مقاله پژوهشی

کورکومین سبب کاهش استرس اکسیداتیو در مدل حیوانی مالتیپل اسکلروزیس می‌شود

لاله مودتیان[۱]، شیوا خضری[۱*]، سید میثم ابطحی فروشانی[۲]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ایران
۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۲/۱۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۱۰/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: در مطالعات گذشته به نقش استرس اکسیداتیو در پاتوژنز بیماری مالتیپل اسکلروزیس (MS) اشاره شده است. کورکومین جزء فعال گیاه زردچوبه بوده و دارای خواص ضدالتهابی است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات کورکومین در کاهش آثار ناشی از استرس اکسیداتیو در مدل حیوانی MS بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، آنسفالومیلیت خودایمن تجربی به‌عنوان مدل بیماری MS توسط ایمن‌سازی رت‌های ویستار (۱۲ سر) با نخاع هموژنیزه‌شده خوکچه‌هندی و ادجوانت کامل فروند القاء شد. سپس حیوانات القاشده در دو گروه تقسیم شدند. درمان با کورکومین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت روزانه) از روز دوازدهم بعد از ایمن‌سازی، همزمان با بروز اولین علائم ناتوانی نورولوژیک در رت‌ها آغاز شد و تا روز ۲۴ که رت‌ها آسان‌کشی شدند، ادامه یافت. همزمان، گروه کنترل آب مقطر دریافت نمودند. درمان تا ۲۴ روز بعد از ایمن‌سازی ادامه یافت.

نتایج: مصرف کورکومین در رت‌های مبتلابه EAE موجب کاهش معنی‌دار در سطح نیتریک اکساید و میزان فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز سرمی شد ($p<0.05$). به‌طور همزمان سطح مالون‌دی‌آلدهید بافت مغز کاهش یافت ($p<0.05$) ولی تغییر معنی‌داری در ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم مشاهده نشد ($p<0.05$). بعلاوه سطح اسید اوریک سرم در رت‌های مبتلابه دنبال تیمار با کورکومین افزایش یافت و به سطح رت‌های گروه سالم رسید ($p<0.05$).

نتیجه‌گیری: مصرف کورکومین به میزان ۱۰۰ mg/kg در رت‌های مبتلابه EAE باعث کاهش اثرات مخرب آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود و می‌تواند در درمان بیماری MS مؤثر باشد.

کلمات کلیدی: مالتیپل اسکلروزیس، آنسفالومیلیت خودایمن تجربی، کورکومین، استرس اکسیداتیو

مقدمه

بیماری مالتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis=MS) یک بیماری ناتوان‌کننده مزمن، خودالتهابی سیستم اعصاب مرکزی است. این بیماری به دلیل اثرات شدیداً ناتوان‌کننده و همچنین گرانی داروهای موردنیاز جهت کنترل آن، دارای اثرات اقتصادی و اجتماعی گسترده‌ای است (۱). بیشتر موارد این بیماری در افراد بالغ جوان (محدوده سنی ۳۰ سال) رخ می‌دهد (۲). در سال‌های اخیر پیشرفت‌های مناسبی در امر کنترل پیشرفت بیماری مالتیپل اسکلروزیس ایجاد شده است، بااین‌حال بسیاری از بیماران به درمان‌های رایج به‌طور مناسبی پاسخ نمی‌دهند. بنابراین مطالعه و تحقیق در مورد ترکیبات اثرگذار بر سیر پاتوژنز بیماری امری لازم و ضروری است (۳).

خوشبختانه آنسفالومیلیت خودایمن تجربی (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis=EAE) فرصت مناسبی جهت مطالعه کارآمدی ترکیبات با خصلت احتمالی دارویی فراهم آورده است (۴). هر دو بیماری MS و EAE داری یک ماهیت

*نویسنده مسئول: **شیوا خضری**، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ایران
E-mail: sh.khezri@urmia.ac.ir
http://orcid.org/0000-0001-8692-8915

خودالتهابی می‌باشند (۴). حمله لنفوسیت‌های T کمکی $CD4^+$ به بافت عصبی نقش مهمی در شعله‌ورسازی بیماری بازی می‌نماید (۵).

