



The study of the neuroprotective effects of curcumin, against homocysteine intracerebroventricular injection –induced cognition impairment and oxidative stress in the rat

Masoumeh Sabetkasaei ^{1,3*}, Amin Ataie ^{1,3}, Abbas Haghparast ¹,
Akbar Hajizadeh Moghaddam ², Ramin Ataie ⁴, Shiva Nasiraei ¹

1. Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University, M.C., P.O. Box 19615-1178, Tehran, Iran

2. Departments of Biology, Mazandaran University, Babolsar, Iran

3. Departments of Pharmacology, Shahid Beheshti University, M.C., P.O. Box 19615-1176, Tehran, Iran

4. Departments of Pharmacology, Tehran University

Received: 16 July 2009

Accepted: 3 Nov 2009

Abstract

Introduction: Aging is the major risk factor for neurodegenerative diseases and oxidative stress is involved in the pathophysiology of these diseases. Oxidative stress can induce neuronal damages and modulate intracellular signaling, ultimately leading to neuronal death by apoptosis or necrosis.

Methods: In this study, we investigated the possible antioxidant and neuroprotective properties of the polyphenolic antioxidant compound, Curcumin against homocysteine (Hcy) neurotoxicity. Curcumin (5, 15, 45 mg/kg) was injected intraperitoneally once daily for a period of 10 days beginning 5 days prior to Hcy (0.2 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$) intracerebroventricular injection in rats. Biochemical and behavioral studies, including passive avoidance learning and locomotor activity tests were studied 24 h after the last curcumin or its vehicle injection. Also Histopathological studies and cell density in different regions of hippocampus was investigated.

Results: Hcy could induce lipid peroxidation and increase MDA and SOA levels in rats' brain. Additionally, Hcy impaired memory retention in passive avoidance learning test. However, Curcumin treatment decreased MDA and SOA levels significantly as well as improved learning and memory in rats. Histopathological analysis also indicated that Hcy could decrease hippocampus cell count and Curcumin inhibited this toxic effect.

Conclusion: These results suggest that Hcy may induce lipid peroxidation in rats' brain and decrease hippocampus cells. Also polyphenol treatment (Curcumin) has the ability to improve learning and memory deficits by protecting the nervous system against Oxidative stress.

Keywords: Homocysteine, Curcumin, Lipid peroxidation, Oxidative Stress.

* Corresponding author e- mail: fksaei@yahoo.com

Available online @: www.phypha.ir/ppj

مطالعه تجربی اثر محافظت نوروئی کورکومین در پیشگیری از اختلالات ساختی و استرس اکسیداتیو ناشی از تزریق داخل بطنی مغزی هوموسیستین در موش صحرایی

معصومه ثابت کسای^{۱*}، امین عطایی^۱، عباس حق پرست^۱، اکبر حاجی زاده مقدم^۲، رامین عطایی^۳، شیوا نصیری^۱
۱. مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
۲. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه علوم پایه بابل
۳. گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴. گروه فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران

پذیرش: ۱۲ آبان ۸۸

دریافت: ۲۵ تیر ۸۸

چکیده

مقدمه: کهولت سن، از علل مهم بیماری‌های نورودژنراتیو مانند آلزایمر و پارکینسون محسوب می‌گردد. شواهد بسیاری دلالت بر دخالت استرس اکسیداتیو در پاتوفیزیولوژی این بیماری‌ها وجود دارد. در این مطالعه تجربی، اثر آنتی‌اکسیدانت کورکومین در مقابل سمیت عصبی ناشی از هوموسیستین بررسی شده است.
روش‌ها: در این مطالعه کورکومین در مقادیر ۵، ۱۵ و ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بطور داخل صفاقی در موش صحرایی و یکبار تزریق در روز در یک دوره ۱۰ روزه تزریق شد و شروع تزریقات ۵ روز پیش از تزریق داخل بطنی مغزی (i.c.v) هوموسیستین (0.2 μmol/μl) بوده است. آزمون‌های رفتاری، بیوشیمیایی و بافت‌شناسی در گروه‌های جداگانه ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق کورکومین و یا حامل آن انجام شد. آزمون‌های رفتاری شامل تست اجتناب غیرفعال و بررسی فعالیت حرکتی بوده است. در بررسی بیوشیمیایی غلظت مالوندی‌آلدهید (MDA) و آنیون سوپراکساید (SOA) در بافت هوموژن مغز موش اندازه‌گیری شد. همچنین بررسی‌های بافت‌شناسی نشان داد که هوموسیستین قادر به کاهش تعداد سلول‌های هیپوکامپ می‌باشد و با مصرف کورکومین این کاهش مهار شد.
یافته‌ها: نتایج حاصله حاکی از آن است که هوموسیستین موجب القاء لیپید پراکسیداسیون در مغز رت و افزایش سطح غلظت مالوندی‌آلدهید و آنیون سوپراکسید در آن شده و از طرف دیگر سبب اختلال در ضبط حافظه در موش گردید. از طرفی کورکومین از مغز موش در مقابل لیپید پراکسیداسیون محافظت نمود.
نتیجه‌گیری: ترکیبات پلی‌فنل آنتی‌اکسیدانت ممکن است سیستم عصبی را در مقابل استرس اکسیداتیو ناشی از هوموسیستین محافظت کرده و سبب بهبود حافظه و یادگیری شوند. لذا احتمال است تجویز کورکومین در پیشگیری از برخی اختلالات دژنراتیو سیستم عصبی موثر واقع گردد.

واژه‌های کلیدی: کورکومین، هوموسیستین، لیپید پراکسیداسیون، استرس اکسیداتیو.

مقدمه

سولفور می‌باشد که یک نوروٹوکسین بسیار قوی محسوب می‌گردد. نشان داده شده است که افزایش سطح هوموسیستین خون بیش از 14 μM (*Hyper-Homocysteinemia*)، نقش مهمی را در پاتولوژی بیماری آلزایمر (AD) و کاهش قوه ادراکی ایفا می‌کند [3]. هوموسیستین آگونیست گلوتامات بوده و سبب افزایش ورود کلسیم به سلول (Ca²⁺influx) از طریق

هوموسیستین (*Homocysteine*) یک آمینواسید حاوی

fkasaei@yahoo.com

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

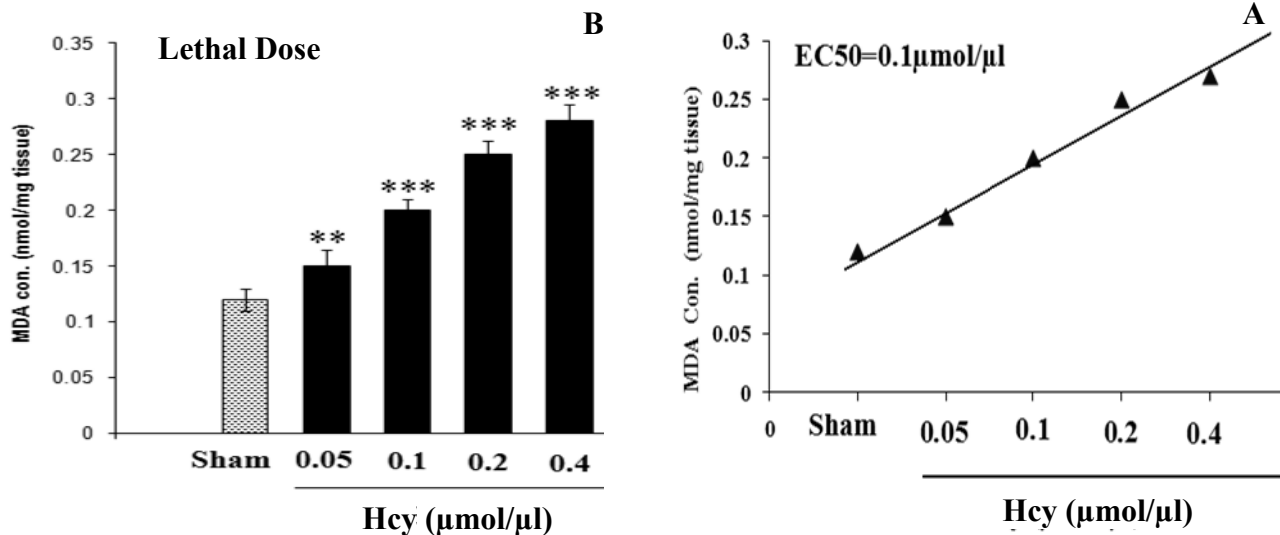
وبگاه مجله:

