

## کورکومین سبب کاهش استرس اکسیداتیو در مدل حیوانی مالتیپل اسکلروزیس می‌شود

لاله مودتیان<sup>۱</sup>، شیوا خضری<sup>۱\*</sup>، سید میثم ابطحی فروشانی<sup>۲</sup>

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۱۰/۲۸

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۲/۱۴

## 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 کوچک‌هندی 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 آسان‌گشی 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

سال‌های اخیر پیشرفت‌های مناسبی در امر کنترل پیشرفت بیماری مالتیپل اسکلروزیس ایجاد شده است، با این حال 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 دارای یک ماهیت

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

\*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

نشده است. لذا مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثرات کورکومین در کاهش آثار ناشی از استرس اکسیداتیو در مدل EAE طراحی شده است.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی که به صورت موردی/کنترلی انجام شده است، جامعه مورد مطالعه، شامل رت‌های ماده نژاد ویستار با محدوده سنی ۵ تا ۶ هفته نابالغ و میانگین وزنی ۹۰-۱۱۰ گرم است که از حیوان خانه دانشکده علوم دانشگاه ارومیه خریداری شد. حیوانات تحت شرایط استاندارد  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی  $50 \pm 10$  درصد نگهداری شدند. تمام حیوانات تحت شرایط تغذیه‌ای یکسان با کسانتره دامی به نسبت‌های برابر تغذیه شده و امکان دسترسی آزاد به آب نیز برای تمامی حیوانات وجود داشت. به منظور 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 تأیید در کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه (کد ۳۷۳-۲ ع) انجام شد.

**روش القا EAE:** در ابتدا بافت هموزن نخاع خوکیچه‌هندی به نسبت ۱ به ۱ با ادجوانت کامل فروند (Compound Freund's Adjuvant=CFA) (sigma Aldrich- امریکا) محتوی ۱۰ میلی-گرم بر کیلوگرم پیکره کشته شده مایکوباکتریوم، به حالت امولسیون درآمد. جهت تهیه سوسپانسیون مزبور از دو سرنگ شیشه‌ای که توسط رابطی از جنس استیل به هم متصل هستند، استفاده گردید. در یکی از سرنگ‌ها محلول بافت مغز و نخاع هموزن شده خوکیچه و سرنگ دیگر محتوی هم‌حجم آن CFA وارد شده و عمل پر و خالی کردن سرنگ‌ها به نوبت تا حصول امولسیون سفیدرنگ، یکنواخت و با قوام ادامه یافت. همچنین قابل ذکر 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 به صورت زیر جلدی در ناحیه پشت و ۱۰۰

خودالت‌هایی 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 مورد توجه 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 ضدالت‌هایی 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 آنتی-اکسیدانی و ضد میکروبی را به وجود کورکومین نسبت می‌دهند (۸، ۹). کورکومین دارای مولکول‌های بسیار پویا و توانای پلیوترونی (Pleiotropic) هستند که در تعامل با مولکول‌های فراوان درگیر در التهاب می‌باشند. گروه‌های هیدروکسی کورکومین برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و گروه‌های متوکسی برای فعالیت ضدالت‌هایی و ضدتکثیری آن ضروری هستند. کورکومین در آب و اتر، نامحلول و در اتانول، دی‌متیل سولفید اکسید (DMSO یا Dimethyl sulfoxide) و استون، قابل حل است (۱۰). ترکیبات شبه کورکومینی به‌عنوان یک ترکیب سالم و باقابلیت تحمل بالا توسط FDA (سازمان غذا و داروی ایالات متحده) پذیرفته شده است. دوز توصیه شده 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). در گذشته به اهمیت آسیب‌های اکسیداتیو در روند بیماری‌زایی مالتیپل اسکلروزیس اشاره شده است (۱۲) و درعین حال شواهد محکمی دال بر اثرات آنتی‌اکسیدانی کورکومین ارائه شده است (۱۳). باین‌حال تاکنون در مورد اثرات مفید کورکومین با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدان آن در مدل‌های تجربی MS انجام

