

Involvement of Bax and Bcl2 in Neuroprotective Effect of Curcumin in Kainic Acid-Induced Model of Temporal Lobe Epilepsy in Male Rat

Kiasalari Z¹, Roghani M *¹, Baluchnejadmojarad T², Abdolrazaghnezhad A³

¹ Neurophysiology Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

² Department of Physiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ General Practitioner, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

* *Corresponding author.* Tel: +982188964792 Fax: +982188966310 E-mail: mehjour@yahoo.com

Received: Oct 16, 2014

Accepted: Apr 15, 2015

ABSTRACT

Background & objectives: Temporal lobe epilepsy is associated with neuronal apoptosis. Curcumin has antioxidant and anticonvulsant activities, therefore this study was conducted to assess involvement of Bax and Bcl2 in protective effect of curcumin in epileptic rats.

Methods: 28 rats were divided into sham, curcumin-pretreated sham, epileptic (kainate), and curcumin-pretreated epileptic groups. Experimental model of epilepsy was induced by intrahippocampal administration of kainic acid. Rats received curcumin at a dose of 100 mg/kg. Finally, Nissl staining and Bax and Bcl2 immunohistochemistry were conducted on hippocampal sections and data were analyzed using one-way ANOVA and unpaired t-test. The *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results: Induction of epilepsy was followed by a significant seizure and curcumin pretreatment significantly reduced seizure intensity (*p*<0.01). In addition, there were no significant differences between the groups in Nissl staining of CA3 area neurons. In addition, Bax positive neurons were observed in CA3 area in kainate group and significantly decreased in curcumin pretreated rats (*p*<0.05). Meanwhile, Bcl2 positive neurons were also moderately observed in kainate group and curcumin pretreatment significantly increased it (*p*<0.05).

Conclusion: Curcumin pretreatment exhibits anticonvulsant activity in epileptic rats. It also decreases the expression of pro-apoptotic protein Bax and significantly enhances the expression of anti-apoptotic protein Bcl2 and hence could reduce neuronal apoptosis.

Keywords: Curcumin; Temporal Lobe Epilepsy; Seizure; Kainic Acid; Hippocampus; Apoptosis; Bcl2; Bax.

نقش مسير Bax و Bcl2 در بروز اثر حفاظت نورونی کورکومین در مدل صرع لب گیجگاهی القا شده با اسید کاینیک در موش صحرایی نر

زهرا کياسالاری^۱، مهرداد روغنی^{۱*}، توراندخت بلوچ نژاد^۲، اطهر عبدالرزاق نژاد^۳

۱. مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران ۲. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۳. دانش آموخته پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن ۰۲۱۸۸۹۶۴۷۹۲ فاکس: ۰۲۱۸۸۹۶۳۱۰ پست الکترونیک: mehjour@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: صرع لب گیجگاهی با آپوپتوز نورونی همراه می‌باشد. کورکومین دارای اثر آنتی اکسیدانی و ضد تشنجی می‌باشد، لذا هدف این بررسی تعیین نقش مسير Bax و Bcl2 در اثربخشی کورکومین در موش‌های صحرایی صرعی بود. **روش کار:** ۲۸ موش صحرایی به چهار گروه شام، شام پیش تیمار شده با کورکومین، صرعی (کاینات) و صرعی پیش تیمار شده با کورکومین تقسیم شدند. برای صرعی نمودن حیوانات از تزریق داخل هیپوکامپی اسید کاینیک استفاده شد. کورکومین به میزان ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم تجویز شد. در پایان کار، رنگ آمیزی نیسل و ایمونوهیستوشیمی Bax و Bcl2 در مورد برش‌های هیپوکامپ انجام شد و داده‌ها با استفاده از دو آزمون آماری آنوای یکطرفه و تی تست غیر مزدوج آنالیز شدند و سطح معنی دار $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: صرع یک رفتار تشنجی شدید را به همراه داشت و تجویز کورکومین باعث کاهش معنی‌دار شدت حملات تشنج شد ($p < 0.01$)، در رنگ آمیزی نیسل تفاوت معنی دار بین گروه‌ها از نظر تعداد نورون در ناحیه CA3 مشاهده نشد. در گروه صرعی، تعداد نسبتاً زیاد از نورون‌های Bax مثبت در این ناحیه مشاهده شد و پیش تیمار گروه کاینات با کورکومین موجب کاهش معنی دار تعداد این نورون‌ها گردید ($p < 0.05$). در گروه صرعی تعداد متوسطی از نورون‌های Bcl2 مثبت مشاهده شد و پیش تیمار با کورکومین موجب افزایش معنی دار تعداد این نورون‌ها گردید ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: پیش تیمار موش‌های صرعی شده با کورکومین دارای خاصیت ضد تشنجی بوده، موجب کاهش پروتئین پیش‌برنده آپوپتوز Bax شده و پروتئین آنتی آپوپتوتیک Bcl2 را افزایش داد که این بطور کلی در جهت کاهش آپوپتوز نورونی عمل خواهد نمود.