فعال کردن گیرنده (NMDA) می‌گردد که نهایتاً منجر به مرگ سلولی و آپوپتوز (*Apoptosis*) می‌شود [9]. بیماری آلزایمر یک دمانس (*Dementia*) پیشرفته بوده که بطور نورپاتولوژیک با کاهش گسترده تعداد نورون‌های مغز و رسوب پروتئین آمیلوئیدبتا (A β) در جدار عروق و گسترش پلاک‌های نوروتیک و ظهور کلاف‌های داخل سلولی فیبریلار (*Neurofibrillary tangle*) همراه می‌باشد. این اختلالات به ویژه مناطق کورتکس، هیپوکامپ و لوپ‌های میانی و تمپورال را درگیر می‌سازد. از دیگر آثار آلزایمر کاهش غلظت نوروترانسمیتر استیل کولین می‌باشد که این مسئله با وخامت بیماری همراه است. این بیماری همچنین با اضمحلال و دژنراسیون نورونی و اختلالات شناختی و ادراکی توأم است. تحقیقات اخیر بر پایه مطالعه عوامل پاتوژن بیماری آلزایمر صورت می‌پذیرد، استرس اکسیداتیو (*Stress Oxidative*) از علل غیر ژنتیکی ابتلا به آلزایمر نوع پراکنده (*Sporadic AD*) محسوب شده و منجر به ایجاد رادیکال اکسیژن آزاد می‌گردد که امکان تشکیل پلاک را در سیستم عصبی مرکزی تشدید می‌کند. ایجاد رادیکال آزاد یک حالت متابولیسم هوازی است. این اتفاق بواسطه فعل و انفعالات بیوشیمیایی و پروسه‌های متابولیک اتفاق می‌افتد. رادیکال‌های اکسیژن منجر به آثار مخربی بر مواد تشکیل دهنده سلول شامل پروتئین‌ها، DNA و لیپیدها می‌گردد. ویژگی‌های منحصر بفرد بیوشیمیایی و فیزیولوژیک مغز که شامل غلظت بالای لیپید و نیاز مبرم به اکسیژن و انرژی می‌باشد، سلول‌های مغز را مستعد حمله رادیکال‌های اکسیژن می‌سازد [6].

کورکومین (*Curcumin*) ماده اولیه اصلی فعال از روغن استخراج شده از ساقه زیرزمینی (ریزم) زرد چوبه هندی (*Curcuma Langa*) می‌باشد و دارای اثرات آنتی‌اکسیدانت قوی و اثر ضدالتهاب با خواص محافظتی در بافت‌های حیاتی میباشد. کورکومین با پروتئین کیناز C و تنظیم کلسیم ارتباط پیدا می‌کند. ادعا می‌شود که افزایش کلسیم سیتوزول ممکن است سبب افزایش اکسیژن فعال (ROS) گردد. مشخص گردیده است که اثر آنتی‌اکسیدانت و آنتی‌آزویژنیک (*Antiangiogenic*) کورکومین به جهت مهار ورود کلسیم و مهار پروتئین کیناز C می‌باشد. تحقیقات متعددی مبنی بر خواص آنتی‌اکسیدانت منحصر بفرد، اثر ضد موتاسیون، اثر ضدتومور و خاصیت آنتی‌کارسینوژیک و ضدکلسترول خون

کورکومین نیز گزارش گردیده است [14]. اثر آنتی‌اکسیدانت کورکومین برابر با ویتامین C و ویتامین E می‌باشد [5]. در مطالعات بسیاری نشان داده شده است که کورکومین یک پاک‌کننده رادیکال اکسیژن ROS است که منجر به تخریب اکسیداتیو می‌گردد. مطالعات بر روی مدل‌های حیوانی حاکی از آن است که کورکومین از پراکسیداسیون لیپیدی جلوگیری می‌کند و در حفاظت سلول‌های کلیه و اندوتلیال عروق نیز موثر است [5]. در مطالعه دیگری دیده شده است که کورکومین مرگ سلولی ناشی از کاینیک اسید در هیپوکامپ موش را تخفیف می‌دهد. کاینیک اسید (KA) منجر به استرس اکسیداتیو و مرگ سلولی در هیپوکامپ می‌گردد. مطالعات اخیر بیانگر این موضوع است که کورکومین به عنوان آنتی‌اکسیدانت از استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند. همچنین طی مطالعه‌ای به روش هیستولوژیک (TUNEL) موش‌های تحت درمان با کورکومین با کاهش مرگ سلولی در هیپوکامپ مواجه بوده‌اند [21]. کورکومین سبب مهار آنزیم اشباع‌کننده لیپیدی (*Desaturase*) و سبب افزایش اسید چرب آلفالینولئیک (*α -Linoleic acid*) گردیده که بیانگر این موضوع است که متابولیسم اسیدهای چرب غیراشباع تحت تأثیر قرار می‌گیرد [14]. بنابراین کورکومین یا ماده موثره روغن زردچوبه سبب تحریک فعالیت آنزیم‌هایی می‌گردد که در سنتز و تغییر حالت اسیدهای چرب غیراشباع به اسیدهای چرب اشباع دخالت می‌کنند. لذا این امکان وجود دارد که کورکومین سیالیت طبیعی غشاء سلولی را تعدیل نماید [14]. تحقیقات حاکی از آن است که کورکومین یک پاک‌کننده آنیون سوپراکسید (*Super Oxide*) می‌باشد [14]. همچنین پاک‌کننده رادیکال هیدروکسیل و نیتروژن دی‌اکساید نیز می‌باشد [21]. همچنین در مطالعات *in vivo* مشخص گردیده است که کورکومین سبب مهار لیپید پراکسیداسیون ناشی از کینولینیک اسید (*Quino linic acid*) و مهار تولید سوپراکسید ناشی از سیانید در مغز گردیده است که دلالت بر خواص محافظتی کورکومین دارد [7].

در مطالعه حاضر نوروتوکسین هوموسیستئین به عنوان القاء کننده پراکسیداسیون لیپیدی در غشاء نورونی استفاده شد و نقش آنتی‌اکسیدانت کورکومین در پیشگیری از پراکسیداسیون لیپیدی بررسی گردید. همچنین آثار نوروتوکسیک هوموسیستئین بر حافظه به روش اجتناب غیرفعال (*Passive avoidance learning*) و



شکل ۱- (A) خط رگرسیون و EC_{50} حاصل از اثر هوموسیستین بر غلظت مالوندی آلدئید (MDA) در بافت هوموژن مغز رت. (B) نمودار دوز-رسانس اثر هوموسیستین بر غلظت مالوندی آلدئید (MDA) در مغز رت. هر نقطه در نمودار معرف: $Mean \pm SEM$ و $n = 8$, $p < 0.001$ ++، $p < 0.01$ اختلاف از گروه شاهد (sham) می‌باشد.

