



Protective effect of curcumin and *Curcuma longa* extract on apoptosis of motor neurons in cultured spinal cord slices of adult mouse

Hamid Reza Momeni^{1*}, Niloufar Darbandi¹, Naser Hoseini², Roya Jamshidi¹

1. Biology Dept., Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran.

2. Medical and Aromatic Plants Dept., Faculty of Agriculture, Arak University, Arak, Iran

Received: 16 Nov 2013

Accepted: 24 Jan 2014

Abstract

Introduction: Since *Curcuma longa* extract and curcumin have been shown to be potent antioxidant agents, they were used in cultured adult mouse spinal cord slices to investigate whether they can inhibit apoptosis in motor neurons.

Methods: Slices from the thoracic region of adult mice spinal cord were divided into four groups: 1. Freshly-prepared slices (time 0); 2. Control; 3. Slices treated by curcumin (20 μ M); and 4. Slices treated by *Curcuma longa* extract (1000 ppm). The control and the treated slices were cultured for 6 hours. MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay was used to evaluate slice viability in the four groups. Morphological and biochemical features of apoptosis were studied using fluorescent staining (propidium iodide and Hoechst 33342) and TUNEL method, respectively. Data were analyzed using one-way ANOVA.

Results: The viability of slices cultured for 6 hours (control) was considerably decreased compared to freshly-prepared slices. Motor neurons from slices cultured for 6 hours showed morphological and biochemical features of apoptosis. At this time point, the application of either curcumin or *Curcuma longa* extract not only increased the viability of cultured slices compared to the control, but also they could inhibit morphological and biochemical features of apoptosis in the motor neurons.

Conclusion: Oxidative stress might be a possible mechanism for the induction of apoptosis of motor neurons in cultured spinal cord slices.

Key words: Spinal cord, Motor neuron, Apoptosis, *Curcuma longa* extract, Curcumin

* Corresponding author e-mail: h-momeni@araku.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

اثر محافظتی کورکومین و عصاره زردچوبه بر آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع موش بالغ

حمیدرضا مومنی^{*}، نیلوفر دربندی^۱، ناصر حسینی^۲، رویا جمشیدی^۱
۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، اراک
۲. گروه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه اراک، اراک

پذیرش: ۴ بهمن ۹۲

دریافت: ۲۵ آبان ۹۲

چکیده

مقدمه: با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانتی عصاره زردچوبه و ماده موثره آن به نام کورکومین، این مواد در کشت قطعات نخاع موش بالغ به کار برده شد تا مشخص شود که آیا می‌توانند آپوپتوزیس را در نورون‌های حرکتی این قطعات مهار نمایند.

روش‌ها: قطعات ناحیه سینه‌ای نخاع موش بالغ به چهار گروه تقسیم شدند: (۱) قطعات لحظه زمانی صفر (۲) قطعات کنترل (۳) قطعات تیمار شده با کورکومین (۲۰ میکرومولار) و (۴) قطعات تیمار شده با عصاره زردچوبه (۱۰۰۰ ppm). قطعات کنترل و تیمار به مدت ۶ ساعت در محیط کشت انکوبه شدند. سنجش جنبه‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی آپوپتوزیس در نورون‌های حرکتی، به ترتیب از رنگ‌آمیزی فلئورسنت (پروپیدیوم آیوداید و هوست ۳۳۳۴۲) و تکنیک تانل استفاده شد. آنالیز آماری داده‌ها از طریق آنالیز واریانس یک طرفه صورت گرفت.

یافته‌ها: قابلیت حیات قطعات کشت شده به مدت ۶ ساعت (کنترل) نسبت به لحظه زمانی صفر به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت. نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع پس از ۶ ساعت نشانه‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی آپوپتوزیس را نشان دادند. در این زمان کاربرد جداگانه کورکومین و عصاره زردچوبه نه تنها توانست قابلیت حیات قطعات کشت شده را افزایش دهد بلکه توانست مشخصات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی آپوپتوزیس را در نورون‌های حرکتی مهار نمایند.

نتیجه‌گیری: احتمالاً استرس اکسیداتیو می‌تواند به عنوان یکی از مکانیسم‌های دخیل در القا آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی در قطعات کشت شده نخاع نقش داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: قطعات کشت شده نخاع، نورون حرکتی، آپوپتوزیس، عصاره زردچوبه، کورکومین

مقدمه

تجربه می‌کنند. علی‌رغم مطالعات و پیشرفت‌های زیادی که در خصوص این بیماری‌ها صورت گرفته، در حال حاضر درمان قطعی برای این بیماران ارائه نشده است. پژوهش‌های علمی [۳۱] و همچنین شواهد کلینیکی [۲۵] بیانگر ارتباط بین القا آپوپتوزیس در نورون‌ها و پاتوژنز این بیماری‌ها می‌باشند. از آن جا که آپوپتوزیس پدیده پیچیده‌ای است که می‌تواند به وسیله سیگنال‌های متعددی به‌طور واحد یا هم‌زمان با هم در نورون‌ها آغاز گردد، لذا شناخت تنظیم‌کننده‌های مولکولی آپوپتوزیس در نورون‌های این بیماران بسیار مهم و با خوشبینی

متأسفانه امروزه مردم زیادی در جهان مرگ پیشرونده یک یا گروهی از نورون‌های خود را در بیماری‌های ناشی از دژنره شدن نورون‌ها (neurodegenerative disease, ND) مثل آلزایمر، پارکینسون و Amyotrophic lateral sclerosis

h-momeni@araku.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

^{*} نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

که گروه‌های متوکسی و هیدروکسیل موجود بر روی حلقه فنل بخش‌های مهمی هستند که می‌توانند اثر آنتی اکسیدانتی را به کورکومین اعطا نمایند. علاوه بر این پیشنهاد شده است که قرارگیری گروه هیدروکسیل در موقعیت اورتو حلقه فنل (با توجه به گروه متوکسی) خاصیت آنتی اکسیدانتی کورکومین را افزایش می‌دهد [۹].

