلول های گلیال ویژه ی غلاف کننده ی آکسون های بویایی می باشند که سبب حفاظت و بازسازی مداوم سیستم بویایی می گردند (2-4). از خواص منحصر به فرد این سلول ها، قرار گیری آن ها در داخل و هم چنین خارج CNS است. این سلول ها قادر به بیان فاکتور های تروفیک مختلف و گیرنده های آن ها می باشند که سبب افزایش جوانه زنی و بازسازی آکسون های عصبی مرکزی می گردند (5). فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) یک پروتئین موثر در رگ زایی است که به طور فیزیولوژیک و پاتولوژیک نقش مهمی در رشد عروق دارد (6). در مطالعات افزایش تشکیل عروق خونی جدید به دنبال پیوند سلول های OEC گزارش شده است (7). VEGF یکی از مهم ترین فاکتور هایی است که در شرایط هیپوکسی بیان می شود. mRNA این فاکتور در مغز انسان و جوندگان به مقادیر کم مشاهده شده است (9 و 8). امروزه به دلیل گستردگی اثرات VEGF بر سلول های بافت عصبی، آنرا به عنوان یک فاکتور نوروتروفیک جدید در نظر می گیرند (10).

مطالعات اخیر، نشان داده اند که کیناز های وابسته به اینتگرین سیتوپلاسمی (ILK) نقش اساسی در فرآیند ارتباط اجزای اسکلت داخل سلولی و پروتئین های سیگنالینگ با ماتریکس خارج سلولی (ECM) ایفا می کنند. چسبندگی سلول به ECM فرآیند مهمی است که تغییر شکل سلول، مهاجرت، تکثیر، بقا و تمایز را کنترل می کند. ILK یک سرین / ترئونین کیناز با وزن مولکولی 59 کیلدالتون است که نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای مختلف سلولی، از جمله چسبندگی، مهاجرت، تمایز و بقاء دارد (11)، هم چنین به تقویت رشد سلول ها، پیشرفت چرخه ی سلولی و مهار آپوپتوز کمک می کند (12). این فاکتور از طریق فعال سازی وابسته به فسفاتیدیل اینوزیتول کیناز 3 باعث افزایش بیان VEGF می شود (13). عملکرد اساسی ILK در میلینه شدن و بازسازی

دقیقه با دور 2000، سانتریفیوژ گردید. سلول‌ها در 4 میلی لیتر از محیط کشت حاوی 5% FBS و آنتی بیوتیک 1% و فاکتور میتوز فورسکولین $5 \mu\text{M}$ سوسپانسیون شدند و پس از انتقال به فلاسک در انکوباتور با دمای 37 درجه و دی اکسید کربن 5% نگهداری گردیدند (22).

بررسی تأثیر غلظت‌های پایین و بالای سیلیسین بر بیان ILK و VEGF در سلول‌های OEC توسط تکنیک وسترن بلات:

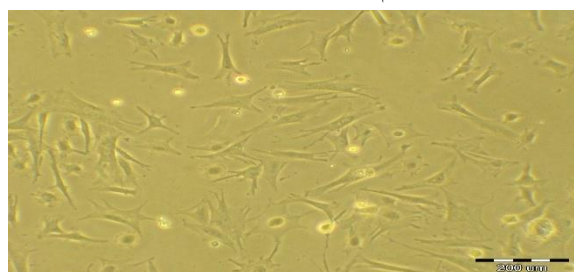
بدین منظور بعد از گذشت یک هفته از کشت، رشد و چسبیدن سلول‌ها به کف فلاسک، هر فلاسک به مدت 48 ساعت در معرض غلظت‌های پایین ($1 \mu\text{M}$ و $5 \mu\text{M}$) و بالای (50 و $75 \mu\text{M}$) سیلیسین تهیه شده با محیط کشت گلوکز نرمال ($5/5 \text{ mM}$) یا بالا (30 mM) قرار گرفتند. بعد از گذشت 48 ساعت سلول‌ها به کمک 4 میلی لیتر تریپسین از کف فلاسک جدا شده و با اضافه نمودن حجم مساوی از بافر فسفات اثر تریپسین خنثی گردید و سانتریفیوژ با دور 2000 به مدت 10 دقیقه انجام شد. پلیت سلولی حاصل تا زمان انجام وسترن بلات، به همراه 200 میکرولیتر DMEM در دمای 80- نگهداری گردید. جهت انجام وسترن بلات، سلول‌های تیمار شده با هریک از غلظت‌های سیلیسین در 30 میکرولیتر بافر لیزکننده هموژنیزه شدند و سوسپانسیون حاصل با دور 12500 به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول حاصل تا زمان آزمایش در فریزر 80- نگهداری گردید. جهت اندازه گیری غلظت تام پروتئین موجود در سلول‌ها از کیت micro BCA (شرکت intron کره) استفاده شد. برای انجام ژل