بطنی مغزی (i.c.v.) هوموسیستین ($0.2 \mu\text{mol}/1 \mu\text{l}$) بوده است. این غلظت هوموسیستین از منحنی دوز - پاسخ بدست آمد (شکل ۱).

هوموسیستین (Hcy) به صورت پودر بالک خریداری شده ابتدا در اسید کلر دریک ۱ مولار حل کرده [22] سپس در بافر فسفات سالین (PBS) در PH (7.4) تهیه و ۵ روز بعد از شروع تزریق کورکومین، در روز ششم بطریق داخل بطنی مغزی تزریق گردید. هوموسیستین در غلظت موثر (0.2) مولار تهیه و یک میکرولیتر از این محلول‌ها بوسیله سرنگ هامیلتون به روش داخل بطنی مغزی (i.c.v.) تزریق شد. غلظت هوموسیستین از منحنی دوز - پاسخ حاصل از غلظت‌های مختلف هوموسیستین بدست آمده است (شکل ۱). ۵ روز پس از تزریق هوموسیستین، بررسی‌های رفتاری بیوشیمیایی و بافت‌شناسی در گروه‌های جداگانه انجام شد. گروه‌های ۸ عددی Rat در گروه‌های جداگانه نگهداری شدند.

گروه کنترل (Control) هیچ دارویی به شکل داخل صفاقی و یا داخل مغزی دریافت نکردند.

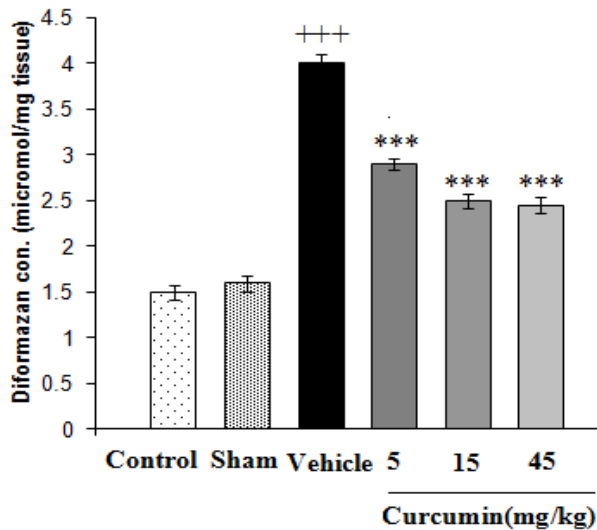
گروه شاهد (Sham) به مدت ۱۰ روز متوالی حامل کورکومین (اتیل اولئات) بطور داخل صفاقی (i.p.) دریافت نمودند و در روز ششم (پنج روز پس از شروع تزریقات حامل)، حامل هوموسیستین (بافر فسفات سالین) از راه داخل بطنی مغزی (i.c.v.) دریافت نمودند.

گروه هوموسیستین (Hcy) به مدت ۱۰ روز متوالی اتیل

نقش کورکومین در مقابل آن بررسی شد. از طرف دیگر بررسی‌های بافت‌شناسی جهت مطالعه دقیقتر آثار نوروتوکسیک هوموسیستین و نقش محافظتی کورکومین در مقابل آن انجام گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از موش صحرایی از نژاد *Wistar* با وزن 250-300 گرم که در شرایط محیطی مناسب ($18-22^{\circ}\text{C}$) و در دوره تاریکی روشنایی 12 ساعته و به گروه‌های ۸ عددی در هر قفس تقسیم شده‌اند و به آب و غذای کافی دسترسی دارند، استفاده شد. کلیه آزمایشات با پیروی از قوانین و مقررات مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی مربوط به انستیتو بین‌المللی سلامت به شماره انتشار 23-80 و تجدید نظر به سال 1996 بوده است. همچنین توسط کمیته قوانین حقوق حیوانات و تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تایید گردیده است. آزمون‌ها به بررسی‌های بیوشیمیایی، رفتاری و بررسی‌های بافتی تقسیم گردیدند. کورکومین خریداری شده ابتدا در محلول اتانول مطلق در غلظت 10% w/v حل کرده و در فریز نگهداری و در هنگام آزمایش بصورت محلول در اتیل اولئات 10% v/v [7] در دوزهای ۵ و ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم جداگانه بطور داخل صفاقی (i.p.) و یکبار تزریق در روز و در یک دوره ۱۰ روزه تزریق شد. شروع تزریقات ۵ روز پیش از تزریق داخل

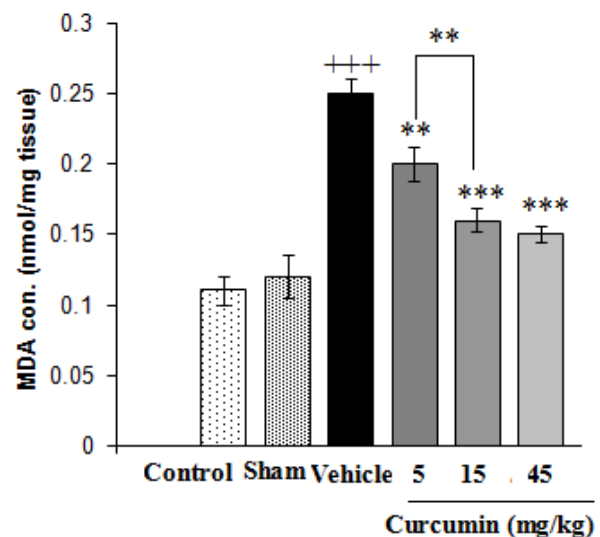


Hcy (0.2 μmol/μl)

شکل ۳- اثرات کورکومین (5, 15, 45 mg/kg) بر آنیون سوپر اکساید (Diformazan) در مغز هوموژن رت در گروه‌های دریافت کننده هوموسیستین (0.2 μmol/μl) و مقایسه آن با گروه شاهد و کنترل. کورکومین در دوز 45 mg/kg غلظت آنیون سوپر اکساید را بیشتر از دوز 5, 15 mg/kg کاهش داده است (p < 0.01). هر نقطه در نمودار معرف: Mean ± SEM و n = 8. اختلاف از گروه هوموسیستین (Hcy) می‌باشد. *p < 0.01، **p < 0.001، *p < 0.001 اختلاف از گروه شاهد (Sham) می‌باشد. +++p < 0.001 اختلاف از گروه هوموسیستین (Hcy) می‌باشد. *p < 0.01، **p < 0.001، ***p < 0.001 اختلاف دو گروه 5, 15 mg/kg کورکومین می‌باشد.**

گردیده و شکاف بوسیله بخیه بسته شد. حیوانات گرم نگهداشته شده تا به هوش بیایند.