واژه‌های کلیدی: کورکومین، صرع لب گیجگاهی، تشنج، اسید کاینیک، هیپوکامپ، آپوپتوز، Bax، Bcl2

دریافت: ۹۳/۷/۲۴ پذیرش: ۹۴/۱/۲۶

مقدمه

صرع عبارت است از اختلال متناوب، ناگهانی و شدید سیستم عصبی ناشی از تخلیه ناهنجار همزمان تعدادی از نورون‌های مغزی که این تخلیه منجر به اختلال حسی، از بین رفتن هوشیاری، اختلال فعالیت روانی و حرکات تشنجی می‌شود. بیماری صرع یکی از جدی‌ترین و مهمترین اختلالات عصبی است که ۱-۵ درصد جمعیت جهان را تحت تاثیر قرار

می‌دهد (۱). تشنج‌ها در حداقل ۳۰ درصد از بیماران مبتلا به صرع هنوز کنترل نشده است و میلیون‌ها نفر در سراسر جهان نیاز به داروهای موثرتری برای درمان دارند (۲). مشاهده می‌شود که در بیماری صرع، افزایش آپوپتوز نورونی در برخی نواحی مغز بویژه ناحیه هیپوکامپ رخ می‌دهد که از نشانه‌های بارز آن افزایش تعداد نورون‌های Bax مثبت و کاهش نورون‌های Bcl2 مثبت در ناحیه هیپوکامپ

می‌باشد که این در جهت تشدید آپوپتوز و نهایتاً مرگ نورون‌ها عمل می‌کند. پروتئین Bcl-2 که با ژن BCL2 کدگذاری می‌شود، یک پروتئین آنتی آپوپتوتیک می‌باشد. پروتئین Bax یا پروتئین x وابسته به Bcl2 پروتئین تنظیم‌کننده آپوپتوز می‌باشد که با ژن Bax رمزگذاری می‌شود. Bax عضو خانواده ژن Bcl-2 بوده و تنظیم‌کننده آپوپتوز می‌باشد (۳). در طی چند سال اخیر، مواد طبیعی و مواد مشتق از گیاهان دارویی در درمان حفاظتی بیماری‌های عصبی بطور روزافزون مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۴). در این خصوص، کورکومین در گروه فلاونوئیدها مهم‌ترین ماده موثره موجود در گیاه زردچوبه می‌باشد که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و حفاظت عصبی در مدل صرع القاشده با اسید کاینیک، ضد صرعی در مدل صرع القاشده با پنتیلن تترازول، ماکزیمال الکتروشوک و کیندلینگ الکتریکی می‌باشد (۵-۹). بعلاوه، در مورد آن بهبود پارامترهای رفتاری در مدل صرع القاشده با اسید کاینیک اثبات شده است (۶). همچنین گزارش شده که این ماده می‌تواند در مدل ایسکمی مغزی دارای خاصیت آنتی‌آپوپتوتیک باشد (۱۰). هدف بررسی حاضر تعیین اثر حفاظتی سودمند این ماده و تعیین نقش مسیر Bax و Bcl2 در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی صرعی شده توسط اسید کاینیک می‌باشد.