الکتروفورز، 7 میکرولیتر پروتئین از هر نمونه بر روی ژل پلی آکریل امید قرار داده شد و توسط الکتروفورز جدا گردید. پروتئین‌ها به غشاهای پلی وینیل دیفلوراید (PVDF) منتقل شده و پس از آن با شیر خشک پر چرب 5%، Tween20 (0%/1) در بافر سالین Tris برای یک ساعت در دمای اتاق بلاک شدند. سپس غشاهای با آنتی بادی اولیه و سپس با آنتی بادی ثانویه آنکوبه گردیدند. جهت آشکار نمودن پروتئین‌ها از کیت Amersham pharmacia ECL (biotech Inc, Piscataway, NJ, USA) بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد و نتایج با استفاده از نرم افزار تصویربرداری (Bio-rad, USA) Gel-pro analyzer اندازه گیری شد. لازم به ذکر است که جهت اطمینان از تکرار پذیری نتایج، هر آزمایش سه بار تکرار گردید.

آنالیز آماری: آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گردید. تفاوت معنی دار بین گروه‌ها زمانی عنوان می‌گردد که $P < 0/05$ بود. مقایسه بین گروه‌ها با روش one-way ANOVA با سطح معنی دار 0/05 $P <$ انجام شد.

یافته‌ها

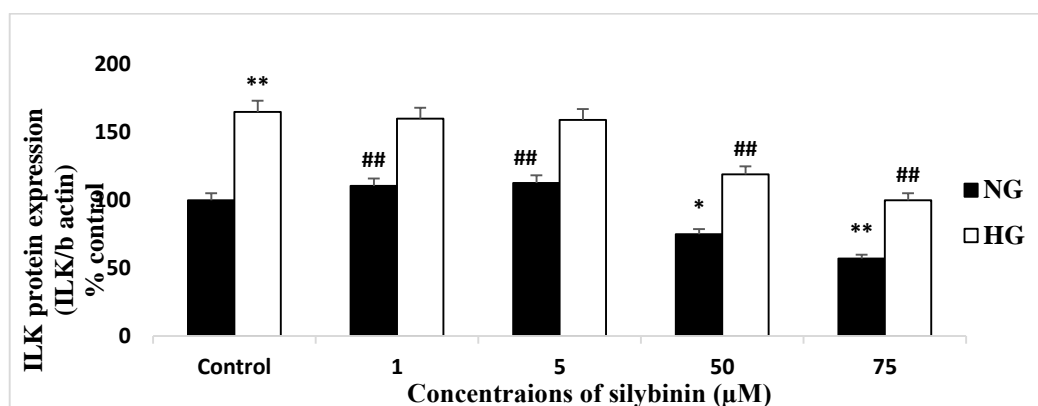
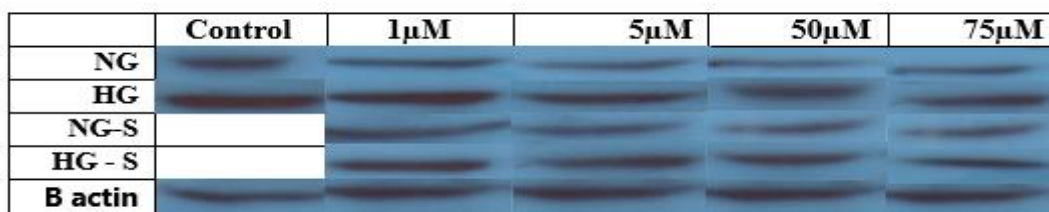
کشت سلول: در کشت سلول‌های OEC پس از چسبیدن سلول‌ها به کف فلاسک و گذشت 72 ساعت از کشت، دو فوتیپ متفاوت شبه شوان دوکی شکل و شبه آستروسیت با ظاهر پهن و زوائد متعدد مشاهده گردید (شکل 1).