آزمون‌های بیوشیمیایی ۵ روز پس از جراحی حیوان انجام گردید. حیوانات کشته شده و سپس سریعاً مغز آنها خارج گردید و بوسیله دستگاه هوموژنایزر (Polytron) به نسبت 10% (w/v) در بافر فسفات سالین (PBS) در pH (7.4) هوموژنه شده و در فریز (-40°C) نگهداری شدند. جهت بررسی‌های بیوشیمیایی دو پارامتر حاصل از لیپید پراکسیداسیون مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا غلظت مالوندی آلدهید (MDA) بر اساس nmol/mg tissue در بافت هوموژن مغز به روش Placer اندازه‌گیری شد [18]. در این روش کمپلکس صورتی رنگ استخراج شده تیو باربیتوریک اسید و مالوندی آلدهید (TBA-MDA) به روش رنگ سنجی با کمک اسپکتروفوتومتر 916^{UV/Visible} در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد سطح غلظتی مالوندی آلدهید از منحنی استاندارد که از تترامتوکسی پروپان بدست آمده است، اندازه‌گیری شد که بیانگر غلظت مالوندی آلدهید (nmol/mg tissue) در بافت مغز است [18].



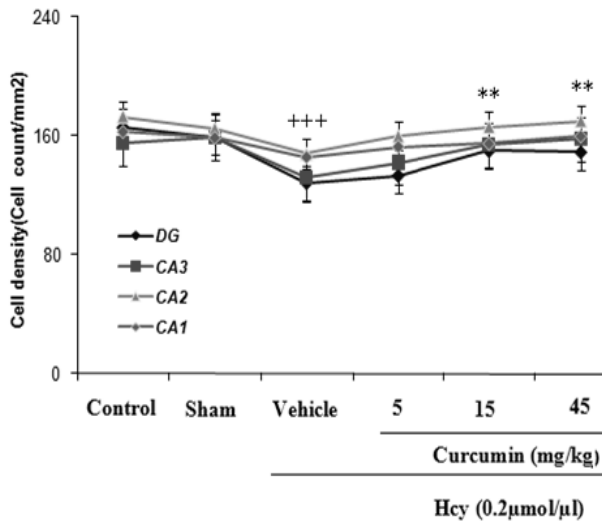
Hcy (0.2 μmol/μl)

شکل ۲- اثرات کورکومین (5, 15, 45 mg/kg) بر غلظت مالوندی آلدهید (MDA) در مغز هوموژن رت در گروه‌های دریافت کننده هوموسیستین (0.2 μmol/μl) و مقایسه آن با گروه شاهد و کنترل. کورکومین در دوز 15, 45 mg/kg غلظت MDA را بیشتر از دوز 5 mg/kg کاهش داده است (p < 0.01). هر نقطه در نمودار معرف: Mean ± SEM و n = 8. اختلاف از گروه هوموسیستین (Hcy) می‌باشد. *p < 0.01، **p < 0.001، *p < 0.001 اختلاف از گروه شاهد (Sham) می‌باشد. +++p < 0.001 اختلاف از گروه هوموسیستین (Hcy) می‌باشد. *p < 0.01، **p < 0.001، ***p < 0.001 اختلاف دو گروه 5, 15 mg/kg کورکومین می‌باشد.**

اولیات (حامل کورکومین) بطور داخل صفاقی (i.p) دریافت کرده و در روز ششم (پنج روز پس از شروع تزریقات حامل)، هوموسیستین (0.2 μmol/μl) داخل بطنی مغزی دریافت نمودند.

گروه‌های کورکومین (Curcumin) به مدت ۱۰ روز متوالی کورکومین در دوزهای ۵ و ۱۵ و ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، بطریق داخل صفاقی (ip) دریافت کرده و در روز ششم (پنج روز پس از شروع تزریقات کورکومین)، هوموسیستین (0.2 μmol/μl) داخل بطنی مغزی دریافت کردند. در همه گروه‌ها ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق کورکومین و یا حامل آن آزمون‌های بیوشیمیایی و رفتاری و بافت‌شناسی انجام گردید.

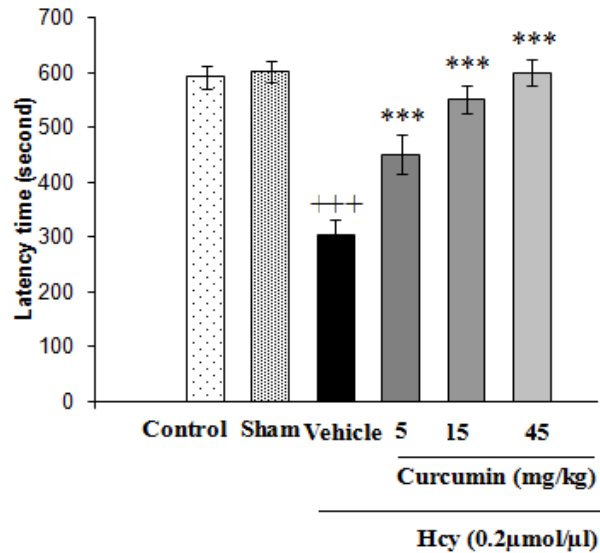
جهت تزریق داخل بطنی مغزی (i.c.v) هوموسیستین، موش‌ها با استفاده از داروی بیهوشی کتامین/زایلوزین بیهوش گردیده و در دستگاه استروتکس (Stereotax) فیکس گردیدند و بر اساس اطلس [17] توکسین هوموسیستین و یا حامل آن (PBS) در بطن مغز (i.c.v) تزریق شده و سرعت تزریق 1 μl/min بوده است و ۲ دقیقه پس از تزریق، کانال خارج



شکل ۵- اثرات کورکومین (5, 15, 45 mg/kg) بر دانسیته سلولی (شمارش سلولی در میلیمتر مربع) در نواحی مختلف هیپوکامپ در گروه‌های دریافت کننده هوموسیستین (0.2 μmol/μl) و مقایسه آن با گروه‌های شاهد و کنترل. هر نقطه در نمودار معرف $Mean \pm SEM$ و $n = 5$ و $p < 0.01$ اختلاف از گروه شاهد (Sham) می‌باشد. $p < 0.001$ اختلاف از گروه هوموسیستین (Hcy) می‌باشد.

است که حیوان یاد می‌گیرد با مهار یک رفتار ویژه از دریافت محرک آسیب رسان اجتناب ورزد. مراحل تشکیل یادگیری و حافظه عبارتند از: ۱- اکتساب (Acquisition) ۲- تثبیت (Consolidation) ۳- ذخیره (Storage) ۴- بخاطرآوری (Retrieval).

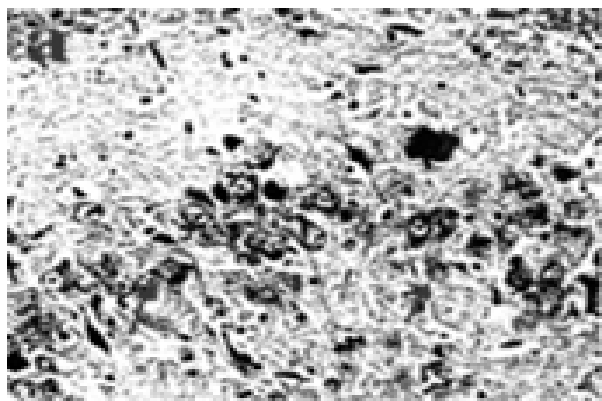
آزمون ضبط حافظه ۵ روز پس از تزریق داخل بطنی هوموسیستین یا حامل آن در ۶ گروه از موش‌ها صورت گرفت. وظیفه دو روز متوالی انجام گردید. پارامتر قابل اندازه‌گیری زمان تاخیر در قدم گذاری به قسمت تاریک دستگاه اجتنابی بوده است (Step through latency time). در اتاق تاریک شوک الکتریکی (1.5-2 mA, 50 Hz, 1.5 sec) بر پاهای موش اعمال گردید. در روز اول پس از مرحله عادت، مرحله آموزش انجام شده و حیوان از ورود به اتاق تاریک (اتاق شوک) اجتناب ورزید. در روز دوم فراخوانی حافظه (Retrieval) بررسی شد. زمان تاخیر ورود موش به اتاق تاریک تا حد اکثر ۶۰۰ ثانیه اندازه‌گیری شد. زمان‌های ثبت شده در گروه‌های آزمایشی از نظر آماری و به روش آنالیز واریانس یکطرفه مورد مقایسه قرار گرفت. از آنجایی که مواد محرک و یا تضعیف کننده سیستم عصبی مرکزی ممکن است بر فعالیت حرکتی حیوان اثر بگذارند.