کشت قطعات نخاع به عنوان یک مدل مناسب جهت بررسی مکانیسم‌های دخیل در مرگ نورون‌های حرکتی محسوب می‌شود. مطالعات متعدد در این خصوص نشان می‌دهند که آپوپتوزیس به عنوان فرمی از مرگ سلولی در این نورون‌ها می‌باشد [۱۶، ۲۰]. از آنجایی که القا استرس اکسیداتیو عاملی برای مرگ نورون‌ها در ND مطرح است، این احتمال وجود دارد که القا استرس اکسیداتیو نیز عاملی برای آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی در قطعات کشت شده نخاع باشد. بنابراین می‌توان این گونه فرض نمود که با جلوگیری از افزایش بیش از حد رادیکال‌های آزاد و یا تقویت سیستم دفاعی آنتی اکسیدانتی بتوان از مرگ این نورون‌ها جلوگیری و یا حداقل مرگ آن‌ها را به تاخیر انداخت. بنابراین پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر کورکومین و عصاره زردچوبه بر روی آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع طراحی شده تا به این سوال پاسخ داده شود که آیا با فرض القا استرس اکسیداتیو در ایجاد آپوپتوزیس در نورون‌های حرکتی، کاربرد این ترکیبات می‌تواند آپوپتوزیس را در این نورون‌ها مهار نمایند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی موش‌های ماده بالغ نژاد Balb/c با میانگین وزنی 22 ± 3 گرم (۵ تا ۶ هفته‌ای) مورد استفاده قرار گرفتند. حیوانات از انستیتو پاستور ایران خریداری و در خانه حیوانات در شرایط استاندارد، دمای 21 ± 2 درجه سانتی‌گراد و نور کنترل شده با شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی با دسترسی به آب و غذای کافی نگهداری شدند. در این پژوهش کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است.

حیوانات با استفاده از دی اتیل اتر کاملاً بی‌هوش و

می‌تواند در آینده درمانی را برای آن‌ها رقم زند. مطالعات متعدد و قوی بر این نکته تاکید دارند که عملکرد غیرطبیعی میتوکندری و تولید بیش از اندازه گونه اکسیژن واکنش پذیر (reactive oxygen species, ROS) که منجر به القا استرس اکسیداتیو در نورون‌ها می‌شود یکی از مکانیسم‌های کلیدی در ایجاد و پیشرفت ND می‌باشد [۷، ۲۴]. بدین ترتیب مهار رادیکال‌های آزاد و تقویت سیستم دفاعی آنتی اکسیدانتی با هدف کاهش استرس اکسیداتیو در سیستم عصبی می‌تواند به عنوان راه کاری برای مقابله با آسیب نورونی مطرح باشد. تحقیقات نشان می‌دهد که آنتی اکسیدانت‌های غذایی (nutritional antioxidant) به ویژه پلی فنل‌ها [۶] و آنتی اکسیدانت‌های کاتالیتیک [۸] قادر هستند مرگ نورونی را در شرایط in vitro مهار نمایند و بدین ترتیب ممکن است خواص درمانی در مدل‌های جانوری ND داشته باشند. به همین دلیل بهره‌گیری از آنتی اکسیدانت‌ها می‌تواند به عنوان یک استراتژی احتمالی برای مهار و یا کاهش مرگ نورونی در مدل‌های جانوری به کار رود تا بتواند به فرضیه درمان با آنتی اکسیدانت‌ها برای ND جامه عمل بپوشاند.

زردچوبه از خانواده زنجبیل (zingiberaceae) با نام علمی *Curcuma longa* شناخته می‌شود و قسمت مورد استفاده غذایی و دارویی این گیاه ریزوم‌های خشک شده آن است. کورکومین ماده موثره ریزوم گیاه زردچوبه و یک پلی فنل چربی دوست است. کورکومین با جاروب رادیکال‌های آزاد اکسیژن مثل آنیون‌های سوپر اکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپید [۲۳] و جلوگیری از آسیب اکسیداتیو به پروتئین‌ها [۱۰] و DNA [۲۲] به عنوان آنتی اکسیدانت قدرتمند مطرح است. کورکومین [۲] و همچنین عصاره زردچوبه [۲۱] با دارابودن خواص آنتی اکسیدانتی خود می‌تواند یک اثر حفاظتی در برابر تخریب نورون‌های موجود در سیستم عصبی مرکزی اجرا کنند. همچنین در مطالعه‌ای که بر روی مرگ نورونی بعد از آسیب عصب سیاتیک در رت صورت گرفته، عصاره زردچوبه توانسته است از مرگ نورون‌های حرکتی در شاخ شکمی نخاع طرف آسیب دیده جلوگیری نماید [۲۶]. پیشنهاد شده است که کورکومین می‌تواند اثرات محافظتی را به واسطه خصوصیات ساختمانی خود ایفا نماید. به نظر می‌رسد

۴۵۰ میکرولیتر محیط کشت انتقال یافتند (هرخانه حاوی چهار قطعه). سپس به هر کدام از خانه‌ها ۵۰ میکرولیتر از محلول غلیظ MTT (۵ mg/ml، Sigma) اضافه شد. سپس پلیت‌ها برای ۲۰ دقیقه در انکوباتور CO₂ دار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. قطعات رنگ‌آمیزی شده با MTT به وسیله میکروسکوپ معمولی بررسی و از آن‌ها عکس تهیه گردید.