شکل 1. سلول‌های OEC کشت داده شده هفت روز پس از کشت با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست. در این تصویر دو فوتوتایپ شبه شوان دوکی شکل و شبه آستروسیت ستاره ای شکل قابل رویت می باشد.

بصورت معنادار نسبت به گروه کنترل گردید. در حالی که در شرایط گلوکز بالا، غلظت های پایین سیلینین سبب حفظ بیان ILK و غلظت های بالا یک کاهش معنادار وابسته به دوز را نسبت به گروه کنترل نشان داد (شکل 2).

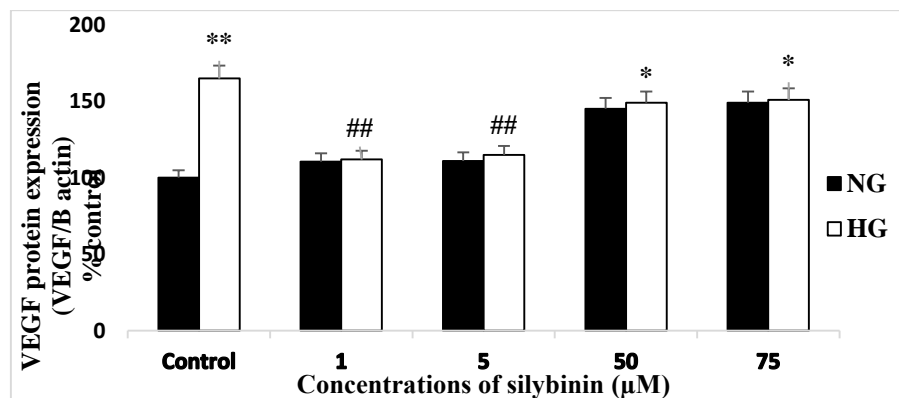
تأثیر غلظت های پایین و بالای سیلینین بر میزان بیان ILK و VEGF: همانطور که در شکل های 2 و 3 مشاهده می گردد انکوباسیون سلول های OEC در شرایط گلوکز نرمال با غلظت های پایین سیلینین (5 و 1 μM) سبب افزایش معنادار ILK و غلظت های بالا سبب کاهش بیان ILK



شکل 2. تأثیر غلظت های پایین (5 و 1 μM) و بالای (50 و 75 μM) سیلینین بر بیان ILK در سلول های OEC در شرایط گلوکز نرمال و بالا بعد از گذشت 48 ساعت توسط تکنیک وسترن بلات.

*: $P \leq 0/05$ اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل گلوکز نرمال، **: $P \leq 0/001$ اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل گلوکز نرمال، # $P \leq 0/05$ اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل گلوکز بالا، ## $P \leq 0/001$ اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل گلوکز بالا را نشان میدهند. دفعات تکرار آزمایش سه بار می باشد. در رابطه با میزان بیان VEGF نتایج نشان داد که تمامی غلظت های سیلینین در شرایط گلوکز نرمال بصورت وابسته به دوز سبب افزایش معنادار بیان VEGF نسبت به گروه کنترل می گردند. اما در شرایط گلوکز بالا اگر چه سیلینین سبب کاهش میزان VEGF گردید ولی با افزایش غلظت، باعث افزایش معنادار وابسته به دوز این فاکتور گردید (شکل 3).

	control	1μM	5μM	50μM	75μM
NG					
HG					
NG-S					
HG-S					
B actin					



شکل 3. تاثیر غلظت های پایین (5 و 1 μM) و بالای (50 و 75 μM) سیلیبینین بر روی بیان VEGF در سلول های OEC در شرایط گلوکز نرمال و بالا بعد از گذشت 48 ساعت توسط تکنیک وسترن بلات. *P ≤ 0/05: اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل گلوکز نرمال، **P ≤ 0/001: اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل گلوکز نرمال، #P ≤ 0/05: اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل گلوکز بالا، ##P ≤ 0/001: اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل گلوکز بالا را نشان می‌دهند. دفعات تکرار آزمایش سه بار می باشد.