استاندارد نیتريت سدیم تعیین گردید. به‌طور خلاصه، ۱۰۰ μL از سرم به‌صورت دوتایی به داخل چاهک‌های پلت ۹۶ خانه‌ای ته-تخت ریخته شد. سپس ۱۰۰ μL از محلول ۱ درصد سولفانیل آمید (شرکت Sigma - آمریکا) به چاهک‌ها اضافه شد. پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق نگهداری شد. آنگاه به تمام حفره‌ها ۱۰۰ μL از محلول ۱ درصد N-۱- نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدرو کلراید (شرکت Sigma - آمریکا) اضافه شد و بار دیگر به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق نگهداری شد. درنهایت جذب نوری نمونه در طول موج ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه الیزانگار (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) 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 طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط الیزاریدر خوانده شد.

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

محلول ۱: (بافر استات ۳۰۰ میلی‌مولار)، محلول ۲: TPTZ (2, 4, 6- tripyridyl-s-triazine) ۱۰ میلی‌مولار در ۴۰ میلی‌مولار (HCl)؛ محلول ۳:  $FeCl_3$  ۰/۰۵۴۰ گرم 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 سانتریفیوژ 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 اسپکتروفوتومتر (2100 UNICO آمریکا) خوانده شد (۱۹).

**تست MDA (Malondialdehyde):** نمونه بافت مغز که پس از بیپهوشی (توسط کتامین ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و با

میکرولیتر در ناحیه بالشتک کف پا (Foot Pad) هر حیوان با سوزن ۲۵ گیج تزریق گردید. مقدار  $10^9$  باکتری برودتلا پارپرتوسیس (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 در حرکت دم، دو: فلج شدن دم، سه: فلجی دو پا، چهار: فلجی چهار دست‌وپا، پنج: مرگ (۱۶).

درمان رت‌های مبتلابه EAE با کورکومین (sigma - آمریکا): 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 گاوژ 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 القاء) تحت درمان با حلال دارو (آب مقطر) با حجم ۲۰۰ میکرولیتر قرار گرفتند.

گروه کنترل: ۶ سر رت که از نظر 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 میلی‌گرم 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 نیتريك اکسید:** میزان تولید نیتريك اکسید توسط روش رنگ‌سنجی گریس (Griess) و استفاده از منحنی

شدند. حداکثر طی ۶۰ دقیقه و در حداکثر جذب ۵۴۶ نانومتر، جذب نوری استاندارد و نمونه‌ها اندازه‌گیری گردید. فرمول محاسبه:

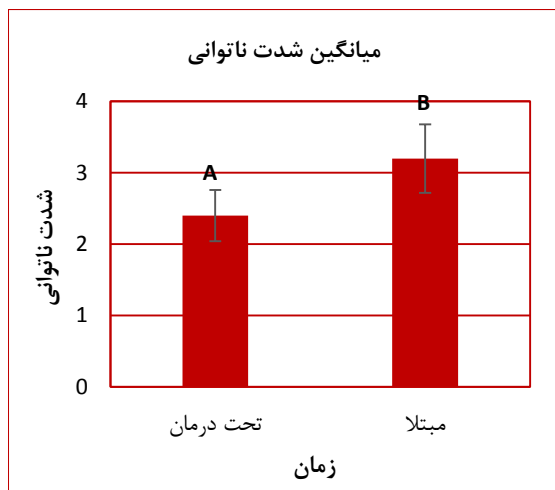
$$\text{Uric Acid } \left( \frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right) = \frac{\Delta A \text{ Sample}}{\Delta A \text{ STD/Cal}} / \text{dl} * \text{Conc. Std/Cal (mg)}$$

\* Std معادل standard، Cal معادل Calibration و  
 Conc معادل Concentration  
 $\text{mg/dl} \times 59.5 = \mu\text{mol/l}$  \*

**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 ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel Microsoft (۲۰۱۳) استفاده شد. داده‌ها به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SD}$  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 مورد مطالعه. حرف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$  است.