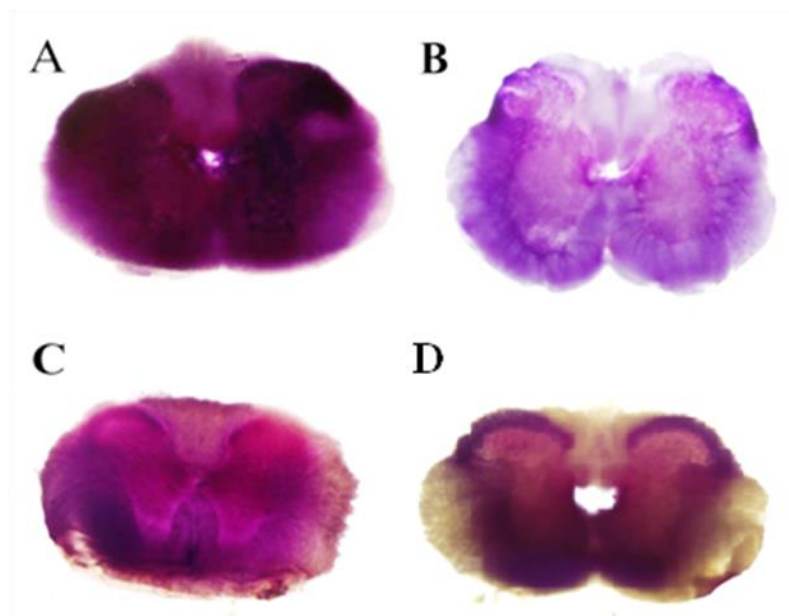
به منظور بررسی جنبه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس از رنگ‌های فلئورسنت استفاده شد. ابتدا لام‌های حاوی برش‌های نخاع به وسیله PBS شستشو شدند (۳ بار و هر بار ۵ دقیقه). سپس رنگ‌آمیزی توسط پروپیدیوم آیویداید (Propidium iodide, Sigma) با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق انجام شد. لام‌ها مجدداً به وسیله PBS شستشو (۳ بار و هر بار ۵ دقیقه) و سپس توسط هوخست ۳۳۳۴۲ (Hoechst 33342, Sigma) با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۳۰ ثانیه در دمای اتاق رنگ‌آمیزی شدند. پس از آن لام‌ها به وسیله PBS شستشو (۳ بار و هر بار ۵ دقیقه) و با اضافه نمودن محلول گلیسرول/PBS (۱:۱) توسط لامل پوشیده شدند. لام‌ها سپس توسط میکروسکوپ فلئورسنس (المپیوس، ژاپن) با استفاده از فیلتر مناسب مشاهده و از آن‌ها عکس تهیه شد. به منظور بررسی جنبه بیوشیمیایی آپوپتوزیس تکنیک تانل TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase Biotin dutp nick end labling) مورد استفاده قرار گرفت. مراحل انجام تکنیک تانل بر اساس دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده (Chemicon, USA) انجام شد. سرانجام لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری مشاهده و از آن‌ها عکس تهیه شد. جهت اندازه‌گیری قطر هسته نورون‌های حرکتی از نرم افزار موتیک استفاده شد.

به منظور تهیه عصاره تام زردچوبه از ریزوم این گیاه استفاده گردید. بدین ترتیب ریزوم به وسیله آسیاب پودر و ۵۰ گرم از آن با ۲۰۰ میلی‌لیتر متانول و اتیل استات به نسبت ۸۰ به ۲۰ مخلوط شد و سپس به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت. مخلوط توسط کاغذ صافی صاف شده و با دستگاه تبخیر در خلأ چرخشی تا تهیه عصاره جامد تبخیر گردید. سپس عصاره در انکوباتور ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد.

توسط شکافتگی قلب کشته شدند. پس از باز نمودن ناحیه پستی، نخاع خارج و به پتری حاوی سالین فسفات‌ها سرد (phosphate buffer saline, PBS) منتقل گردید. نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه کشت منتقل و ناحیه سینه‌ای آن‌ها جدا شد. این ناحیه سپس توسط دستگاه قطعه‌کننده بافت (Tissue chopper, MacIlwain, USA) به قطعات ۴۰۰ میکرونی بریده و به ۴ گروه تقسیم شدند: ۱) قطعات لحظه زمانی صفر که بلافاصله فیکس شدند ۲) قطعات کنترل که حلال ماده تیمار را دریافت نمودند ۳) قطعات تیمار شده با کورکومین (۲۰ میکرومولار) و ۴) قطعات تیمار شده با عصاره زردچوبه (۱۰۰۰ ppm). قطعات گروه کنترل و تیمار در پلیت‌های استریل چهارخانه حاوی ۴۵۰ میکرولیتر محیط کشت شامل ۵۰ درصد Minimum (MEM) Essential Medium، ۲۵ درصد سرم اسب، ۲۵ میلی‌مولار ۱-(4-(2-hydroxyethyl)-1-HEPES (۲۵ درصد piperazineethanesulfonic acid)، ۱ درصد پنی‌سیلین - استرپتومایسین و ۶ گرم در لیتر گلوکز با pH=۷/۳-۷/۴ منتقل و در انکوباتور CO₂ دار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۶ ساعت انکوبه شدند.