یافتن ترکیبات نوین با منشأ گیاهی در درمان، تخفیف و پیشگیری از بیماری‌ها در سال‌های اخیر موردتوجه محققان بوده است. در پی اثبات آثار مضر آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی، تحقیقات زیادی برای جایگزین کردن آن‌ها با آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی صورت گرفته است (۶). یکی از گیاهان دارویی که دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی است، زردچوبه است. مهم‌ترین ترکیب فعال زردچوبه، کورکومین است کورکومین ماده مؤثر و اصلی گیاه زردچوبه بانام علمی *Curcuma longa* است. ترکیبات زردچوبه شامل سه کورکومینوئید: کورکومین (ماده تشکیل‌دهنده اصلی و مسئول رنگ زرد)، دمتوکسی کورکومین و بیس دمتوکسی کورکومین که در قرارگیری گروه متوکسی بر روی حلقه آروماتیک با یکدیگر متفاوت‌اند و همچنین روغن‌های فرار، شکر، پروتئین و رزین است. در میان این سه کورکومینوئید، کورکومین از همه فراوان‌تر بوده و جزء اصلی زردچوبه به شمار می‌رود و فعالیت‌های بسیار زیاد دارویی از قبیل ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی را به وجود کورکومین نسبت می‌دهند (۸، ۹). کورکومین دارای مولکول‌های بسیار پویا و توانای پلیوتروپی (Pleiotropic) هستند که در تعامل با مولکول‌های فراوان درگیر در التهاب می‌باشند. گروه‌های هیدروکسی کورکومین برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و گروه‌های متوکسی برای فعالیت ضدالتهابی و ضدتکثیری آن ضروری هستند. کورکومین در آب و اتر، نامحلول و در اتانول، دی‌متیل سولفید اکسید (DMSO یا Dimethyl sulfoxide) و استون، قابل‌حل است (۱۰). ترکیبات شبه کورکومینی به‌عنوان یک ترکیب سالم و باقابلیت تحمل بالا توسط FDA (سازمان غذا و داروی ایالات‌متحده) پذیرفته شده است. دوز توصیه‌شده در انسان به میزان بالای ۸۰۰۰ – ۴۰۰۰ میلی‌گرم در روز به‌عنوان دوز سالم در نظر گرفته شده است. حتی افزودن این دوز تا میزان ۱۲۰۰۰ میلی‌گرم در روز نیز از طرف FDA بی‌خطر اعلام شده است (۱۱). درگذشته به اهمیت آسیب‌های اکسیداتیو درروند بیماری‌زایی مالتیپل اسکلروزیس اشاره شده است (۱۲) و درعین‌حال شواهد محکمی دال بر اثرات آنتی‌اکسیدانی کورکومین ارائه شده است (۱۳). بااین‌حال تاکنون در مورد اثرات مفید کورکومین با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدان آن در مدل‌های تجربی MS انجام نشده است. لذا مطالعه حاضر به‌منظور ارزیابی اثرات کورکومین در کاهش آثار ناشی از استرس اکسیداتیو در مدل EAE طراحی شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی که به‌صورت موردی/کنترلی انجام شده است، جامعه موردمطالعه، شامل رت‌های ماده نژاد ویستار با محدوده سنی ۵ تا ۶ هفته نابالغ و میانگین وزنی ۱۱۰-۹۰ گرم است که از حیوان خانه دانشکده علوم دانشگاه ارومیه خریداری شد. حیوانات تحت شرایط استاندارد ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۱۰±۵۰ درصد نگه‌داری شدند. تمام حیوانات تحت شرایط تغذیه‌ای یکسان با کسانتره دامی به نسبت‌های برابر تغذیه‌شده و امکان دسترسی آزاد به آب نیز برای تمامی حیوانات وجود داشت. به‌منظور جلوگیری از هرگونه آلودگی، خاکاره حداقل ۳ بار در هفته تعویض شد و آب مصرفی آن‌ها نیز روزانه تعویض گردید. کلیه مراحل این تحقیق با رعایت حقوق حیوانات در مطالعات و پس از تائید در کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه (کد ۳۷۳-۲ ع) انجام شد.

روش القاEAE: در ابتدا بافت هموژن نخاع خوکچه‌هندی به نسبت ۱ به ۱ با ادجوانت کامل فروند (Compound Freund`s Adjuvant=CFA)(sigma Aldrich- امریکا) محتوی ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پیکره کشته‌شده مایکوباکتریوم، به حالت امولوسیون درآمد. جهت تهیه سوسپانسیون مزبور از دو سرنگ شیشه‌ای که توسط رابطی از جنس استیل به هم متصل هستند، استفاده گردید. دریکی از سرنگ‌ها محلول بافت مغز و نخاع هموژن‌شده خوکچه و سرنگ دیگر محتوی هم‌حجم آن CFA واردشده و عمل پر و خالی کردن سرنگ‌ها به‌نوبت تا حصول امولسیونی سفیدرنگ، یکنواخت و با قوام ادامه یافت. همچنین قابل‌ذکر است که ادجوانت فروند کامل تجاری موجود در بازار حاوی یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر از پیکره مایکوباکتریوم است. جهت رسیدن به غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، یک شیشه ادجوانت فروند کامل (۱۰ میلی‌لیتر) با دور RPM 10000 سانتریفیوژ شدند و رسوب حاصل در یک سی‌سی از مایع رویی خود ادجوانت حل شد. پس از بیهوشی رت‌ها (کتامین ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زایلازین ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم- شرکت، Alfasan هلند)، ۴۰۰ میکرولیتر مخلوط آنتی‌ژن و ادجوانت مزبور به‌صورت زیر جلدی در ناحیه پشت و ۱۰۰

میکرولیتر در ناحیه بالشتک کف پا (Foot Pad) هر حیوان با سوزن ۲۵ گیج تزریق گردید. مقدار 10^9 باکتری برودتلا پاراپرتوسیس (مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران،-IBRC ATCC 15311 M 10710,) نیز در حجم ۳۰۰ میکرولیتر PBS (Phosphate Buffered Saline) در روز ایمن‌سازی و ۴۸ ساعت بعد به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید (۱۴، ۱۵). روند بیماری (شدت ناتوانی حرکتی) در هر رت موجود در گروه‌ها، به‌صورت روزانه مورد ارزیابی قرار گرفت. از مقیاس زیر جهت ارزیابی شدت بیماری استفاده گردید: صفر: عدم بروز بیماری، یک: اختلال درحرکت دم، دو: فلج شدن دم، سه: فلجی دو پا، چهار: فلجی چهار دست‌وپا، پنج: مرگ (۱۶).

درمان رت‌های مبتلابه EAE با کورکومین (sigma - امریکا): ۱۲ سر رت پس از القاء بیماری به دو گروه ۶ سری با شرایط سنی و وزنی یکسان تقسیم‌شده تا ۲۴ روز پس از بروز علائم درمانگاهی به شرح زیر تحت درمان قرار گرفتند:

گروه تحت درمان: به‌منظور ارزیابی اثرات درمانی دارو، بر روی بیماری در حال جریان، پس از بروز اولین علائم نورولوژیک (روز ۱۲ پس از القای بیماری) روزانه داروی کورکومین به میزان ۱۰۰ mg/Kg، روزانه به رت‌های گروه مطالعه، به‌صورت گاواژ تجویز شد. انتخاب دوز کورکومین بر اساس مطالعات گذشته در مدل تجربی دیابت صورت گرفت (۱۷).