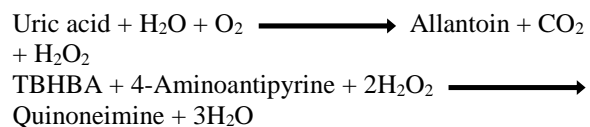
گروه رت‌های مبتلا و تحت درمان در مقایسه با رت‌های مبتلا ولی بدون درمان کمتر بود ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۲). سطح مالون-

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  $4^{\circ}\text{C}$  سانتریفیوژ گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به لوله‌آزمایش منتقل و با ۳۰۰ میکرولیتر از تیوباربیتوریک اسید (Thiobarbituric acid=TBA) ۰.۶٪ در دمای  $100^{\circ}\text{C}$  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 طول موج ۵۳۵ نانومتر در مقابل بلانک ارزیابی گردید.

### تست اسیداوریک

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

### اساس آزمایش

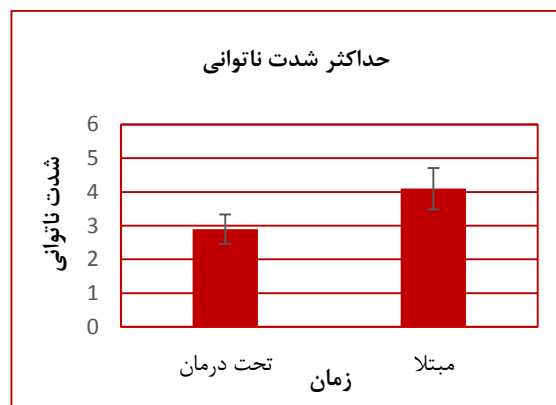


### روش انجام تست

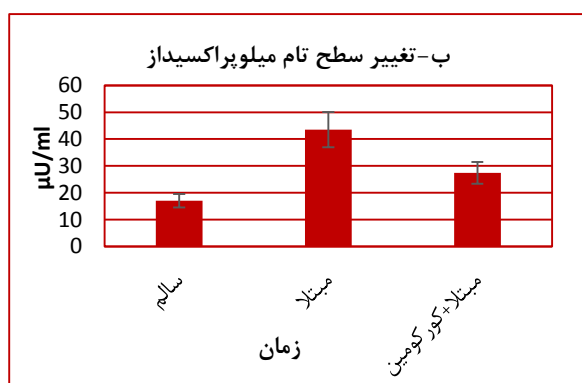
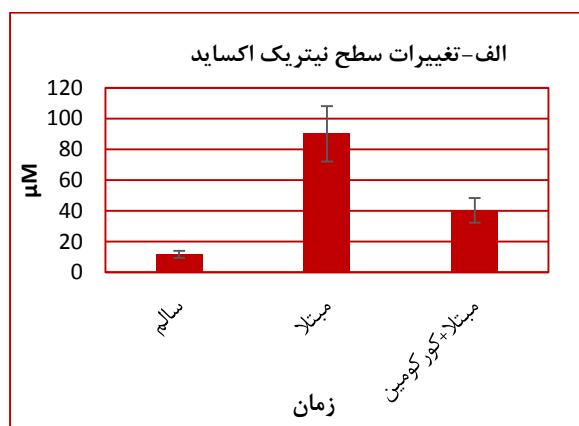
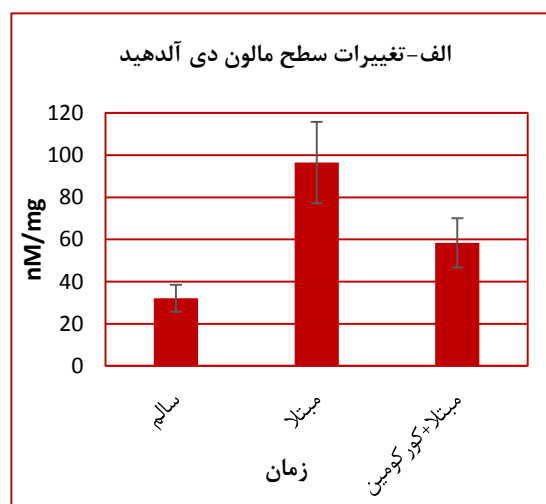
برای انجام تست، در ۶ لوله‌آزمایش توسط سمپلیر ۵۰ میکرولیتر سرم داخل لوله‌های آزمایش اول تا چهارم و در لوله پنجم ۲۰ میکرولیتر محلول استاندارد ریخته و در لوله ششم نیز ۲۰ میکرو لیتر بلانک (آب مقطر) ریخته شد. سپس محلول مخلوط‌شده معرف‌های ۱ (بافر فسفات ۱۰۰ مول بر لیتر و TBHBA ۱ مول بر لیتر) و ۲ (بافر فسفات ۱۰۰ مول بر لیتر، اوریکاز ۱۰ مول بر لیتر، آمینوآنتی پیرین 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