قطعات تازه تهیه شده (لحظه زمانی صفر) و کشت شده توسط فیکساتور استفانی (۲ درصد پارافرمالدئید، ۰/۲ درصد اسید پیکریک در ۰/۱ مولار بافر فسفات با pH: ۷/۲) برای مدت زمان حداقل ۲ ساعت فیکس شدند. سپس قطعات ۳ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه توسط PBS شستشو و برای مدت یک شب در محلول ساکاروز ۲۰ درصد در PBS، در یخچال نگه‌داری شدند. سرانجام قطعات با استفاده از دستگاه cryostat (لایکا، آلمان) با ضخامت ۱۰ میکرون برش‌گیری و برش‌ها بر روی لام‌های آغشته به پلی-ال-لایزین (۱:۹) در آب مقطر قرار گرفتند. سپس لام‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا هنگام استفاده نگه‌داری شدند.

در این تحقیق جهت ارزیابی قابلیت حیات قطعات نخاع از سنجش MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide) استفاده شد. قطعات نخاع تازه تهیه شده (لحظه زمانی صفر) و قطعات کشت شده برای ۶ ساعت (کنترل و تیمار) به پلیت‌های چهارخانه حاوی



شکل ۱- بررسی قابلیت حیات قطعات نخاع توسط سنجش MTT در حضور و عدم حضور کورکومین و عصاره زردچوبه. توزیع و تراکم رنگ بنفش در شکل‌ها بیانگر زنده بودن سلول‌های آن ناحیه می‌باشد، در حالی که نواحی بنفش کم رنگ و یا سفید نشان دهنده نواحی است که سلول‌ها مرده و یا در حال مرگ هستند. (A): قطعه نخاع تازه تهیه شده (لحظه زمانی صفر). (B): قطعه نخاع پس از گذشت مدت زمان ۶ ساعت (کنترل). (C): قطعه نخاع کشت شده با کورکومین (۲۰ μM) پس از گذشت ۶ ساعت. (D): قطعه نخاع در حضور عصاره زردچوبه (۱۰۰۰ ppm). بزرگمایی: ۴۰×

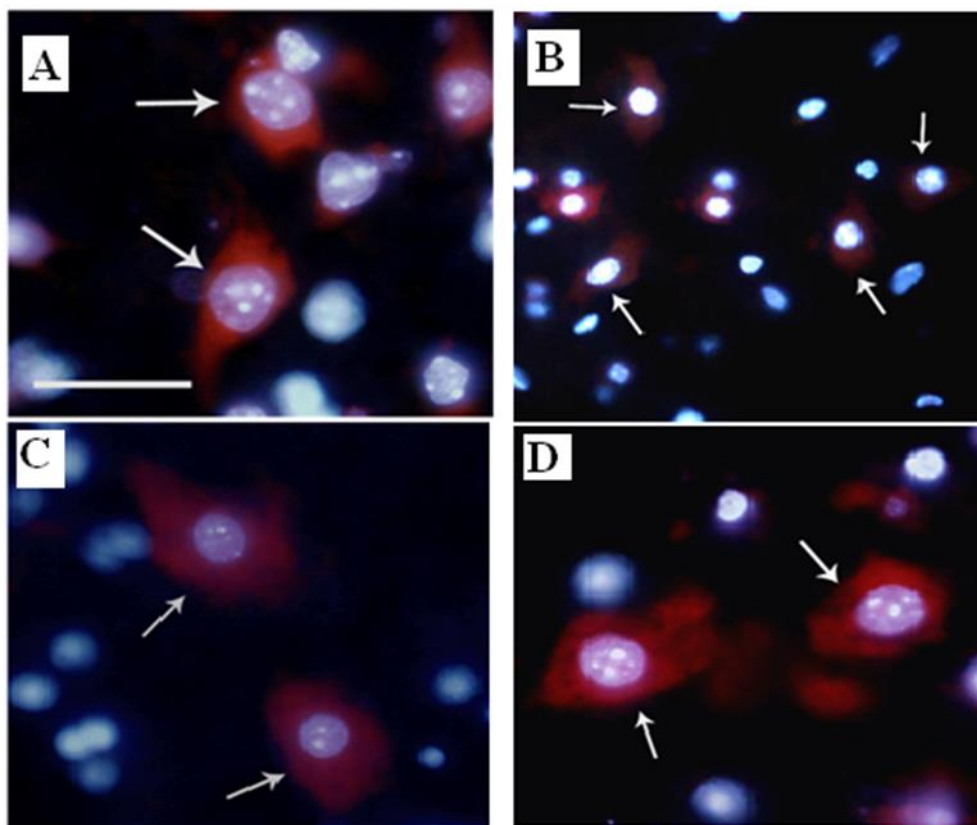
۶ ساعت را نسبت به گروه کنترل افزایش دهد. در قطعات نخاع لحظه زمانی صفر نورون‌های حرکتی واجد اجسام سلولی بزرگ، توزیع طبیعی مواد هسته‌ای و بدون هیچ‌گونه علامت آپوپتوزیس بودند (شکل ۲A). در حالی که نورون‌های حرکتی در برش‌های قطعات کشت شده برای مدت ۶ ساعت، نشانه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس از قبیل چروکیدگی سیتوپلاسم، متراکم شدن هسته و کروماتین را نشان دادند (شکل ۲B). پس از گذشت مدت زمان ۶ ساعت در محیط کشت، کاربرد جداگانه کورکومین با غلظت ۲۰ میکرومولار (شکل ۲C) و عصاره زردچوبه با غلظت ۱۰۰۰ ppm (شکل ۲D)، توانست نشانه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس را در نورون‌های حرکتی نسبت به گروه کنترل به‌طور قابل ملاحظه‌ای مهار نمایند.