گروه شاهد: شامل رت‌های مبتلابه EAE بودند که در حجم مشابه با گروه قبلی پس از بروز اولین علائم در تمام رت‌های گروه (روز ۱۲ پس از القا) تحت درمان با حلال دارو (آب مقطر) با حجم ۲۰۰ میکرولیتر قرار گرفتند.

گروه کنترل: ۶ سر رت که ازنظر سن، جنس و وزن مشابه با دو گروه قبلی بودند، به‌عنوان گروه سالم غیر بیمار در نظر گرفته شدند. این رت‌ها فرآیند القاء بیماری را نداشته ولی هم‌زمان با آن‌ها تحت درمان با حلال دارو قرار گرفتند.

یک ماه پس از آغاز مطالعه رت‌ها (توسط کتامین ۱۰۰ میلی-گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش گردیده و پس از تشریح و باز کردن جلوی قفسه سینه توسط قیچی جراحی، به‌وسیله سرنگ ۲ml اقدام به خون‌گیری از قلب رت‌ها و تهیه سرم جهت انجام مطالعات بعدی صورت گرفت.

اندازه‌گیری نیتریک اکسید: میزان تولید نیتریک اکسید توسط روش رنگ‌سنجی گریس (Griess) و استفاده از منحنی استاندارد نیتریت سدیم تعیین گردید. به‌طور خلاصه،۱۰۰µL ازسرم به‌صورت دوتایی به داخل چاهک‌های پلت ۹۶ خانه‌ای ته-تخت ریخته شد. سپس ۱۰۰µL از محلول ۱ درصد سولفانیل آمید (شرکت Sigma – امریکا) به چاهک‌ها اضافه شد. پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق نگه‌داری شد. آنگاه به تمام حفره‌ها ۱۰۰µL از محلول ۱ درصد N- ۱-۱ نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدرو کلراید (شرکت Sigma – امریکا)اضافه شد و بار دیگر به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق نگه‌داری شد. درنهایت جذب نوری نمونه در طول‌موج ۵۳۰ نـانومتر توسط دستگاه الایزانگار (SCO - GmbH آلمان) قرائت گردید.

سنجش سطح MPO (Myeloperoxidase): به این منظور ۱۰ میکرولیتر از نمونه سرم با ۸۰ میکرولیتر از H_2O_2 ۷۵٪ mM و ۱۱۰ میکرولیتر از محلول (3,3’,5,5’– tetramethylbenzidine TMB) در یک پلیت ۹۶ خانه مخلوط شد. در ادامه پلیت به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. واکنش با افزودن ۵۰ میکرولیتر از H_2SO_4 ۲M به هر چاهک شده و نمونه‌ها در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر توسط الایزاریدر خوانده شد.

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام بافت مغز: برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی از شیوه FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) بر اساس روش (Benzie, Iris F.F) Benziاستفاده شد (۱۸). به‌طور خلاصه، در ابتدا محلول-های زیر تهیه شد:

محلول۱: (بافر استات ۳۰۰ میلی‌مولار)، محلول ۲: TPTZ (2, 4, 6- tripyridyl-s-triazine) ۱۰ میلی‌مولار در ۴۰ میلی مولار HCl)؛ محلول ۳: (۰/۰۵۴۰ گرم $FeCl_3$) در یک بالن ۱۰ ریخته شد و با آب مقطر به حجم رسانده شد.

پس از تهیه معرف FRAP، جهت تهیه هموژنای بافت، ۱۰٪ وزن/حجم بافت آن KCl اضافه گردید و در هاون کوبیده شده و با دور ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. از محلول رویی ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شد و ۳ میلی‌لیتر معرف FRAP به آن اضافه شد و در بن‌ماری به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. جذب کمپلکس آبی‌رنگ در ۵۹۳ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (2100 - UNICO آمریکا) خوانده شد (۱۹).

تست MDA (Malondialdehyde): نمونه بافت مغز که پس از بیـهوشـی (توسـط کتـامـین ۱۰۰ میـلی‌گرم بر کیلوگرم) و با

تشریح سر و توسط ابزار جراحی استخراج شد، وزن گردید و ۱۰٪ وزن/حجم به آن بافر فسفات اضافه و در هاون کوبیده شد؛ سپس هموژنای تهیه‌شده، به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. ۱۵۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته شد و به لوله‌آزمایش منتقل گردید. سپس ۳۰۰ میکرولیتر تری-کلریک اسید (Trichloroacetic acid=TCA) ۱۰٪ به آن اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۱۰۰۰ در دمای $4^{\circ}C$ سانتریفوژ گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به لوله‌آزمایش منتقل و با ۳۰۰ میکرولیتر از تیوباربیتوریک اسید (Thiobarbituricacid =TBA) ۰/۶۷٪ در دمای $100^{\circ}C$ برای مدت ۲۵ دقیقه انکوبه شد. ۵ دقیقه پس از خنک شدن محلول، رنگ صورتی ناشی از واکنش MDA با TBA ظاهر و با اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۵۳۵ نانومتر در مقابل بلانک ارزیابی گردید.

تست اسیداوریک

روش: آنزیمی، کالیمتری با استفاده از روش TBHBA (۲ و ۴ و ۶- تری برمو ۳- هیدروکسی بنزوئیک اسید)

اساس آزمایش

$$\text{Uric acid} + H_2O + O_2 \longrightarrow \text{Allantoin} + CO_2 + H_2O_2$$

$$\text{TBHBA} + \text{4-Aminoantipyrine} + 2H_2O_2 \longrightarrow \text{Quinoneimine} + 3H_2O$$