روش کار

در این مطالعه از ۲۸ سر موش صحرایی نر سفید نژاد ویستار (انستیتو پاستور، تهران) در محدوده وزنی ۲۹۰-۲۴۰ گرم استفاده شد. تمام حیوانات در دمای ۲۳-۲۱ درجه‌ی سانتیگراد در گروه‌های ۳ تا ۴تایی در هر قفس قرار گرفتند. این بررسی بر اساس اصول توصیه شده انستیتو ملی بهداشت آمریکا (NIH) برای نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی به انجام رسید. موش‌ها به طور تصادفی

به ۴ گروه شم (جراحی کاذب)، شم دریافت‌کننده کورکومین، صرعی، و صرعی دریافت‌کننده کورکومین تقسیم شدند. برای صرعی نمودن حیوانات از اسید کاینیک (سیگما، آمریکا) به میزان ۱ میکروگرم به ازای هر موش حل شده در محلول نرمال سالین تزریق شده به داخل ناحیه CA3 هیپوکامپ سمت راست (۶) با مختصات قدامی خلفی: ۴/۲ میلی‌متر، جانبی: ۴/۱ میلی‌متر، و ونترال: ۴/۴ - ۴/۲ میلی‌متر زیر سطح جمجمه با استفاده از سرنگ هامیلتون (حجم تزریقی برابر با ۲ میکرولیتر) و به روش استریوتاکسی و بیپوشی با کلرال هیدرات (۳۵۰-۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به فرم داخل صفاقی) استفاده شد. گروه شم نیز فقط محلول نرمال سالین را با همان حجم دریافت نمود. کورکومین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور روزانه و به فرم خوراکی با استفاده از سوزن گاوآز از دو روز قبل از جراحی تا یکساعت قبل از زمان جراحی جمعاً ۳ بار تجویز شد. دوز کورکومین بر اساس یک بررسی قبلی در این زمینه انتخاب شد (۶). برای حل نمودن کورکومین از کروموفور ۱۰٪ استفاده شد. در بیست و چهار ساعت اول پس از جراحی پس از به هوش آمدن کامل موش‌ها، آنها از نظر رفتار تشنجی براساس تقسیم‌بندی Racine (رتبه‌بندی از صفر تا پنج) در یک فاصله زمانی چهارساعته با استفاده از دوربین ثبت رفتار و انتقال داده‌ها به کامپیوتر مورد ارزیابی دقیق قرار گرفتند. در این خصوص، نمره صفر برای عدم مشاهده پاسخ، نمره یک برای مانتینگ، چشمک زدن، و یا کلونوس صورت در حد خفیف، نمره دو برای تکان دادن سر و یا کلونوس‌های متعدد در ناحیه سر، نمره سه برای پرش‌های میوکلونیک در اندام‌های حرکتی جلو، نمره چهار برای تشنجات کلونیک در اندام حرکتی جلویی و بلندشدن بر روی دو پا، و نمره پنج برای تشنجات کلونیک و سراسری در بدن و از دست رفتن تعادل در نظر گرفته شد. در روز دوم پس از جراحی،