میانگین قطر هسته نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع پس از گذشت ۶ ساعت نسبت به میانگین قطر هسته این نورون‌ها در لحظه زمانی صفر کاهش معنی‌داری ($P < 0.05$) را نشان داد. کاربرد کورکومین (۲۰ μM) و عصاره زردچوبه (۱۰۰۰ ppm) توانست کاهش ایجاد شده در قطر هسته نورون‌های حرکتی را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل جبران نماید. با این حال میانگین قطر هسته بین گروه

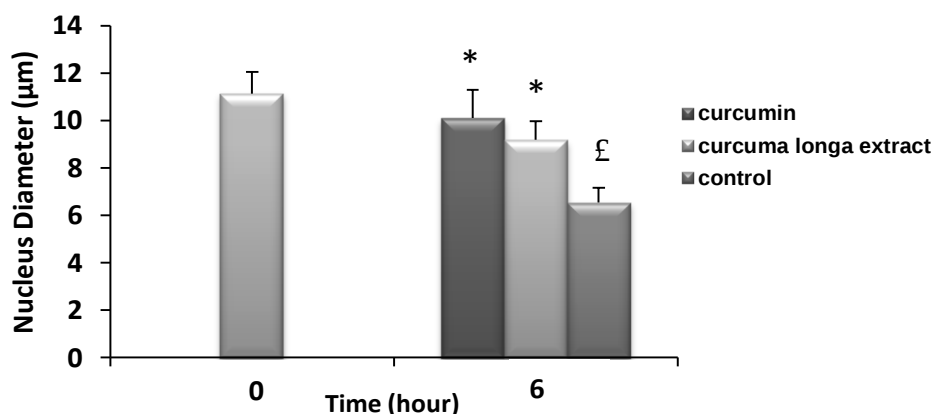
محلول غلیظ ۴۵۰۰ ppm آن با حلال آلی Dimethyl sulfoxide (DMSO) تهیه شد و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری شد. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از طریق آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون Tukey صورت گرفت و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از MTT نشان داد که قابلیت حیات قطعات کشت شده برای ۶ ساعت نسبت به قطعات تازه تهیه شده به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت، به طوری که توزیع رنگ بنفش (MTT فورمازان) در ماده سفید و خاکستری قطعات کشت شده (شکل ۱B)، نسبت به قطعات تازه تهیه شده (لحظه زمانی صفر) (شکل ۱A) کمتر بود. کاربرد جداگانه کورکومین با غلظت ۲۰ میکرومولار (شکل ۱C) و عصاره زردچوبه با غلظت ۱۰۰۰ ppm (شکل ۱D)، توانست به‌طور قابل ملاحظه‌ای قابلیت حیات قطعات کشت شده نخاع برای



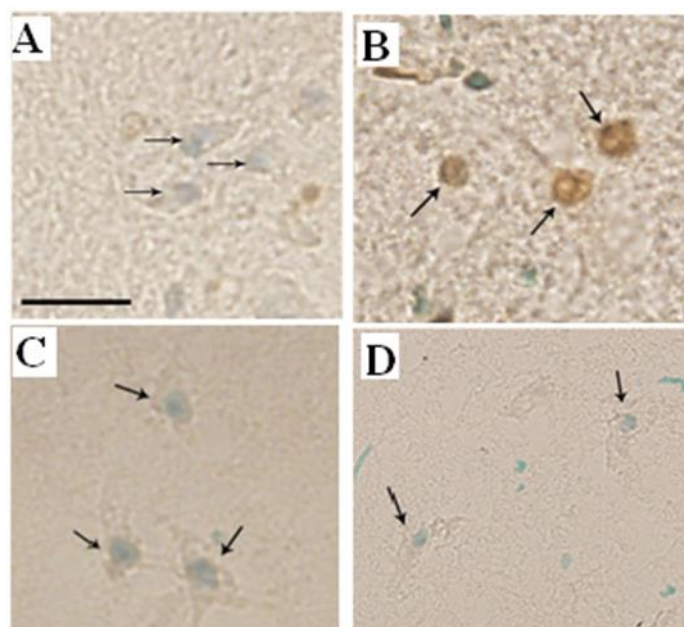
شکل ۲- نقش کورکومین و عصاره زردچوبه بر مهار جنبه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع. رنگ آمیزی فلوئورسنت پروپیدیوم آیوداید (قرمز) و هوخست ۳۳۳۴۲ (آبی) تغییرات را در نورون‌های حرکتی نشان می‌دهد. (A) نورون‌های حرکتی بدون علائم آپوپتوزیس از قطعات تازه تهیه شده (لحظه زمانی صفر). (B) نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده برای ۶ ساعت (کنترل). کاربرد کورکومین با غلظت ۲۰ میکرومولار (C)، و عصاره زردچوبه با غلظت ۱۰۰۰ ppm (D) برای ۶ ساعت توانست نشانه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس را در نورون‌های حرکتی به طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه کنترل مهار نماید. فلش‌ها نورون‌های حرکتی را نشان می‌دهند. Scale bar = 50 μm