روش انجام تست

برای انجام تست، در ۶ لوله‌آزمایش توسط سمپلیر ۵۰ میکرولیتر سرم داخل لوله‌های آزمایش اول تا چهارم و در لوله پنجم ۲۰ میکرولیتر محلول استاندارد ریخته و در لوله ششم نیز ۲۰ میکرو لیتر بلانک (آب مقطر) ریخته شد. سپس محلول مخلوط‌شده معرف‌های ۱ (بافر فسفات ۱۰۰ مول بر لیتر و TBHBA ۱ مول بر لیتر) و ۲ (بافر فسفات ۱۰۰ مول بر لیتر، اوریکاز ۱۰ مول بر لیتر، آمینوآنتی پرین ۰/۳ میلی‌مول بر لیتر) به میزان ۱۰۰۰ میکرولیتر و با نسبت ۴ به‌علاوه ۱ (۷۵۰ میلی‌لیتر معرف ۱ و ۲۵۰ میلی‌لیتر معرف ۲) به‌تمامی لوله‌ها اضافه گردید. پس از مخلوط نمودن ۲۰ دقیقه در ۲۰ تا ۲۵ درجه و یا ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از گذشت این مدت محلول‌ها از درون لوله‌های آزمایش به درون کووت منتقل گشت. در آخر کووت (با قطر یک سانتیمتر) حاوی بلانک را در قسمت مخصوص بلانک دستگاه قرار داده و روی صفر تنظیم گردید. کووت حاوی محلول استاندارد در جایگاه شماره یک و کووت حاوی سرم‌ها در جایگاه‌های بعدی قرار داده شدند. حداکثر طی ۶۰ دقیقه و در حداکثر جذب ۵۴۶ نانومتر، جذب نوری استاندارد و نمونه‌ها اندازه‌گیری گردید.

فرمول محاسبه:

$$\text{Uric Acid } \left(\frac{mg}{dl}\right) = \frac{\Delta A \text{ Sample}}{\Delta A \text{ STD/Cal}} \text{ /dl)} * \text{ Conc. Std/Cal (mg)}$$

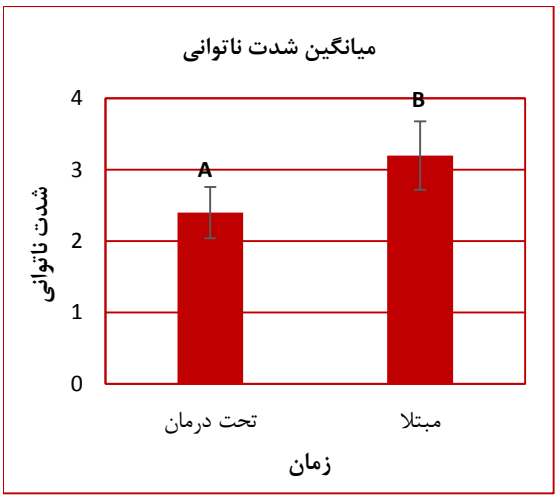
* Std معادل standard، Cal معادل Calibration و Conc معادل Concentration

* $mg/dl \times 59.5 = \mu mol/l$

آنالیز آماری: جهت مقایسه داده‌های ناپارامتری (nonparametric) مرتبط با شدت علائم نورولوژیک از آزمون Mann Whitney-U و جهت مقایسه سایر داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و تست تعقیبی Tukey's (test) استفاده شد. در تمام بررسی‌ها $p<0/05$ به‌عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. کلیه بررسی‌های آماری در محیط نرم‌افزاری SPSS ویراست ۲۱ انجام شد و برای ترسم نمودارها از نرم‌افزار Excel Microsoft (۲۰۱۳) استفاده شد. داده‌ها به‌صورت Mean±SD گزارش گردید.

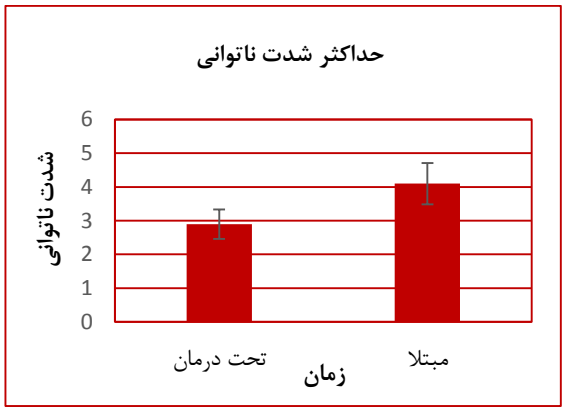
نتایج

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده میانگین شدت ناتوانی در طول دوره درمان در رت‌های مبتلا و تحت درمان با کورکومین نسبت به گروه مبتلا ولی بدون درمان به‌صورت معنی‌داری کمتر است ($p<0/05$) (نمودار ۱). میانگین حداکثر شدت بیماری نیز در

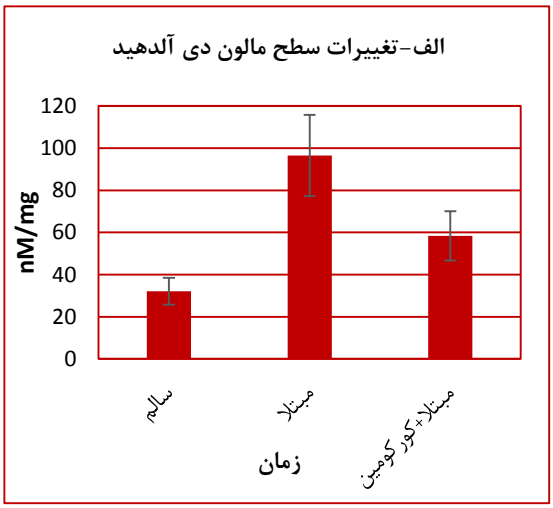


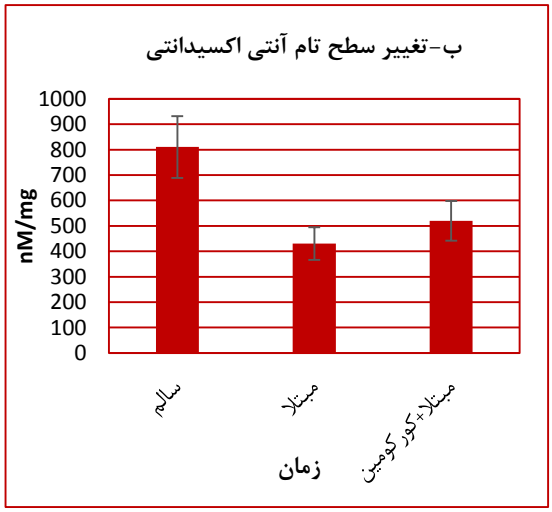
نمودار ۱- میانگین شدت ناتوانی در رت‌های موردمطالعه. حرف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p<0/05$ است.