آزمایشات بعدی به شرح زیر در مورد آنها انجام شد. پس از بیست و چهار ساعت، موش‌ها توسط دوز بالای کتامین (۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن) بیهوش شده، پس از باز نمودن قفسه سینه در ابتدا ۱۰۰ میلی لیتر نرمال سالین حاوی هپارین و بعد از آن ۱۰۰ تا ۱۵۰ میلی لیتر محلول پارافرمالدئید ۴ درصد در بافر فسفات ۰/۱ مولار عبور داده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲-۱ روز در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار حاوی ۳۰٪ سوکروز قرار گرفتند و در ادامه برش‌گیری به وسیله دستگاه میکروتوم فریزینگ (لایکا، آلمان) انجام شد. برش‌های بافتی با ضخامت ۲۰ میکرون بر روی لام‌های ژلاتینه قرار گرفت و پس از خشک شدن، مراحل رنگ‌آمیزی نیسل (کرزیل ویوله) و ایمونوهیستوشیمی Bax و Bcl2 در مورد آنها انجام گرفت.

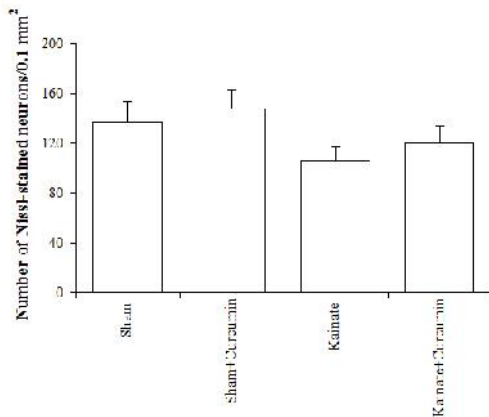
برای ایمونوهیستوشیمی، برش‌های بافتی به ترتیب در معرض بوروهیدرید سدیم ۰/۱ درصد در بافر PBS، شستشو با بافر PBS ۲-۳ بار، مخلوط متانول و آب اکسیژنه ۰/۳ درصد، شستشو با بافر PBS ۲-۳ بار، تریتون X-100 ۰/۳ درصد در بافر PBS و آلبومین سرم گاوی ۰/۵ درصد، شستشو با بافر PBS و آنتی‌بادی اولیه پلی‌کلونال علیه Bax یا Bcl2 (Abcam) با رقت یک دویستم در بافر PBS به مدت ۱۲ ساعت در تاریکی قرار گرفتند. در ادامه پس از شستشو با بافر PBS ۲-۳ بار، نمونه‌ها به ترتیب در معرض آنتی‌بادی ثانویه متصل به آنزیم HRP (Abcam) با رقت یک دویستم در بافر PBS به مدت ۲ ساعت در تاریکی، شستشو با بافر PBS ۲-۳ بار، اضافه نمودن کروموژن دی‌آمینوبنزیدین DAB (۱۰ میلی گرم در ۲۰ میلی لیتر بافر) و در مجاورت آب اکسیژنه ۰/۳ درصد در تاریکی قرار گرفتند تا رنگ قهوه‌ای ظاهر شود، در ادامه کانتراستین با رنگ هماتوکسیلین در حد ملایم انجام شد و در مورد نمونه‌ها آب‌گیری و شفاف‌سازی انجام شد.

برای شمارش نورونی در مورد هر موش، برش‌های بخش مرکزی هیپوکمپ مطابق اطلس پاکسینوس و واتسون مورد بررسی قرار گرفتند. در رنگ‌آمیزی نیسل، نورون‌های هر می با محدوده سیتوپلاسمی واضح با بزرگنمایی $\times 400$ در یک محدوده ۰/۱ میلی‌متر مربع با استفاده از ابزار اندازه‌گیری برنامه Image Tool نسخه ۳ شمارش گردیدند. در این خصوص برای جلوگیری از شمارش مجدد یک نورون، حداقل فاصله بین برش‌ها حداقل ۵۰ میکرومتر بود. در مورد نمونه‌های ایمونوهیستوشیمی نیز تعداد نقاط قهوه‌ای (تیره رنگ) در همان ناحیه در یک محدوده ۰/۱ میلی‌متر مربع شمارش شد. در نهایت در مورد هر موش میانگین تعداد به دست آمد.