شکل ۳- اثر کورکومین و عصاره زردچوبه بر قطر هسته نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع. میانگین قطر هسته نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع پس از گذشت ۶ ساعت نسبت به میانگین قطر هسته این نورون‌ها در لحظه زمانی صفر کاهش معنی‌داری را نشان داد. کاربرد جداگانه کورکومین (۲۰ μM) و عصاره زردچوبه (۱۰۰۰ ppm) پس از ۶ ساعت توانستند به طور معنی‌داری کاهش قطر هسته نورون‌های حرکتی را در مقایسه با کنترل مهار نمایند. $P < 0.05$; * در مقایسه با گروه کنترل و $P < 0.05$; E: در مقایسه با لحظه صفر (ANOVA, Tukey's test, n=25)

بدین ترتیب تانل منفی (TUNEL negative) بودند (شکل ۴A). پس از گذشت ۶ ساعت در محیط کشت هسته اکثر نورون‌های حرکتی به رنگ قهوه‌ای ظاهر شدند که بیانگر نشاندار شدن هسته این نورون‌ها و تانل مثبت

کورکومین و عصاره تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. (شکل ۳). در بررسی جنبه بیوشیمیایی آپوپتوزیس (شکسته شدن DNA) به کمک تکنیک تانل، هسته نورون‌های حرکتی برش‌های مربوط به قطعات لحظه زمانی صفر، بدون رنگ و



شکل ۴- بررسی اثرات کورکومین و عصاره زردچوبه بر مهار شکستگی DNA نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع با استفاده از تکنیک تانل (A): نورون‌های حرکتی برش‌های مربوط به لحظه زمانی صفر به صورت تانل منفی ظاهر شدند. (B): رنگ قهوه‌ای هسته‌ها بیانگر تانل مثبت بودن نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده پس از ۶ ساعت در محیط کشت می‌باشد. کاربرد کورکومین با غلظت ۲۰ میکرومولار (C)، و عصاره زردچوبه با غلظت ۱۰۰۰ ppm (D) پس از ۶ ساعت توانست شکستگی DNA را در نورون‌های حرکتی نسبت به گروه کنترل مهار نماید و نورون‌ها به صورت تانل منفی ظاهر شدند. فلش‌ها نورون‌های حرکتی را نشان می‌دهند. Scale bar = 50 μm.

امکان انجام آزمایش‌ها بر روی انسان به‌منظور بررسی مکانیسم‌های دخیل در آپوپتوزیس نورون‌ها وجود ندارد و به‌همین دلیل ضرورت استفاده از مدل‌های جانوری مطرح می‌گردد. از آنجا که نورون‌های حرکتی قطعات نخاع نیز به زودی و در طی ساعات اولیه کشت این قطعات دستخوش آپوپتوزیس می‌شوند [۱۵]، لذا کشت این قطعات می‌تواند به‌عنوان یک مدل مناسب جهت بررسی مکانیسم‌های دخیل در مرگ نورون به‌کار رود.

در این پژوهش، سنجش MTT مورد استفاده قرار گرفت تا قابلیت حیات قطعات نخاع را بر اساس ظرفیت میتوکندری‌های فعال سلول‌های آن مشخص نماید. در این تکنیک آنزیم‌های دهیدروژناز میتوکندریایی فعال باعث احیا نمک تترازولیوم MTT زرد رنگ به کریستال بنفش رنگ فورمازان می‌شوند و بدین ترتیب میزان رنگ بنفش تولید شده بیانگر قابلیت حیات سلولی می‌باشد [۱۲]. این تکنیک نه تنها برای ارزیابی قابلیت حیات و تزیاد سلولی به کار می‌رود [۱۸] بلکه روش معتبری برای سنجش قابلیت حیات قطعات نخاع نیز می‌باشد [۱۷].

در بررسی مورفولوژیکی با استفاده از رنگ‌آمیزی فلوئورسنت تغییرات سیتوپلاسمی و هسته‌ای ایجاد شده در

(TUNEL positive) بودن این سلول‌ها بود (شکل ۴B). در این زمان کاربرد جداگانه کورکومین با غلظت ۲۰ میکرومولار (شکل ۴C) و عصاره زردچوبه با غلظت ۱۰۰۰ ppm (شکل ۴D)، توانست شکستگی DNA را در این نورون‌ها نسبت به گروه کنترل مهار نماید و نورون‌ها به صورت تانل منفی ظاهر شدند.

بحث

در پژوهش حاضر کشت قطعات نخاع موش بالغ مورد استفاده قرار گرفت تا نقش استرس اکسیداتیو به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های احتمالی دخیل در آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی این قطعات مورد مطالعه قرار گیرد. به‌همین منظور از عصاره زردچوبه و ماده موثره آن به نام کورکومین که اثرات آنتی اکسیدانتی آن‌ها گزارش شده است [۱۴] استفاده شد. این بررسی نشان داد که کورکومین و عصاره زردچوبه توانستند به‌طور موثری آپوپتوزیس را در نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع مهار نمایند.