گروه رت‌های مبتلا و تحت درمان در مقایسه با رت‌های مبتلا ولی بدون درمان کمتر بود ($p<0/05$) (نمودار ۲). سطح مالون_



نمودار ۲- حداکثر شدت ناتوانی در رت‌های موردمطالعه. حرف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح p<۰/۰۵ است.

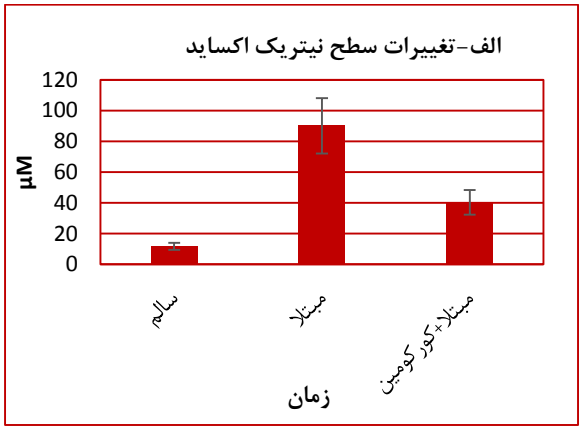


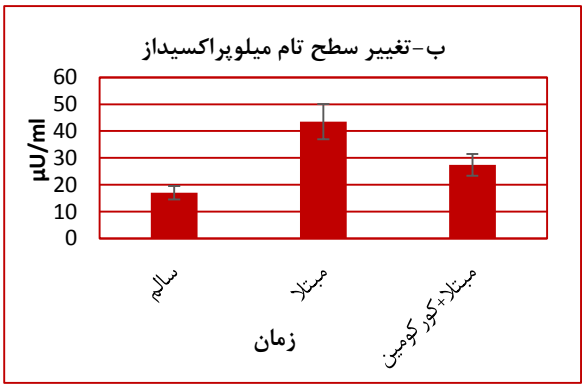


نمودار ۳- تغییر سطح فاکتورهای استرس اکسیداتیو در مغز رت‌های موردمطالعه. الف- تغییرات سطح مالون دی آلدهید. ب. تغییر سطح تام آنتی‌اکسیدانی. حرف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح p<۰/۰۵ است.

_دی‌آلدهید که شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدی است در بافت مغز رت‌های مبتلابه EAE افزایش معنی‌داری یافت (p<۰/۰۵) (نمودار ۳- قسمت الف). درمان با کورکومین در رت‌های مبتلا سطح پراکسیداسیون لیپیدی نسبت به رت‌های مبتلا و بدون درمان کاهش معنی‌داری یافت (p<۰/۰۵) (نمودار ۳- قسمت الف). سطح تام آنتی‌اکسیدان‌های سرمی در گروه رت‌های مبتلا نسبت به رت‌های سالم کاهش یافت (p<۰/۰۵). بااین‌حال سطح تام آنتی‌اکسیدان‌های بافت مغز به دنبال تیمار با کورکومین افزایش معنی‌داری را نشان نداد (p<۰/۰۵) (نمودار ۳- قسمت ب).

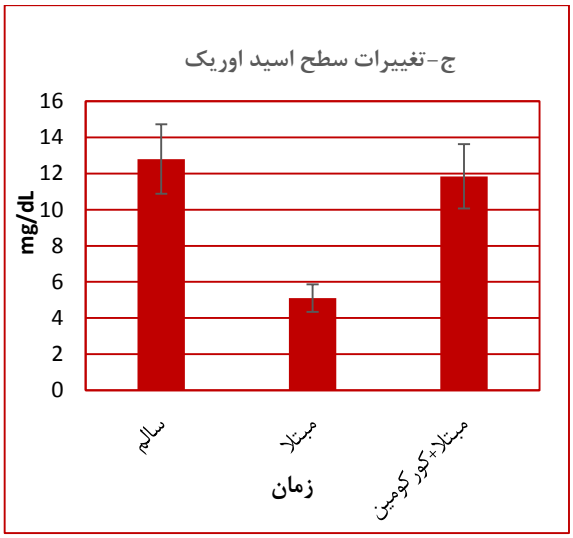
تست گریس یک ارزیابی کلی از سطح سرمی نیتریک اکسید (واسطه فعال نیتروژن) را ارائه می‌دهد. نتایج حاصل نشان داد که کورکومین موجب کاهش معنی‌دار سطح نیتریک اکسید سرمی در رت‌های مبتلا نسبت به گروه کنترل (مبتلا و بدون درمان گردید (p<۰/۰۵) (نمودار ۴- قسمت الف). ابتلا به EAE موجب





نمودار ۴- تغییر سطح فاکتورهای عوامل مؤثر در ایجاد اکسیداتیو در سرم رت‌های موردمطالعه. الف- تغییرات سطح نیتریک اکساید. ب- تغییر سطح تام میلو پراکسیداز. ج -تغییرات سطح اسید اوریک. حرف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح p<۰/۰۵ است.