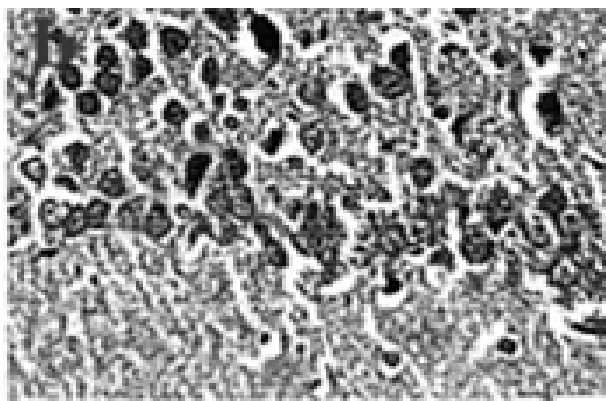
شکل ۴- اثرات کورکومین (5, 15, 45 mg/kg) بر رفتار اجتنابی غیرفعال در گروه‌های دریافت کننده هوموسیستین (0.2 μmol/μl) و مقایسه آن با گروه‌های شاهد و کنترل. هر نقطه در نمودار معرف $Mean \pm SEM$ و $n = 8$ و $p < 0.001$ اختلاف از گروه شاهد (Sham) می‌باشد. $p < 0.001$ اختلاف از گروه هوموسیستین (Hcy) می‌باشد. $p < 0.01$ اختلاف دو گروه 5, 15 mg/kg کورکومین می‌باشد.

پارامتر بعدی اندازه‌گیری آنیون سوپرآکسید به روش Das بوده است [8]. در این روش میزان غلظت دیفورمازون در بافت هوموژن مغز که معرف آنیون سوپر اکسید (SOA) است، به روش رنگ سنجی اندازه‌گیری شد. به طوری که رنگ سرمه‌ای حاصله توسط اسپکتروفوتومتر در طول موج 560nm اندازه‌گیری شد. بارسیم منحنی استاندارد حاصل از نیتروبلو دیفورمازون (NBD)، غلظت دیفورمازون (معرف آنیون سوپر اکسید) بر اساس $\mu\text{mol/mg tissue}$ در بافت اندازه‌گیری شد که معرف آنیون سوپرآکسید دریافت است.

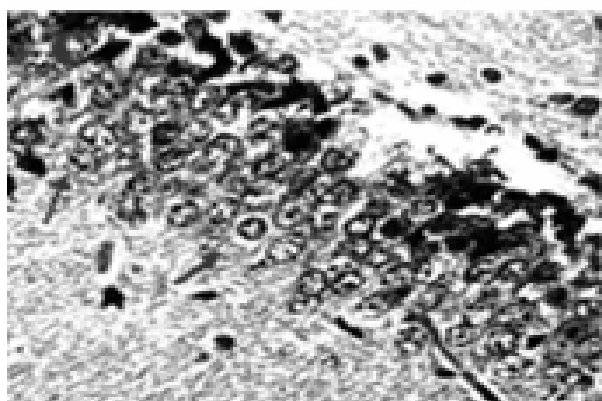
نتایج آزمایشات بین گروه‌های آزمایشی با روش آماری بررسی شد. در صورت معنی‌دار بودن فاکتور F ، تست آماری Student Newman Keuls جهت مقایسه گروه‌های تحت آزمایش و گروه کنترل صورت پذیرفت. سطح معنی‌دار در خطای معیار $p < 0.05$ قابل قبول بوده است؛ بنابراین در صورت کاهش جذب رنگ، اثرات کورکومین در پیشگیری از لیپیدپراکسیداسیون و مهار ایجاد سوپر اکسید اثبات می‌گردد. جهت بررسی حافظه و یادگیری از آزمون یادگیری اجتناب غیرفعال استفاده گردید. یادگیری احترازی غیرفعال (Passive avoidance learning) نوعی شرطی شدن مهارتی



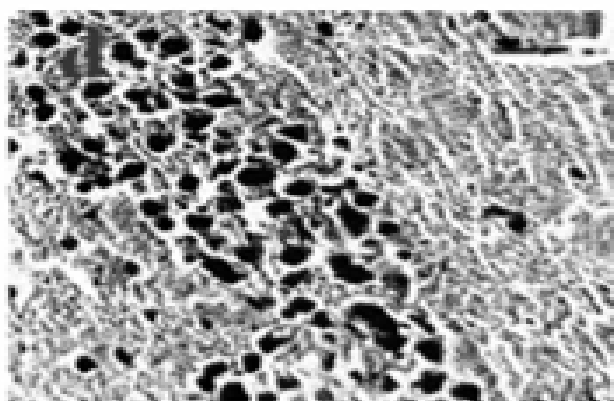
a- DG layer Homocysteine group



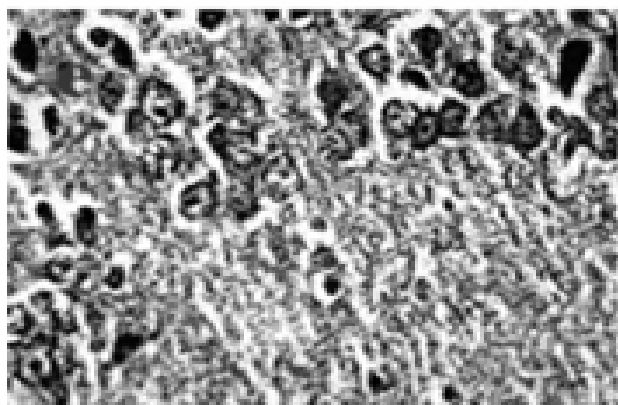
b- DG layer control group



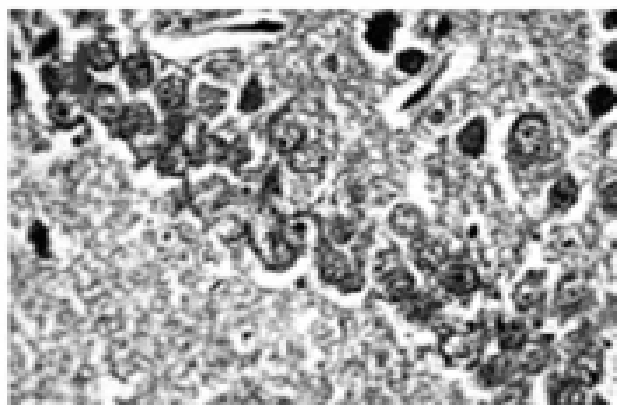
c- CA3 layer Homocysteine



d- CA3 layer control group



e- DG layer Curcumin 15 mg, group



f- DG layer Curcumin 45 mg, group

شکل ۶- سلول‌های رنگ‌آمیزی شده به روش هماتوکسیلین - ائوزین (H and E) از برش‌های نواحی مختلف هیپوکامپ موش در گروه‌های آزمایشی با بزرگ‌نمایی ۴۰. a- ناحیه گرانولار Dentate gyrus گروه هموسیستئین. b- ناحیه گرانولار Dentate gyrus گروه کنترل. c- ناحیه هرمی CA 3 گروه هموسیستئین. d- ناحیه هرمی CA3 گروه کنترل. e- ناحیه گرانولار Dentate gyrus گروه کورکومین در دوز 15 میلی‌گرم. f- ناحیه گرانولار Dentate gyrus گروه کورکومین در دوز 45 میلی‌گرم.