آپوپتوزیس به‌عنوان روشی برای مرگ نورون‌ها در ND [۱۳] و آسیب‌های نخاعی [۱۱] مطرح است. بدیهی است که

نورون‌های حرکتی در قطعات نخاع کشت شده در لحظه زمانی ۶ ساعت مورد مطالعه قرار گرفت. نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده مشخصاتی همچون چروکیدگی سیتوپلاسم، متراکم شدن هسته و کروماتین که به عنوان جنبه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس محسوب می‌شوند [۲۸، ۳۰] را به نمایش گذاشتند. نتایج حاصل از تکنیک تانل که مشخصه بیوشیمیایی آپوپتوزیس یعنی شکستگی DNA را نمایان می‌سازد [۲۹] توانست نتایج مورفولوژیکی را تایید نماید. به طور کلی و بر اساس نتایج کسب شده می‌توان بر این نکته تاکید کرد که مرگ نورون‌های حرکتی در قطعات کشت شده نخاع از نوع آپوپتوزیس بوده است.

شواهد نشان می‌دهد که مغز و نخاع به علت مصرف اکسیژن زیاد و دارا بودن مقادیر زیاد لیپید و کمی آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در مقایسه با سایر ارگان‌ها در مقابل ROS آسیب پذیر هستند [۵]. علاوه بر این یکی از مکانیسم‌های مطرح در مرگ نورون‌ها در طی آسیب‌های نخاعی و ND القا استرس اکسیداتیو می‌باشد [۴، ۲۴]. لذا این احتمال وجود دارد که القا استرس اکسیداتیو نیز عاملی برای آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی در قطعات کشت شده نخاع باشد. در صورتی که این احتمال درست باشد، کاربرد کورکومین و عصاره زردچوبه به عنوان آنتی اکسیدانت‌های مطرح می‌توانند آپوپتوزیس را در نورون‌های حرکتی مهار یا حداقل به تاخیر اندازد. با این فرض در تحقیق حاضر از این دو ماده استفاده شد تا نقش آن‌ها بررسی گردد. چنانچه نتایج نشان داد کاربرد جداگانه کورکومین و عصاره زردچوبه پس از ۶ ساعت نه تنها توانست به طور قابل ملاحظه‌ای قابلیت حیات قطعات کشت شده نخاع را افزایش دهد بلکه توانست جنبه‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی آپوپتوزیس را در نورون‌های حرکتی مهار نمایند. با توجه به تشابه نتایج حاصل از کورکومین و عصاره زردچوبه در این تحقیق، می‌توان نتیجه گرفت که اثرات ایجاد شده ناشی از عصاره زردچوبه به علت وجود ماده موثره آن یعنی کورکومین بوده است. نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند گویای این مطلب باشند که کورکومین و عصاره زردچوبه با داشتن خاصیت آنتی اکسیدانتی با مهار

استرس اکسیداتیو در نورون‌های حرکتی آپوپتوزیس را در این نورون‌ها به تاخیر انداخته‌اند. در حمایت از این ایده، تحقیقات مختلف نقش حفاظتی کورکومین [۱، ۳] و عصاره زردچوبه [۱۹] را در مقابله با مرگ سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو نشان می‌دهد. با این حال اندازه‌گیری شاخص‌های حاصل از پراکسیداسیون لیپید مثل مالون دی آلدئید و یا اندازه‌گیری آنزیم‌های متعلق به سیستم دفاعی آنتی اکسیدانتی در این قطعات در حضور یا عدم حضور کورکومین و عصاره زردچوبه می‌تواند احتمال القا استرس اکسیداتیو به عنوان مکانیسمی برای آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی در قطعات کشت شده نخاع را قوت بخشد.

اگرچه خواص مختلفی از جمله ضد سرطان، ضد میکروب و ضد التهاب برای کورکومین مطرح است [۹] اما با توجه به مطالعات گذشته و همچنین مطالعه حاضر، نقش محافظت از نورون (neuroprotective) کورکومین مورد تاکید قرار می‌گیرد. از آنجا که کورکومین قادر است از سد خونی-مغزی عبور نماید [۲۷]، لذا مصرف زردچوبه با دارا بودن ماده موثره خود یعنی کورکومین به عنوان یک آنتی اکسیدانت طبیعی قوی پیشنهاد می‌گردد. وجود این ماده در رژیم غذایی موجب افزایش سیستم دفاعی آنتی اکسیدانتی بدن و سیستم عصبی شده و با استراتژی پیشگیری از مرگ نورون می‌تواند جهت حفاظت نورون‌ها در مقابل استرس اکسیداتیو عمل نماید.

از آنجا که کورکومین و عصاره زردچوبه با خاصیت آنتی اکسیدانتی قوی توانستند نشانه‌های آپوپتوزیس را در نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع مهار نماید، این احتمال وجود دارد که این مواد از طریق مهار استرس اکسیداتیو و یا افزایش سیستم دفاعی آنتی اکسیدانتی باعث مهار آپوپتوزیس در این نورون‌ها شده‌اند.

سپاسگزاری

این پژوهش در آزمایشگاه تحقیقات فیزیولوژی جانوری گروه زیست شناسی دانشگاه اراک و با حمایت مالی این دانشگاه انجام شده است.