افزایش سطح NO در سرم حیوانات مبتلا شد (نمودار ۴-قسمت الف). بااین‌حال درمان با کورکومین موجب کاهش معنی‌دار مقدار میلوپراکسیداز سرمی در رت‌های مبتلا و تحت درمان نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری شد ($p<۰/۰۵$) (نمودار ۴- قسمت ب). سطح اسید اوریک در رت‌های مبتلا نسبت به رت‌های سالم کاهش معنی‌داری یافت ($p<۰/۰۵$). درمان با کورکومین در رت-های مبتلا سطح اسید اوریک را افزایش داد به‌طوری‌که سطح آن با سطح رت‌های سالم تفاوت معنی‌داری نداشت ($p<۰/۰۵$) (نمودار ۴- قسمت ج).



نمودار ۴- تغییر سطح فاکتورهای عوامل مؤثر در ایجاد اکسیداتیو در سرم رت‌های موردمطالعه. الف- تغییرات سطح نیتریک اکساید. ب- تغییر سطح تام میلو پراکسیداز. ج -تغییرات سطح اسید اوریک. حرف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p<۰/۰۵$ است.

بحث

مطالعات حیوانی در مورد مدل تجربیMS نشان داده است که تخلیه نوتروفیل‌ها موجب کاهش قابل‌توجه درشدت بیماری EAE شده است (۲۰). در این زمینه پیشنهاد شده است که یکی از مهم‌ترین عملکردهای نوتروفیل در ایجاد بیماری‌زایی MS و EAE تولید آنزیم میلوپراکسیداز است (۲۱). به‌طوری‌که قبل از زمان عود بیماری، محققین کنترل افزایش MPO در خود مبتلایان بوده و درعین‌حال قبل از ورود بیماران به مرحله فروکشی بیماری، کنترل کاهش سطح فعالیت سرمی MPO بوده‌اند (۲۲). در بیماران مبتلابه اسکلروز متعدد میزان رادیکال-های آزاد و نیتریک اکسید و به دنبال آن میزان پراکسیداسیون چربی‌ها افزایش می‌یابد (۲۳). گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن و یا نیتروژن، ممکن است که باعث آسیب به غلاف میلین شوند و زمینه حمله توسط سلول‌های ماکروفاژ/ میکروگلیال را ایجاد نمایند (۲۴). نیتریک اکسید سریعاً منجر به مهار سیتوکروم c اکسیداز شده و از این طریق در زنجیره تنفسی اختلال ایجاد می‌نماید (۲۵). پراکسی‌نیتریت و دیگرگونه‌های واکنش‌پذیر NO، دارای اثرات سمی بر روی نورون‌ها، آکسون‌ها و سلول‌های گلیال می‌باشند و منجر به بروز آپوپتوز (Apoptosis) در آن‌ها می‌شوند. نحوه عملکرد NO به‌صورت غیرمستقیم بوده و با القای آزاد شدن گلوتامات توسط میکروگلیال‌ها و ماکروفاژها موجب ایجاد آسیب می‌گردد (۲۶). گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن باعث افزایش نفوذپذیری سد خونی- مغزی (Blood-Brain Barrier=BBB) شده که این اختلال منجر به افزایش نفوذ سلول‌ها به بافت عصبی می‌گردند. عامل اصلی در شکست سد خونی- مغزی (BBB) سایتوکاین IL-17 است. سایتوکاین IL-17 از طریق ایجاد گونه-های فعال اکسیژن در سلول‌های اندوتلیال مغزی منجر به پیشبرد شکست سد خونی- مغزی می‌گردد (۲۷). براین اساس این فرضیه مطرح می‌گردد که وجود عوامل آنتی‌اکسیدان مانند کورکومین از این طریق در جلوگیری از شکست سد خونی-مغزی نیز تأثیرگذار خواهند بود. درگذشته ماهیت آنتی‌اکسیدانی کورکومین مسئول بسیاری از اثرات مفید این ترکیب در اختلالات مختلف قلمداد شده است (۲۸). اثرات کورکومین بر روی رادیکال‌های آزاد از طریق چندین مکانیسم مختلف صورت می‌گیرد. کورکومین موجب خنثی‌سازی مستقیم رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن (به ترتیب ROS و RNS) می‌گردد (۲۹). در همین راستا نتایج ما نیز حاکی از کاهش قابل‌توجه سطح آنزیم نیتریک اکساید در گروه رت‌های مبتلا و تحت درمان با کورکومین نسبت به رت‌های مبتلا و بدون درمان بود. همچنین سطح فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز که در تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن سهم بسزایی دارد همسو با یافته‌های ما، در گروه رت-های مبتلا و تحت درمان با کورکومین نسبت به رت‌های مبتلا و بدون درمان کاهش یافته بود. همچنین پیشنهاد شده است که کورکومین موجب مهار آنزیم‌هایی از قبیل لیپواکسیژناز و سیکلواکسیژناز که در تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن نقش دارند نیز می‌گردد (۲۸). درنهایت نشان داده شده است که کورکومین با توجه به ماهیت لیپوفیلیک (چربی‌دوست) خود، به-عنوان یک عامل مناسب در شکست رادیکال‌های پراکسیل مطرح است (۳۰). بنابراین بخشی از اثرات مفیدی که در ارتباط با

کورکومین مشاهده شد، می‌تواند مرتبط با اثرات فوق نیز باشد. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و جاروب رادیکال‌های آزاد توسط کورکومین به دلیل ساختار شیمیایی آن گزارش شده است (۳۱). نمونه‌ای از عملکرد کورکومین در بهبود بیماری آلزایمر که در مطالعات گذشته بیان شده است، بدین‌صورت است که باعث کاهش تولید اینترفرون گاما می‌گردد و اینترفرون گاما عامل اصلی القای تولید نیتریک اکسید توسط سلول‌های ماکروفاژ / میکروگلیال به شمار می‌رود (۳۲، ۳۳).