دی آلدیید که شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدی است در بافت مغز رت‌های مبتلا به EAE افزایش معنی‌داری یافت ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۳- قسمت الف). درمان با کورکومین در رت‌های مبتلا سطح پراکسیداسیون لیپیدی نسبت به رت‌های مبتلا و بدون درمان کاهش معنی‌داری یافت ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۳- قسمت الف). سطح تام آنتی‌اکسیدان‌های سرمی در گروه رت‌های مبتلا نسبت به رت‌های سالم کاهش یافت ( $p < 0.05$ ). باین حال سطح تام آنتی‌اکسیدان‌های بافت مغز به دنبال تیمار با کورکومین افزایش معنی‌داری را نشان نداد ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۳- قسمت ب).

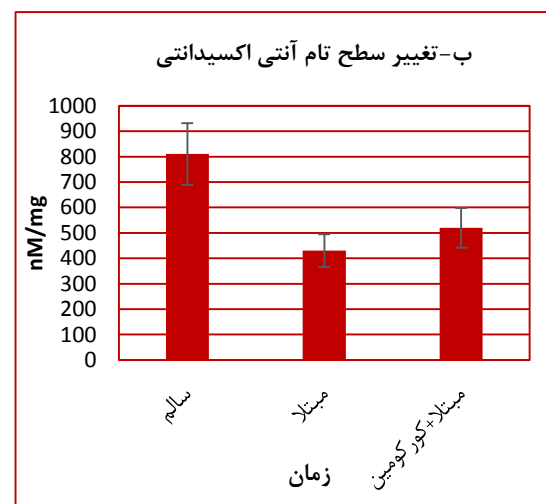
تست گریس یک ارزیابی کلی از سطح سرمی نیتریک اکسید (واسطه فعال نیتروژن) را ارائه می‌دهد. نتایج حاصل نشان داد که کورکومین موجب کاهش معنی‌دار سطح نیتریک اکسید سرمی در رت‌های مبتلا نسبت به گروه کنترل (مبتلا و بدون درمان گردید ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۴- قسمت الف). ابتلا به EAE موجب



نمودار ۲- حداکثر شدت ناتوانی در رت‌های مورد مطالعه. حرف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$  است.



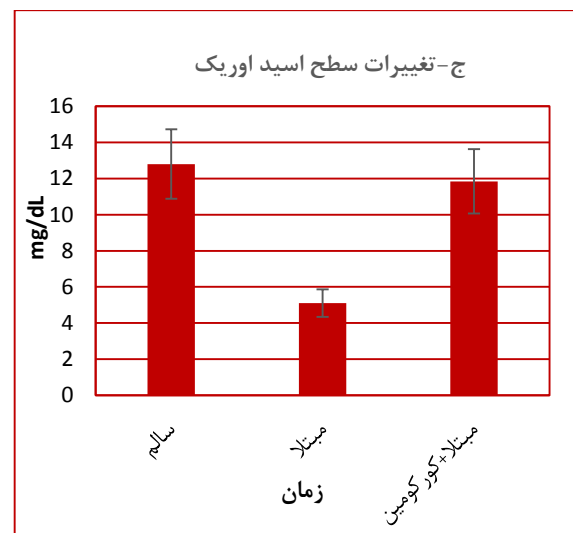
نمودار ۴- تغییر سطح فاکتورهای عوامل مؤثر در ایجاد اکسیداتیو در سرم رت‌های مورد مطالعه. الف- تغییرات سطح نیتریک اکساید. ب- تغییر سطح تام میلو پراکسیداز. ج- تغییرات سطح اسید اوریک. حرف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$  است.