بررسی‌های بافت‌شناسی نیز بر روی برش‌های هیپوکامپ انجام شد. بافت هیپوکامپ خارج شده از مغز موش در فرمالدهید ۱۰٪ به مدت ۲۴ ساعت فیکس شده و سپس در پارافین مذاب

لذا آثار کورکومین و هموسیستئین بر رفتار حرکتی حیوان (*Spontaneous Locomotor Activity*) در دستگاه *Open field* بررسی گردید [24].

بهتری در کاهش سطح غلظتی مالوندی آلدئید (MDA) نشان داده است ($p < 0.01$).

سطح غلظتی آنیون سوپر اکساید (*Diformazan*) نیز در مغز هووژن رت با کمک اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۶۰ nm اندازه گیری شد (شکل ۳). آنالیز واریانس نشان داد که سطح غلظتی آنیون سوپر اکساید در گروه هوموسیستئین بطور معنی داری بیشتر از گروه شاهد و کنترل است [$F(5,42) = 220.98, p < 0.001$]. از طرفی تجویز کورکومین در مقادیر ۵، ۱۵ و ۴۵ میلی گرم بر کیلوگرم بطور معنی داری ($p < 0.001$) سطح آنیون سوپر اکساید را در مقایسه با گروه هوموسیستئین کاهش داده است. به علاوه کورکومین در دوز ۴۵ میلی گرم در مقایسه با دوزهای دیگر اثرات بهتری در کاهش سطح غلظتی آنیون سوپر اکساید در مغز موش بر جای گذاشته است ($p < 0.01$) (شکل ۳).

اثرات داروها را بر حافظه موش در آزمون یادگیری احترازی غیرفعال نیز بررسی شد (شکل ۴). آنالیز واریانس نشان داده است که هوموسیستئین در غلظت ۰.۲ میکرومول بطور معنی داری سطح یادگیری موش را کاهش داده و سبب کاهش زمان تاخیر (*Latency time*) گردید [$F(5,42) = 18.50, p < 0.001$]. این اختلال با مصرف کورکومین در غلظت‌های ۵ ($p < 0.01$) و ۱۵ و ۴۵ ($p < 0.001$) بهبود یافت و زمان تاخیر را افزایش داد که بیانگر بهبود حافظه پس از استفاده از کورکومین می باشد (شکل ۴).

نتایج حاصله از بررسی فعالیت حرکتی موش‌ها (*locomotor activity*) در دستگاه open field نشان داد که هیچ اختلاف معنی داری مابین گروه‌ها وجود ندارد. این بدان معنی است که امکان انجام تست یادگیری با توجه به فعالیت حرکتی همسان گروه‌ها وجود خواهد داشت.

همچنین بررسی‌های بافت‌شناسی نشان داد که ساختمان و شکل سلولی مناطق مختلف هیپوکامپ (CA1, CA2, CA3, DG) پس از تزریق داخل بطنی هوموسیستئین در مقایسه با گروه شاهد و کنترل تغییر نکرد. لیکن دانسیته سلولی در نواحی CA3, DG به طور معنی داری ($p < 0.001$) در مقایسه با گروه شاهد و کنترل کاهش یافته است (شکل ۵, ۶). با مصرف کورکومین در مقادیر ۱۵ و ۴۵ میلی گرم بر کیلوگرم، این کاهش سلولی بهبود یافت (شکل ۵, ۶).

قرار داده و پس از سرد شدن جهت برش در دستگاه میکروتوم (*Microtome*) قرار داده و در ضخامت ۳-۴ μm برش داده شد. سپس پارافین در زایلین (xylene) حل شده و بوسیله دو رنگ اتوزین و همتاکسیلین بر اساس پروسه Wilson رنگ آمیزی شد. از لام‌های رنگ آمیزی شده توسط دوربین متصل به میکروسکوپ نوری عکس برداری گردیدند و به کمک نرم افزار کامپیوتری (*Digi3-2000 and Digipro 4.0 software*) ساختمان و دانسیته سلولی بررسی شد.

شمارش سلولی از مناطق مختلف هیپوکامپ (CA1, CA2, CA3, DG) در مقیاس ۰.۲۵ mm² انجام شد. نتایج حاصله به صورت تعداد سلول در میلی متر مربع (cells/mm²) ارائه شد (شکل ۵, ۶).

یافته‌ها

با تزریق غلظت‌های مختلف هوموسیستئین در بطن مغز میزان مالوندی آلدئید در مغز هووژن موش اندازه گیری شد (شکل ۱). همچنین خط رگرسیون و EC50 نیز در شکل ۱- A نشان داده شده است. نمودار دوز-رئیسپانس نیز در شکل ۱- B رسم گردید. با توجه به این نمودار علی رغم اینکه هوموسیستئین در دوز ۰.۴ μmol/μl بیشترین غلظت مالوندی آلدئید را در بافت مغز ایجاد کرده است لیکن اختلاف اثر دوز ۰.۲ μmol/μl با دوز ۰.۴ μmol/μl معنی دار نمی باشد. از طرفی مشاهده شد که با افزایش دوز هوموسیستئین بیش از (۰.۴ μmol/μl) عوارضی همچون فلجی و مرگو میر در حیوان به وقوع پیوست. لذا در طول آزمایشات و با توجه به مراجع، دوز ۰.۲ μmol/μl در طول مطالعه بکار گرفته شد.

اثرات کورکومین نیز بر فرایند لیپید پراکسیداسیون در مغز موش بررسی شد (شکل ۲). آنالیز واریانس نشان داد که سطح غلظتی مالوندی آلدئید (MDA) در گروه هوموسیستئین بطور معنی داری در مقایسه با کنترل افزایش یافته است [$F(5, 42) = 164.54, p < 0.001$]. با مصرف کورکومین در دوزهای ۵ و ۱۵ و ۴۵ میلی گرم بر کیلوگرم □ سطح غلظتی مالوندی آلدئید (MDA) بطور معنی داری کاهش یافت ($p < 0.001$). همانطور که در شکل ۲ مشاهده می گردد کورکومین در دوز ۴۵ میلی گرم در مقایسه با دیگر دوزها اثرات

بحث

(*Synaptic plasticity*) می‌گردد [2]. Streck و همکاران وی در سال ۲۰۰۴ نشان داده‌اند که افزایش مزمن هوموسیستئین خون سبب اختلال در حافظه می‌شود [23]. این موضوع پیشنهاد گردیده است که هوموسیستئین ممکن است سبب ایجاد اکسیژن فعال (ROS) گردد که به اسیدهای چرب غیراشباع (*Poly Unsaturated Fatty Acids*) در غشاء سیتوپلاسمی نورونی حمله‌ور شده و سبب لیپید پراکسیداسیون در مغز گردد. هوموسیستئین پیام‌رسانی داخل سلولی را سبب شده و منجر به مرگ نورونی به روش آپوپتوز و یا نکروز می‌شود [1]. ROS به اسیدهای چرب حمله‌ور گردیده و زنجیره لیپید پراکسیداسیون را ایجاد می‌کند [25]. طی لیپید پراکسیداسیون بسیاری از متابولیت‌های مضر مانند پراکسیدها، آلدیدها، کتون‌ها و الکل‌ها ایجاد می‌گردند بخصوص (*4-hydroxy-nonenal* (HNE) مالوندی آلدید (MDA) که این مواد در ایجاد و پیشرفت آترواسکلروز، التهاب، سرطان‌ها و بیماری‌های نورودژنراتیو نقش کلیدی دارند [19].