نتایج این مطالعه حاکی از کاهش قابل‌توجه سطح MDA در مغز رت‌های مبتلا و تحت درمان با کورکومین نسبت به رت‌های مبتلا و بدون درمان شده است. MDA ازجمله شاخص‌های مهم جهت ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپیدی است (۳۴). مطالعات گذشته به‌خوبی ثابت کرده است که پتانسیل آنتی‌اکسیدانی یک ماده آنتی‌اکسیدان، الزاماً با توانایی احیاء آن ماده در احیاء آهن فریک به آهن فروس در تست FRAP ارتباط معنی‌داری نخواهد داشت. در تست FRAP اثرات آنتی‌اکسیدانی بسیاری از ترکیبات از قبیل آلبومین، بتا کاروتن و مواد حاوی گلوتاتیون نیز سنجیده نمی‌شود. بنابراین تست MDA نسبت به تست FRAP دارای ارجحیت بیشتر و دقت بالاتری است (۳۴، ۳۵). بااین‌حال تغییر معنی‌داری در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم مشاهده نگردید. این مسئله تا حدود زیادی به دلیل حساسیت بیشتر تست MDA نسبت به تست ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در تشخیص آسیب‌های اکسیداتیو است. به‌طور مشابه استقامتی و همکاران در سال ۱۳۸۰ گزارش دادند که باوجود کاهش سطح MDA در رت‌های مبتلابه دیابت نوع II، تغییر معنی‌داری در سطح ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی رخ نداد (۳۴).

کورکومین با کاهش میزان آسیب‌های اکسیداتیو باعث برگشت سطح اوریک اسید را فراهم نموده است. اسید اوریک ازجمله رفتگرهای رادیکال‌های آزاد در سرم خون است. براین اساس اسید اوریک به‌عنوان یک عامل پاک‌سازی کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن در کاهش استرس اکسیداتیو نقش دارد (۳۶، ۳۷). بنابراین کاهش اسید اوریک در مقادیر پایین‌تر از حد فیزیولوژیک احتمالاً با افزایش آسیب‌های اکسیداتیو همراه است. به‌طور جالب‌توجهی درگذشته نشان داده شده است که سطح اسید اوریک سرم در افراد مبتلابه مالتیپل اسکلروزیس از افراد سالم کمتر است که این نشان‌دهنده مصرف اسید اوریک در این افراد به جهت کاهش آسیب‌های اکسیداتیو است (۳۶).

نتیجه‌گیری

درنهایت می‌توان در نتایج نشان داد که کورکومین از طریق کاهش تولید نیتریک اکساید، کاهش فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز و کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدها، باعث بهبود درشدت علائم بیماری در رت‌های مبتلابه EAE شده است؛ بنابراین ممکن است که افزودن کورکومین به رژیم‌درمانی افراد مبتلابه MS با توجه به حاشیه سلامت بالا که در مقدمه اشاره شد، یک رهیافت سودمند باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله قسمتی از پایان‌نامه خانم لاله مودتیان دانشجوی کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی با کد ۳۷۳-۲ ع بوده که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه انجام شده است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Mao P, Reddy PH. Is multiple sclerosis a mitochondrial disease? Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. 2010;1802(1):66-79.
2. Etemadifar M, Janghorbani M, Shaygannejad V, Ashtari F. Prevalence of multiple sclerosis in Isfahan , Iran. Neuroepidemiology. 2006;27(1):39-44.
3. Bar-Or A, Pachner A, Menguy-Vacheron F, Kaplan J, Wiendl H. Teriflunomide and its mechanism of action in multiple sclerosis. Drugs. 2014;74(6):659-74.
4. Comabella M, Khoury SJ. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. Clinical Immunology. 2012;142(1):2-8.
5. Lees JR, Iwakura Y, Russell JH. Host T cells are the main producers of IL-17 within the central nervous system during initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis induced by adoptive transfer of Th1 cell lines. The Journal of Immunology. 2008;180(12):8066-72.