References

- [1] Ataie A, Sabetkasaei M, Haghparast A, Hajizadeh Moghaddam A, Ataie R, Nasiraei Moghaddam S, An investigation of the neuroprotective effects of Curcumin in a model of Homocysteine - induced oxidative stress in the rat's brain. *Daru* 18 (2010) 128-136.
- [2] Bala K, Tripathy BC, Sharma D, Neuroprotective and anti-ageing effects of curcumin in aged rat brain regions. *Biogerontology* 7 (2006) 81-89.
- [3] Calaf GM, Echiburu-Chau C, Roy D, Chai Y, Wen G, Balajee AS, Protective role of curcumin in oxidative stress of breast cells. *Oncol Rep* 26 (2011) 1029-1035.
- [4] Cookson MR, Shaw PJ, Oxidative stress and motor neurone disease. *Brain Pathol* 9 (1999) 165-186.
- [5] Coyle JT, Puttfarcken P, Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262 (1993) 689-695.
- [6] Esposito E, Rotilio D, Di Matteo V, Di Giulio C, Cacchio M, Algeri S, A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiol Aging* 23 (2002) 719-735.
- [7] Gandhi S, Abramov AY, Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev* 2012 (2012) 428010.
- [8] Golden TR, Patel M, Catalytic antioxidants and neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal* 11 (2009) 555-570.
- [9] Jayaprakasha GK, Jagan Mohan Rao L, Sakarish KK, Chemistry and biological activities of C. longa. *Trends Food Tech* 16 (2005) 533-548.
- [10] Kapoor S, Priyadarsini KI, Protection of radiation-induced protein damage by curcumin. *Biophys Chem* 92 (2001) 119-126.
- [11] Koray AK, Tekeli A, Isbir S, Apoptosis in ischemic spinal cord injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 131 (2006) 1212-1213.
- [12] Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D, Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 69 (1997) 581-593.
- [13] Martin LJ, Price AC, Kaiser A, Shaikh AY, Liu Z, Mechanisms for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis and in models of motor neuron death. *Int J Mol Med* 5 (2000) 3-13.
- [14] Menon VP, Sudheer AR, Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol* 595 (2007) 105-125.
- [15] Momeni HR, Azadi S, Kanje M, Calpain activation and apoptosis in motor neurons of cultured adult mouse spinal cord. *Funct Neurol* 22 (2007) 105-110.
- [16] Momeni HR, Jarahzadeh M, Effects of a voltage sensitive calcium channel blocker and a sodium calcium exchanger inhibitor on apoptosis of motor neurons in adult spinal cord slices. *Cell J* 14 (2012) 171-176.
- [17] Momeni HR, Soleimani Mehranjani M, Abnosi MH, Nasimi P, Evaluation of viability in adult mouse spinal cord slices by MTT assay. *Iranian Journal of Biology* 23 (2010) 267-274.
- [18] Mosmann T, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65 (1983) 55-63.
- [19] Nada AS, Hawas AM, Amin Nel D, Elnashar MM, Abd Elmageed ZY, Radioprotective effect of Curcuma longa extract on gamma-irradiation-induced oxidative stress in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 90 (2012) 415-423.
- [20] Pizzi M, Benarese M, Boroni F, Goffi F, Valerio A, Spano PF, Neuroprotection by metabotropic glutamate receptor agonists on kainate-induced degeneration of motor neurons in spinal cord slices from adult rat. *Neuropharmacology* 39 (2000) 903-910.
- [21] Pyrzanowska J, Piechal A, Blecharz-Klin K, Lehner M, Skorzevska A, Turzynska D, Sobolewska A, Plaznik A, Widy-Tyszkiewicz E, The influence of the long-term administration of Curcuma longa extract on learning and spatial memory as well as the concentration of brain neurotransmitters and level of plasma corticosterone in aged rats. *Pharmacol Biochem Behav* 95 (2010) 351-358.
- [22] Roy M, Sinha D, Mukherjee S, Biswas J, Curcumin prevents DNA damage and enhances the repair potential in a chronically arsenic-exposed human population in West Bengal, India. *Eur J Cancer Prev* 20 (2011) 123-131.
- [23] Sarvalkar PP, Walvekar MV, Bhopale LP, Antioxidative effect of curcumin (Curcuma longa) on lipid peroxidation and lipofuscinogenesis in submandibular

- gland of D-galactose-induced aging male mice. *J Med plants Res* 5 (2011) 5191-5193.
- [24] Shukla V, Mishra SK, Pant HC, Oxidative stress in neurodegeneration. *Adv Pharmacol Sci* 2011 (2011) 572634.
- [25] Stefanis L, Burke RE, Greene LA, Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Curr Opin Neurol* 10 (1997) 299-305.
- [26] Tehranipour M, Javaheri R, Neuroprotective effect of Curcuma longa alcoholic extract on peripheral nerves degeneration after sciatic nerve compression in rats. *J Biol Sci* 9 (2009) 889-893.
- [27] Tsai YM, Chien CF, Lin LC, Tsai TH, Curcumin and its nano-formulation: the kinetics of tissue distribution and blood-brain barrier penetration. *Int J Pharm* 416 (2011) 331-338.
- [28] Vogelbaum MA, Tong JX, Rich KM, Developmental regulation of apoptosis in dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 18 (1998) 8928-8935.
- [29] Wyllie AH, Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284 (1980) 555-556.
- [30] Yeo W, Gautier J, Early neural cell death: dying to become neurons. *Dev Biol* 274 (2004) 233-244.
- [31] Yuan J, Yankner BA, Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407 (2000) 802-809,.