در مطالعه حاضر با مصرف کورکومین در مقادیر کم، متوسط و زیاد فرایند لیپید پراکسیداسیون بطور معنی‌داری مهار گردید ($p < 0.001$) و سطح MDA و SOA در مغز هوموژن رت‌هایی که هوموسیستئین دریافت کرده بودند کاهش یافت. از طرفی همانطور که در اشکال ۲ و ۳ مشاهده می‌شود، دوز ۴۵ میلی‌گرم کورکومین فرایند لیپید پراکسیداسیون را بیشتر از دوزهای قبلی متوقف می‌کند ($p < 0.01$). از طرف دیگر کورکومین اختلال در حافظه ناشی از هوموسیستئین را بهبود بخشید و زمان تاخیر (*latency times*) را در تست اجتنابی غیرفعال افزایش داد (شکل ۴). با توجه به نتایج فوق کورکومین دارای اثرات آنتی‌اکسیدانت و وابسته به دوز می‌باشد. کورکومین به تنهایی بر روی یادگیری و حافظه تاثیر ندارد لیکن پروسه یادگیری را که توسط هوموسیستئین مختل گردیده است، بهبود می‌بخشد. از طرفی کورکومین از کاهش دانسیته سلولی هیپوکامپ بواسطه هوموسیستئین جلوگیری کرده است (شکل ۵و ۶).

در مطالعات قبلی Pan و همکاران وی در سال ۲۰۰۸ نشان داده‌اند که کورکومین یادگیری و حافظه را در موش سوری بهبود می‌بخشد. آنها اثرات محافظت نورونی کورکومین را در موش‌های آلزایمری به روش اجتنابی غیرفعال نشان داده‌اند [16]. کورکومین تعداد خطاهای قدم گذاری موش به داخل

هدف از این تحقیق بررسی و روشن ساختن اثرات محافظت نورونی ماده آنتی‌اکسیدانت غیرآزمیومی کورکومین در مقابل عوارض عصبی هوموسیستئین می‌باشد. از دیگر اهداف این مطالعه ایجاد مدلی از آلزایمر در موش صحرایی به روش تزریق داخل بطنی مغزی (i.c.v) هوموسیستئین می‌باشد. نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده بروز علائم اولیه آلزایمر در موش بوده است که شامل کاهش حافظه فضایی، لیپید پراکسیداسیون در کل مغز موش و کاهش تعداد سلول‌های هیپوکامپ می‌باشد. در این مطالعه سمیت عصبی هوموسیستئین مورد تایید قرار گرفته است. Kim و همکاران وی در سال ۲۰۰۷ نیز اثرات محافظتی نورونی *Ginsenoside (Rg3)* را در مقابل سمیت تحریکی (*Excitotoxicity*) به روش تزریق داخل بطنی مغزی هوموسیستئین در مغز رت بررسی کرده‌اند [12].

در مطالعه حاضر نتایج بیوشیمیایی نشان داده است که ۵ روز پس از تزریق داخل بطنی (i.c.v) هوموسیستئین، سطح غلظتی MDA و SOA در مغز هوموژن رت افزایش می‌یابد که این افزایش در مقایسه با گروه شاهد و کنترل معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.001$) (شکل ۲و ۳). این نتایج مطابق با گزارشات تحقیقات پیشین بوده است که به بررسی استرس اکسیداتیو در مغز رت بعد از افزایش حاد هوموسیستئین خون پرداخته است [15]. Wu و همکارانش در سال 2005 همچنین نشان دادند که هوموسیستئین سبب فرایند لیپید پراکسیداسیون و مرگ سلولی در مغز رت می‌گردد [25].

در مطالعه حاضر مشاهده شده است که دوز بسیار بالای هوموسیستئین (بیش از ۰.۴ میکرومول) سبب مرگ موش‌ها، فلجی و رفتارهای شبه پارکینسون (لرزش و حرکت دورانی) گردید. به علاوه مطالعه ما نشان داد که هوموسیستئین در غلظت $0.2 \mu\text{mol}/\mu\text{l}$ سبب تضعیف حافظه در یادگیری اجتنابی غیرفعال و کاهش زمان تاخیر در قدم‌گذاری (*Step through latency time*) در تست حافظه شده است (شکل ۴). اثرات هوموسیستئین بر حافظه در برخی از مطالعات پیشین انجام گردیده است. مشاهده گردید که مصرف طولانی مدت هوموسیستئین سبب تغییراتی در یادگیری فضایی، اختلال در پیام‌رسانی سلول‌های هیپوکامپ و پلاستیسیته سیناپتیک

مقابل استرس اکسیداتیو ناشی از هوموسیستتین موثر باشد و سبب افزایش سیستم دفاعی آنتی اکسیدانت داخل سلولی علیه استرس اکسیداتیو بواسطه هوموسیستتین گردد. نتایج این مطالعه حاکی از آن است که کورکومین ممکن است با پاکسازی آنیون SOA از بافت مغز و با مهار پدیده لیپید پراکسیداسیون و کاهش غلظت مالوندی آلدهید MDA آثار محافظت نوروئی خود را بر جای بگذارد. بنابراین کورکومین در مقادیر کم، متوسط و زیاد (5, 15, 45 mg/kg) سبب مهار سمیت عصبی هوموسیستتین در مغز رت گردید. لذا اگر افزایش هوموسیستتین خون یکی از علل پاتولوژیک برای اختلالات نورودژنراتیو مانند آلزایمر پراکنده (Sporadic AD) و یا پارکینسون باشد، کورکومین ممکن است یک عامل پیشگیری کننده در مقابل استرس اکسیداتیو ناشی از هوموسیستتین باشد. بنابراین با توجه به نتایج این تحقیق پیشنهاد می شود که مکانیسم کورکومین در محافظت از مغز ممکن است از طریق مهار ایجاد ROS توسط هوموسیستتین بوده و در نتیجه سبب بهبود حافظه گردد. لازم است تا مطالعات بیشتری در آینده صورت گیرد تا مکانیسم هوموسیستتین در مرگ سلولی نوروئی (آپوپتوز یا نکروز) و اثرات محافظت نوروئی کورکومین به دقت بررسی و مورد ارزیابی قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از دکتر ابوالحسن احمدیانی و دکتر نادر مقصودی و سرکار خانم فاطمه مسعود نیا و آقای سفر علی غفاری به جهت راهنمایی های ارزنده و همکاری صمیمانه تشکر می کند. این مطالعه با حمایت مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشکده علوم پزشکی شهید بهشتی تهران انجام پذیرفته است.