نمودار ۳- تغییر سطح فاکتورهای استرس اکسیداتیو در مغز رت‌های مورد مطالعه. الف- تغییرات سطح مالون دی آلدیید. ب- تغییر سطح تام آنتی‌اکسیدان‌های. حرف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$  است.

نيتروژن، ممكن است كه باعث آسيب به غلاف ميلين شوند و زمينه حمله توسط سلول‌هاي ماكروفاژ/ ميكروگليال را ايجاد نمايند (۲۴). نيتريك اكسيد سريعاً منجر به مهار سيتوكروم c اكسيداز شده و از اين طريق در زنجيره تنفسي اختلال ايجاد مي‌نمايد (۲۵). پراكسي‌نيتريت و ديگرگونه‌هاي واكنش‌پذير NO، داراي اثرات سمى بر روى نوروها، آكسون‌ها و سلول‌هاي گليال مي‌باشند و منجر به بروز آپوپتوز (Apoptosis) در آن‌ها مي‌شوند. نحوه عملكرد NO به‌صورت غيرمستقيم بوده و با القاي آزاد شدن گلوتامات توسط ميكروگليال‌ها و ماكروفاژها موجب ايجاد آسيب مي‌گردد (۲۶). گونه‌هاي فعال اكسيژن و نيتروژن باعث افزايش نفوذپذيري سد خوني- مغزي (Blood-Brain Barrier=BBB) شده كه اين اختلال منجر به افزايش نفوذ سلول‌ها به بافت عصبي مي‌گردند. عامل اصلي در شكست سد خوني- مغزي (BBB) سايتوكاين IL-17 است. سايتوكاين IL-17 از طريق ايجاد گونه-هاي فعال اكسيژن در سلول‌هاي اندوتليال مغزي منجر به پيشبرد شكست سد خوني- مغزي مي‌گردد (۲۷). براي اساس اين فرضيه مطرح مي‌گردد كه وجود عوامل آنتي‌اكسيدان مانند كوركومين از اين طريق در جلوگيري از شكست سد خوني- مغزي نيز تأثيرگذار خواهند بود. در گذشته ماهيت آنتي‌اكسيداني كوركومين مسئول بسياري از اثرات مفيد اين تركيب در اختلالات مختلف قلمداد شده است (۲۸). اثرات كوركومين بر روى راديكال‌هاي آزاد از طريق چندين مكانيسم مختلف صورت مي‌گيرد. كوركومين موجب خنثي‌سازي مستقيم راديكال‌هاي آزاد اكسيژن و نيتروژن (به ترتيب ROS و RNS) مي‌گردد (۲۹). در همين راستا نتايج ما نيز حاكي از کاهش قابل توجه سطح آنزيم نيتريك اكسايده در گروه رت‌هاي مبتلا و تحت درمان با كوركومين نسبت به رت‌هاي مبتلا و بدون درمان بود. همچنين سطح فعاليت آنزيم ميلوپراكسيداز كه در توليد راديكال‌هاي آزاد اكسيژن سهم بسزايي دارد همسو با يافته‌هاي ما، در گروه رت‌هاي مبتلا و تحت درمان با كوركومين نسبت به رت‌هاي مبتلا و بدون درمان کاهش يافته بود. همچنين پيشنهاده شده است كه كوركومين موجب مهار آنزيم‌هايي از قبيل ليوواكسيژناز و سيكلواكسيژناز كه در توليد راديكال‌هاي آزاد اكسيژن و نيتروژن نقش دارند نيز مي‌گردد (۲۸). در نهايت نشان داده شده است كه كوركومين با توجه به ماهيت ليوپوفيليك (چربي دوست) خود، به عنوان يك عامل مناسب در شكست راديكال‌هاي پراكسيل مطرح است (۳۰). بنابراین بخشی از اثرات مفیدی که در ارتباط با