بحث

از گلوکز بالا در سلولهای OEC نشان داد که شرایط گلوکز بالا سبب افزایش بیان ILK می گردد و تیمار با غلظت های پایین تیمول سبب حفظ بیان ILK می گردد اما غلظت های بالای تیمول سبب کاهش بیان ILK در هر دو شرایط گلوکز بالا و نرمال می گردد (24). بر اساس مطالعات انجام شده، سیلیبینین با بهبود فعالیت سلولهای β پانکراس، افزایش حساسیت به انسولین در سلول های کبد و عضلات، کاهش رسوب لیپیدی در سلول های چربی، باعث بهبود هموستاز گلیسمی می شود. اثربخشی سیلیبینین در کنترل عارضه های دیابتی همچون نوروپاتی، رتینوپاتی، هپاتوپاتی، کاردیومیوپاتی، نفروپاتی و پوکی استخوان گزارش شده است (25).

از طرف دیگر، بر اساس نتایج مطالعه ما میزان بیان VEGF در شرایط گلوکز بالا نسبت به گلوکز نرمال افزایش یافت و تیمار با تمامی غلظت های سیلیبینین در شرایط گلوکز نرمال بصورت وابسته به دوز سبب افزایش بیان VEGF گردید، اما در شرایط گلوکز بالا اگر چه سیلیبینین سبب

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان بیان ILK در شرایط گلوکز بالا نسبت به وضعیت گلوکز نرمال افزایش می یابد و تیمار با غلظت های پایین سیلیبینین سبب حفظ میزان ILK می گردد در حالی که غلظت های بالای آن سبب کاهش وابسته به دوز ILK می گردد. مطالعات گذشته نیز تاثیر دیابت بر افزایش بیان ILK را گزارش نموده اند (15). افزایش بیان ILK در شرایط گلوکز بالا نیز توسط شیری (23) و هم چنین کریمی و همکاران (24) در سلول های OEC گزارش شده است. بر اساس نتایج مطالعه شیری و همکاران، نانوپلیمرهای حاوی غلظت های پایین سیلیبینین حفاظت سلول ها از سمیت ناشی از گلوکز بالا را از طریق کاهش میزان فاکتورهای اکسیداتیو، تثبیت ILK، کاهش VEGF، افزایش میزان فاکتورهای توروفیک مشتق از مغز (BDNF) و فاکتور رشد عصبی (NGF) انجام می دهند (23). نتایج مطالعه کریمی و همکاران نیز طی بررسی تاثیر نانوپارسیکل های پلیمری حاوی تیمول بر سمیت ناشی

مطالعه کریمی و همکاران می باشد که در بررسی تاثیر نانوپارتیکل های پلیمری تیمول بر سمیت گلوکز بالا روی سلولهای OEC نشان داد در شرایط گلوکز بالا میزان VEGF در سلولهای OEC افزایش می یابد و درمان با غلظت های پایین تیمول سبب کاهش بیان و غلظت های بالا سبب افزایش بیان VEGF در هر دو شرایط گلوکز بالا و نرمال می گردد (24).

نتیجه گیری

یافته های این مطالعه نشان داد که در شرایط گلوکز بالا، درمان با غلظت های پایین سیلیبیین سبب حفظ بیان ILK و کاهش میزان VEGF می گردد. لذا بر اساس این یافته ها، بنظر می رسد غلظت های پایین سیلیبیین درمانی موثر در حفاظت سلول ها از سمیت سلولی ناشی از هایپرگلیسمی دیابت از طریق تثبیت میزان ILK و کاهش میزان VEGF می باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از حمایت های مالی دانشگاه علوم پزشکی ایلام از طرح پایان نامه با کد 951021/108 با کد اخلاق (IR.MEDILAM.REC.1395.67) تشکر و قدردانی می نمایند. هم چنین نویسندگان مقاله عدم تعارض منافع خود را اعلام می نمایند.