محفظه تاریک را کاهش داده و از طرفی مدت زمان تاخیر را افزایش داده است [16]. کورکومین همچنین تغییرات نوروپاتولوژیک در هیپوکامپ را کاهش داده و آپوپتوز را با افزایش غلظت پروتئین Bcl-2 مهار کرده اما بر روی غلظت پروتئین Bax اثری نمی گذارد [16]. بر اساس اطلاعات جدید نقش آپوپتوز صرفاً در سرطان ها و بیماری های نورو دژنراتیو مطرح می باشد و حال آنکه در پدیده پیری عمدتاً فرایندهای التهابی موثر می باشند [20]. Lim و همکاران وی در سال ۲۰۰۱ نشان داده اند که کورکومین آسیب های اکسیداتیو ناشی از بتا آمیلوئید را در موش های آلزایمر ترانسژنیک کاهش می دهد. آنها همچنین نشان دادند که مقادیر کم و زیاد کورکومین بطور معنی داری پروتئین های اکسیده شده را کاهش داده و از افزایش اینتر لوکین ۱- بتا که یک سیتوکاین التهابی است جلوگیری کرده است [13]. Kumar و همکاران وی در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که مصرف کورکومین (10, 20 and 50 mg/kg) از راه خوراکی یک بار در روز در یک دوره ۸ روزه، ۴ روز پیش از تزریق 3-Nitropropionic acid (3-NP) در مغز رت، بطور وابسته به دوز سبب بهبود اختلالات حرکتی و شناختی ناشی از (3-NP) در رت می گردد. آزمون های بیوشیمیایی نشان داده است که که تجویز کورکومین بطور معنی داری استرس اکسیداتیو ناشی از (3-NP) و لیپید پراکسیداسیون در مغز رت را کاهش می دهد [11]. کورکومین دارای فعالیت های بیولوژیک متعددی می باشد [10, 14] که شامل اثرات ضدالتهابی از طریق تنظیم کاهش کاهشی (Down regulation) سیکلو اکسیژناز-۲ (COX2) و کاهش سنتز نیتریک اکساید (NO) از طریق مهار فعالیت فاکتور NF-kappa B می باشد [4].

با توجه به نتایج مطالعه حاضر پیشنهاد می شود که خاصیت آنتی اکسیدانت کورکومین ممکن است در محافظت نوروئی در

References

- [1] Agnati LF, Genadani S, Rasio G. Studies on homocysteine plasma levels in Alzheimer's patients for neurodegeneration. *Neural Transm* 112 (2005) 163-169.
- [2] Algaidi SA, Christie LA, Jenkinson AM, Whaley L, Riedel G, Platt B. Long-term Homocysteine exposure induces alterations in spatial learning, hippocampal signaling and synaptic plasticity. *Exp Neurol* 197 (2005) 8-12.
- [3] Baydas G, Kutlu S, Naziroglu M, Canpolat S, Sandal S, Ozzcan M, et al. 2003. Inhibitory effects of melatonin on neural lipid peroxidation induced by intracerebroventricularly administered homocysteine. *J Pineal Res* 34 (2003) 36-39.
- [4] Bengmark S. Curcumin, a atoxic antioxidant and natural NFkappa B, cyclooxygenase-2, lipooxygenase and inducible nitric oxide synthase inhibitor: A shield against acute and chronic diseases. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 30 (2006) 45-51.
- [5] Blumenthal M, Goldberg A, Brinkman J. Herbal Medicine: The expanded commission E monographs. Newton, MA. *Integra Med Com* (2000) 330-334.
- [6] Dairam A, Chetty P, Daya S. Non-steroid anti-inflammatory agent, Tolmetin and Sulindac attenuate oxidative stress in rat brain homogenate and reduce Quino Linic acid induced neurodegeneration in hippocampal neurons. *Metab Brain Dis* 21 (2006) 221-222.
- [7] Daniel S, Limson JL, Dairam A, Watkins GM, Daya S. Through metal binding, curcumin protects against lead- and cadmium-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates and against lead-induced tissue damage in rat brain. *J Inorg Biochem* 98 (2004) 266-275.
- [8] Das UN, Padma M, Saga PS. Stimulation of free radical generation in human leukocytes by various agents including tumor necrosis is a calmodulin process. *Biochem Biophysics Res* 167 (1990) 1030-1036.
- [9] Jara-Prado A, Ortega-Vazquez A, Martinez-Ruano L, Rios C, Santamaria A. Homocysteine-induced brain lipid peroxidation, effects of NMDA receptor blockade, antioxidant treatment, and nitric oxide synthase inhibition. *Neurotoxicology* 5(2003) 237-24.
- [10] Kumar A, Naidu PS, Seghal N, Padi SS. Effect of curcumin on intracerebroventricular Colchicine-induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. *J Med Food* 10 (2007) 486-494.
- [11] Kumar P, Padi SS, Nadiu PS, Kumar A. Possible neuroprotective mechanisms of Curcumin in attenuating 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 29 (2007) 19-25.
- [12] Kim JH, Cho SY, Lee JH, Jeong SM, Lee BH, Lee JH, et al. Neuroprotective effects of Ginsenoside Rg3 against homocysteine-induced excitotoxicity in rat hippocampus. *Brain Res* 1136 (2007) 190-199.
- [13] Lim GP, Chu T, Yang F, Beech W, Frautschy SA, Cole GM. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and Amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *Neuroscience* 21(2001) 8370-8377.
- [14] Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin, a short review. *Life Sci* 78 (2006) 2081-2087.
- [15] Matté C, Mackedanz V, Stefanello FM, Scherer EB, Andrezza AC, Zanotto C, et al. Chronic Hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats: Protective effect of folic acid. *Neurochem Int* 54 (2009) 7-13.
- [16] Pan R, Qiu S, LU DX, Dong J. Curcumin improves learning and memory ability and its neuroprotective mechanism in mice. *Chin Med J* 121(2008) 832-839.
- [17] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press, 1986.
- [18] Placer ZA, Cushman LL, Johnson AC. Estimation of Product Lipid Peroxidation (Malonyl Dialdehyde) in Biochemical systems. *Anal Biochem* 16 (1966) 359-364.
- [19] Pratico D, Delanty N. Oxidative injury in disease of the central nervous system. Focus on Alzheimer's disease. *Am J Med* 109 (2000) 577-585.
- [20] Salvioli S, Sikora E, Cooper E. Curcumin in cell Death Process: A challenge for CAM of Age-Related Pathologies. *E CAM* 4 (2007) 181-190.
- [21] Shin H J. Curcumin attenuate the Kainic acid Induced hippocampal cell death in mice. *Neuroscience letter* (2007) 56-59.
- [22] *Sigma Aldrich* Co. Catalog, *Specification Sheet*. (2007a) H4628, P, 1
- [23] Streck EL, Bavaresco CS, Netto CA, Wyse AT. Chronic Hyperhomocysteinemia provokes a memory deficit in rats in the Morris water maze task. *Behav Brain Res* 153

- (2004) 377-381.
- [24] Veerendra Kumar MH, Gupta YK. Effect of Centella Asiatica on cognition and oxidative stress in an intracerebroventricular streptozotocin model of Alzheimer's disease in rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30 (2003) 336-342.
- [25] Wu WM. An investigation into the neuroprotective effects of Estrogen and Progesterone in a model of Homocysteine – induced neurodegeneration. Thesis Of Master in Pharmacy. South Africa: Rhodes University E-Publishing, (2005), p. 65-180.
- [26] Wilson I, Gamble M, The hematoxylin and eosin, *Theory and Practice of Histological Techniques*. 5th ed. London: Churchill Livingstone (2002). p. 125-38.