افزايش سطح NO در سرم حيوانات مبتلا شد (نمودار ۴- قسمت الف). با اين حال درمان با كوركومين موجب کاهش معني‌دار مقدار ميلوپراكسيداز سرمي در رت‌هاي مبتلا و تحت درمان نسبت به گروه كنترل به‌طور معني‌داري شد ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۴- قسمت ب). سطح اسيد اوريك در رت‌هاي مبتلا نسبت به رت‌هاي سالم کاهش معني‌داري يافت ( $p < 0.05$ ). درمان با كوركومين در رت‌هاي مبتلا سطح اسيد اوريك را افزايش داد به‌طوري كه سطح آن با سطح رت‌هاي سالم تفاوت معني‌داري نداشت ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۴- قسمت ج).



نمودار ۴- تغيير سطح فاكترهاي عوامل مؤثر در ايجاد اكسيداتيو در سرم رت‌هاي مورد مطالعه. الف- تغييرات سطح نيتريك اكسايده. ب- تغيير سطح تام ميلو پراكسيداز. ج- تغييرات سطح اسيد اوريك. حرف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معني‌دار در سطح  $p < 0.05$  است.

## بحث

مطالعات حيواني در مورد مدل تجربي MS نشان داده است كه تخليه نوتروفيل‌ها موجب کاهش قابل توجه در شدت بيماري EAE شده است (۲۰). در اين زمينه پيشنهاده شده است كه يكي از مهم‌ترين عملكردهاي نوتروفيل در ايجاد بيماري‌زايي MS و EAE توليد آنزيم ميلوپراكسيداز است (۲۱). به طوري كه قبل از زمان عود بيماري، محققين كنترل افزايش MPO در خود مبتلايان بوده و در عين حال قبل از ورود بيماران به مرحله فروكشي بيماري، كنترل کاهش سطح فعاليت سرمي MPO بوده‌اند (۲۲). در بيماران مبتلا به اسكلروز متعدد ميزان راديكال‌هاي آزاد و نيتريك اكسيد و به دنبال آن ميزان پراكسيداسيون چربي‌ها افزايش مي‌يابد (۲۳). گونه‌هاي واكنش‌پذير اكسيژن و يا



سطح اوریک اسید را فراهم نموده است. اسید اوریک از جمله 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 جالب توجهی در گذشته 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

در نهایت می‌توان در نتایج نشان داد که کور کومین از طریق کاهش تولید نیتریک اکساید، کاهش فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز و کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدها، باعث بهبود در شدت علائم بیماری در رت‌های مبتلابه EAE شده است؛ بنابراین ممکن است که افزودن کور کومین 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 منافی را اعلام نکرده‌اند.

کور کومین مشاهده شد، می‌تواند مرتبط با اثرات فوق نیز باشد. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و جاروب رادیکال‌های آزاد توسط کور کومین به دلیل ساختار شیمیایی آن گزارش شده است (۳۱). نمونه‌ای از عملکرد کور کومین 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 کور کومین نسبت به رت‌های مبتلا و بدون درمان شده است. MDA از جمله 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 گلوکاتینون نیز سنجیده نمی‌شود. بنابراین تست MDA نسبت به تست FRAP دارای ارجحیت بیشتر و دقت بالاتری است (۳۴، ۳۵). با این حال 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 با وجود کاهش سطح MDA در رت‌های مبتلابه دیابت نوع II، تغییر معنی‌داری در سطح ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی رخ نداد (۳۴).

کور کومین با کاهش میزان آسیب‌های اکسیداتیو باعث برگشت

### 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- $\kappa$ B 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- $\kappa$ B 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. Evaluation 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<sup>1</sup>, Khezri Sh<sup>1\*</sup>, Abtahi Froushani SM<sup>2</sup>

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>