6. Palma M, Piñeiro Z, Barroso CG. Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents. Journal of Chromatography A. 2001;921(2):169-74.
7. Pari L, Tewas D, Eckel J. Role of curcumin in health and disease. Archives of physiology and biochemistry. 2008;114(2):127-49.
8. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. Brain. 2006;129(8):1953-71.
9. Kurd SK, Smith N, VanVoorhees A, Troxel AB, Badmaev V, Seykora JT, et al. Oral curcumin in the treatment of moderate to severe psoriasis vulgaris: A prospective clinical trial. Journal of the American Academy of Dermatology. 2008;58(4):625-31.
10. Moreillon JJ, Bowden RG, Deike E, Griggs J, Wilson R, Shelmadine B, et al. The use of an anti-inflammatory supplement in patients with chronic kidney disease. Journal of Complementary and Integrative Medicine. 2013;10(1):143-52.
11. Basnet P, Skalko-Basnet N. Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. Molecules. 2011;16(6):4567-98.
12. Kaplan A, Abidi E, Ghali R, Booz GW, Kobeissy F , Zouein FA. Functional, cellular, and molecular remodeling of the heart under influence of oxidative cigarette tobacco smoke. Oxidative medicine and cellular longevity. 2017; 61(2): 567-73.
13. Biswas J, Coltin B, Veloso M, editors. Corrective gradient refinement for mobile robot localization. Intelligent Robots and Systems (IROS), 2011 IEEE/RSJ International Conference on; 2011: IEEE.
14. Chen GQ, Chen YY, Wang XS, Wu SZ, Yang HM, Xu HQ, et al. Chronic caffeine treatment attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis induced by guinea pig spinal cord homogenates in Wistar rats. Brain research. 2010; 309(1):16-25.
15. Khezri S, Abtahi Froushani SM, Shahmoradi M. Nicotine Augments the Beneficial Effects of Mesenchymal Stem Cell-based Therapy in Rat Model of Multiple Sclerosis. Immunological investigations. 2018;47(2):113-24.
16. Skundric DS, Zakarian V, Dai R, Lisak RP, Harley YT, James J. Distinct immune regulation of the response to H-2b restricted epitope of MOG causes relapsing–remitting EAE in H-2b/s mice .Journal of neuroimmunology. 2003;136(1):34-45.
17. Soetikno V, Sari FR, Veeraveedu PT, Thandavarayan RA, Harima M, Sukumaran V, et al. Curcumin ameliorates macrophage infiltration by inhibiting NF-κB activation and proinflammatory cytokines in streptozotocin induced-diabetic nephropathy. Nutrition & Metabolism. 2011;8(1):35.
18. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical biochemistry. 1996;239(1):70-6.
19. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Byrne DH. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of food composition and analysis. 2006;19(6-7):669-75.
20. McColl SR, Staykova MA ,Wozniak A, Fordham S, Bruce J, Willenborg DO. Treatment with anti-granulocyte antibodies inhibits the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. The Journal of Immunology. 1998;161(11):6421-6.
21. Shankar E, Goel A, Gupta K, Gupta S. Plant Flavone Apigenin: an Emerging Anticancer Agent. Current Pharmacology Reports. 2017;3(6):423-46.
22. Zakrzewska-Pniewska B, Styczynska M, Podlecka A, Samocka R, Peplonska B, Barcikowska M, et al. Association of apolipoprotein E and myeloperoxidase genotypes to clinical course of familial and sporadic multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Journal. 2004;10(3):266-71.
23. Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. Chemical research in toxicology. 2007;21(1):172-88.
24. Zargari M, Allameh A, Sanati MH, Tiraihi T, Lavasani S, Emadyan O. Relationship between the clinical scoring and demyelination in central nervous system with total antioxidant capacity of plasma during experimental autoimmune encephalomyelitis development in mice. Neuroscience letters. 2007;412(1):24-8.
25. Sasaoka T. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: friend and foe. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2012;39(7):597-8.
26. Herz J, Zipp F, Siffrin V. Neurodegeneration in autoimmune CNS inflammation. Experimental neurology. 2010;225(1):9-17.
27. Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. Scandinavian journal of immunology. 2011;74(1):1-13.
28. Lin YG, Kunnumakkara AB, Nair A, Merritt WM, Han LY, Armaiz-Pena GN, et al. Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in ovarian carcinoma by targeting the nuclear factor-κB pathway. Clinical Cancer Research. 2007;13(11):3423-30.
29. Menon VP, Sudheer AR. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease: Springer; 2007. p. 105-25.
30. Priyadarsini KI, Maity DK, Naik G, Kumar MS, Unnikrishnan M, Satav J, et al. Role of phenolic OH and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. Free Radical Biology and Medicine. 2003;35(5):475-84.

31. Hosseinimehr SJ. A review of preventive and therapeutic effects of curcumin in patients with cancer. Clinical Excellence. 2014;2(2):50-63. [In Persian]
32. Mishra S, Palanivelu K. The effect of curcumin (turmeric) on Alzheimer's disease: An overview. Annals of Indian Academy of Neurology. 2008;11(1):13.
33. Venigalla M, Gyengesi E, Münch G. Curcumin and Apigenin–novel and promising therapeutics against chronic neuroinflammation in Alzheimer's disease. Neural regeneration research. 2015;10(8):1181.
34. Esteghamati A, Zarban A, Doosti M. Evaulation of antioxidant status and oxidative stress markers in type II diabetes mellitus. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism. 2001;3(4):239-45.
35. Keles GE, Lamborn KR, Berger MS. Low-grade hemispheric gliomas in adults: a critical review of extent of resection as a factor influencing outcome. Journal of neurosurgery. 2001;95(5):735-4.
36. Liu B, Shen Y, Xiao K, Tang Y, Cen L, Wei J. Serum uric acid levels in patients with multiple sclerosis: a meta-analysis. Neurological research. 2012;34(2):163-71.
37. Drulovic J, Dujmovic I, Stojsavljevic N, Mesaros S, Andjelkovic S, Miljkovic D ,et al. Uric Acid and MS. Eur J Neurol. 2002;9(3):221-6.

Original Article

Curcumin Ameliorates Oxidative Stress in Animal Models of Multiple Sclerosis

Mavaddatiyan L[1], Khezri Sh[1*], Abtahi Froushani SM[2]

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran
2. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 04 May 2018 Accepted: 18 Jan 2019

Abstract

Background & Objectives: The role of oxidative stress in the pathogenesis of Multiple Sclerosis (MS) has been mentioned in previous studies. Curcumin is an active ingredient in *Curcuma longa* and has anti-inflammatory properties. The aim of this study was to investigate the effects of curcumin on reducing the oxidative stress in the animal model of MS.

Materials & Methods: In this study, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a MS model was induced by immunizing of Wistar rats (n=12) with homogenized spinal cord of guinea pig and Freund's complete adjuvant. Then, the immunized animals were divided in two equal groups. Treatment was curcumin (100 mg/kg daily) was started from the day 12 after the immunization when the rats showed the first symptoms of neurologic disability and continued until the day 24 when the rats were sacrificed. Simultaneously, the control group received the distilled water. Treatment was continued until 24 days after the immunization.

Results: The consumption of curcumin in the EAE-treated rats caused a significant decrease in nitric oxide level and activity of serum myeloperoxidase enzyme activity ($p<0.05$). At the same time, the malondialdehyde level in the brain tissue decreased ($p<0.05$). However, no significant change in the total antioxidant capacity of the serum ($p>0.05$) was observed. Moreover, the serum uric acid level increased in rats after curcumin treatment and reached the level of healthy rats ($p<0.05$).

Conclusion: Using a 100 mg/kg curcumin in the rats with EAE cause to reduce the harmful effects of oxidative damage and can be effective in MS treatment.

Keywords: Multiple Sclerosis, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, Curcumin, Oxidative stress

***Corresponding Author: : : Khezri Shiva,** Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran
E-mail: sh.khezri@urmia.ac.ir
http://orcid.org/0000-0001-8692-8915

Journal of Fasa University of Medical Sciences 9 (2019): 1267-1276