کاهش میزان VEGF گردید ولی با افزایش غلظت، میزان این فاکتور بصورت وابسته به دوز افزایش یافت. در حالیکه یافته های Singh و همکارانش اثر ضد رگزایی سیلیبیین را نشان داد، آن ها این خاصیت را ناشی از کاهش شدید سنتز نیتریک اکساید القایی (NOSi)، NOS3، سیکلواکسیژناز 1 (COX-1) و فاکتور القا کننده هیپوکسی و VEGF ذکر نمودند (26). نتایج مطالعه Lin و همکاران نیز اثر ضد رگزایی جدید سیلیبیین و کاهش معنادار مقدار VEGF را در موش های صحرایی مبتلا به بیماری تخریب ماکولایی وابسته به سن (AMD) به دو صورت درون تنی و برون تنی نشان داد (27). این تناقض در نتایج دو مطالعه مذکور با مطالعه ما می تواند ناشی از نوع سلول های استفاده شده، شرایط متفاوت مطالعه (هیپوکسی در مطالعه Li) و حتی سن حیوانات سلول های استخراج شده باشد. نتایج مطالعه Verheyen و همکاران در بررسی تاثیر سیلیبیین بر روی سلول های گانگلیون ریشه ی خلفی (DRG) نشان دهنده ی افزایش جبرانی بیان VEGF و نقش آن در محافظت از نورون های DRG از آسیب های ناشی از هایپرگلیسمی و تنظیم بازسازی عصب می باشد (28). در مطالعه ما نیز اگرچه سیلیبیین در شرایط گلوکز بالا سبب کاهش میزان VEGF گردید ولی با افزایش غلظت، میزان این فاکتور بصورت وابسته به دوز افزایش یافت. یافته های دیگر همسو با مطالعه حاضر نتایج

منابع

1. Ansari S, Djalali M, Mohammadzadeh N, Mohammadzadeh Honarvar N, Mazaherioun M, Zarei M, et al. Assessing the effect of omega-3 fatty acids supplementation on serum BDNF (brain derived neurotrophic factor) in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Int J Sci Basic Appl Res*. 2016;10:380-3.
2. Mayeur A, Duclos C, Honore A, Gauberti M, Drouot L, do Rego J-C, et al. Potential of olfactory ensheathing cells from different sources for spinal cord repair. *PloS one*. 2013;8(4):e62860.
3. Rubio Mp, Muñoz-quiles C, Ramón-cueto A. Adult olfactory bulbs from primates provide reliable ensheathing glia for cell therapy. *Glia*. 2008;56(5):539-51.
4. Bianco JI, Perry C, Harkin DG, Mackay-Sim A, Feron F. Neurotrophin 3 promotes purification and proliferation of olfactory ensheathing cells from human nose. *Glia*. 2004;45(2):111-23.

- 5.Sasaki M, Hains BC, Lankford KL, Waxman SG, Kocsis JD. Protection of corticospinal tract neurons after dorsal spinal cord transection and engraftment of olfactory ensheathing cells. *Glia*. 2006;53(4):352-9.
- 6.Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews*. 2004;25(4):581-611.
- 7.Stamegna J, Felix M, 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. *Experimental neurology*. 2011;229(1):120-31.
- 8.Shibuya M. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: therapeutic aspects of vascular endothelial growth factor. *The FEBS journal*. 2009;276(17):4636-43.
- 9.Sun FY, Guo X. Molecular and cellular mechanisms of neuroprotection by vascular endothelial growth factor. *Journal of neuroscience research*. 2005;79(1-2):180-4.
- 10.Storkebaum E, Lambrechts D, Carmeliet P. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *Bioessays*. 2004;26(9):943-54.
- 11.Wu C, Dedhar S. Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. *The Journal of cell biology*. 2001;155(4):505-10.
- 12.Attwell S, Roskelley C, Dedhar S. The integrin-linked kinase (ILK) suppresses anoikis. *Oncogene*. 2000;19(33):3811-5.
- 13.Tan C, Cruet-Hennequart S, Troussard A, Fazli L, Costello P, Sutton K, et al. Regulation of tumor angiogenesis by integrin-linked kinase (ILK). *Cancer cell*. 2004;5(1):79-90.
- 14.Pereira JA, Benninger Y, Baumann R, Gonçalves AF, Özçelik M, Thurnherr T, et al. Integrin-linked kinase is required for radial sorting of axons and Schwann cell remyelination in the peripheral nervous system. *Journal of Cell Biology*. 2009;185(1):147-61.
- 15.Li Y-J, Hui Y-N, Yan F, Du Z-J. Up-regulation of integrin-linked kinase in the streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2007;245(10):1523-32.
- 16.Wautier M, Massin P, Guillausseau P, Huijberts M, Levy B, Boulanger E, et al. N (carboxymethyl) lysine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Diabetes & metabolism*. 2003;29(1):44-52.
- 17.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. *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*. 2010;49(3):247-58.
- 18.Baluchnejadmojarad T, Roghani M, Mafakheri M. Neuroprotective effect of silymarin in 6-hydroxydopamine hemi-parkinsonian rat: involvement of estrogen receptors and oxidative stress. *Neuroscience letters*. 2010;480(3):206-10.
- 19.Hou Y-C, Liou K-T, Chern C-M, Wang Y-H, Liao J-F, Chang S, et al. Preventive effect of silymarin in cerebral ischemia-reperfusion-induced brain injury in rats possibly through impairing NF- κ B and STAT-1 activation. *Phytomedicine*. 2010;17(12):963-73.
- 20.Geed M, Garabadu D, Ahmad A, Krishnamurthy S. Silibinin pretreatment attenuates biochemical and behavioral changes induced by intrastriatal MPP⁺ injection in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2014;117:92-103.
- 21.Hsieh Y-S, Chu S-C, Yang S-F, Chen P-N, Liu Y-C, Lu K-H. Silibinin suppresses human osteosarcoma MG-63 cell invasion by inhibiting the ERK-dependent c-Jun/AP-1 induction of MMP-2. *Carcinogenesis*. 2007;28(5):977-87.
- 22.Heydarizadi S, Abbasi N, Asadollahi K, Rezaee S, Moradipour A, Azizi M. Effects of transplanted olfactory ensheathing cells on functional improvement and axonal regeneration

- in acute and delayed spinal cord injury in rats: A comparative study. *Journal of the Anatomical Society of India*. 2019;68(1):1.
23. Shiri S, Abbasi N, Alizadeh K, Karimi E. Novel and green synthesis of a nanopolymer and its use as a drug delivery system of silibinin and silymarin extracts in the olfactory ensheathing cells of rats in normal and high-glucose conditions. *Rsc Advances*. 2019;9(67):38912-27.
24. Karimi E, Abbasi S, Abbasi N. Thymol polymeric nanoparticle synthesis and its effects on the toxicity of high glucose on OEC cells: involvement of growth factors and integrin-linked kinase. *Drug design, development and therapy*. 2019;13:2513.
25. Chu C, Li D, Zhang S, Ikejima T, Jia Y, Wang D, et al. Role of silibinin in the management of diabetes mellitus and its complications. *Archives of pharmacal research*. 2018;41(8):785-96.
26. Singh RP, Gu M, Agarwal R. Silibinin inhibits colorectal cancer growth by inhibiting tumor cell proliferation and angiogenesis. *Cancer research*. 2008;68(6):20.43-50
27. Lin C-H, Li C, Liao P, Tse L, Huang W, Cheng H, et al. Silibinin inhibits VEGF secretion and age-related macular degeneration in a hypoxia-dependent manner through the PI-3 kinase/Akt/mTOR pathway. *British Journal of Pharmacology*. 2013;168(4):9.20-31
28. Verheyen A, Peeraer E, Lambrechts D, Poesen K, Carmeliet P, Shibuya M, et al. Therapeutic potential of VEGF and VEGF-derived peptide in peripheral neuropathies. *Neuroscience*. 2013;244:77-89.