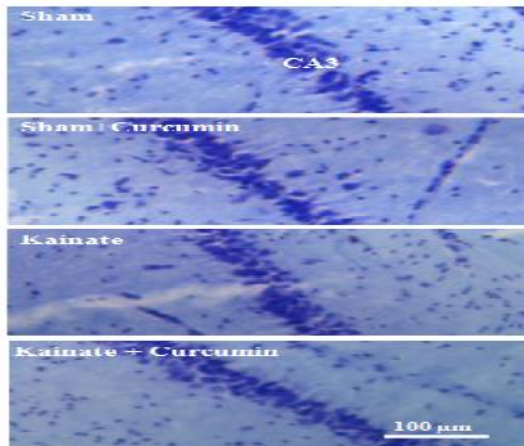
از نظر آماری، تمامی نتایج بصورت میانگین \pm خطای استاندارد (SEM) بیان گردید. پس از مشخص نمودن توزیع داده‌ها، از آزمون آنوای یکطرفه و پست تست توکی برای آنالیز داده‌های بافت‌شناسی استفاده گردید. همچنین از آزمون t-test برای مقایسه دو گروه صرعی و صرعی پیش‌تیمار شده با کورکومین استفاده شد. برای بررسی آماری هم از نرم افزار سیگماستات نسخه ۳/۵ استفاده شد. در تمام بررسی‌ها $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در نمودار ۱ یافته‌های مربوط به کمیت رفتار تشنجی بر اساس تقسیم‌بندی راسین (رتبه بندی از ۰ تا ۵) در گروه‌های تحت بررسی آورده شده است. در این خصوص در گروه‌های کنترل با جراحی کاذب (شم) و شم پیش‌تیمار شده با کورکومین، عملاً هیچ گونه رفتار تشنجی در حیوانات مشاهده نشد. در گروه صرعی شده با اسید کابنیک (کاینات) یک رفتار تشنجی بارز مشاهده شد و پیش‌تیمار با کورکومین باعث کاهش بارز و معنی‌دار رفتار تشنجی حیوانات گردید



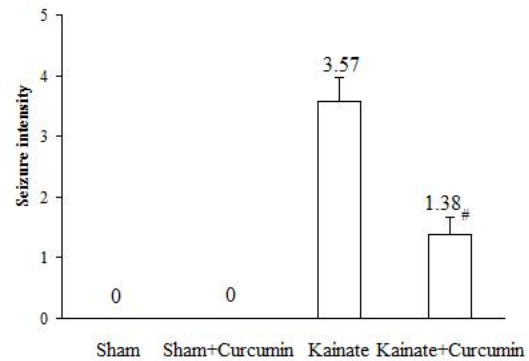
نمودار ۲. تراکم نورون‌های هرمی (رنگ آمیزی شده توسط نیسل) در ناحیه CA3 هیپوکامپ در موش‌های صحرایی کنترل و کنترل پیش تیمار شده با کورکومین و صرعی و صرعی پیش تیمار شده با کورکومین در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم



شکل ۱. عکس میکروسکوپ نوری از ناحیه CA3 هیپوکامپ گروه‌های مختلف رنگ آمیزی شده با کرزیل ویوله

در بررسی ایمونوهیستوشیمی و استفاده از آنتی‌بادی علیه پروتئین BAX، در گروه‌های شم و شم پیش تیمار شده با کورکومین، نورون مثبت از این نظر در ناحیه CA3 هیپوکامپ مشاهده نشد. در گروه صرعی شده با کاینات، تعداد نسبتاً زیاد از این نورون‌ها در این ناحیه مشاهده شد و پیش تیمار گروه کاینات با کورکومین موجب کاهش معنی‌دار تعداد این نورون‌ها در مقایسه با گروه کاینات گردید ($p < 0.05$) (نمودار ۳ و شکل ۲).

($p < 0.01$). در این رابطه، تمام موش‌های گروه کاینات حداقل یک بار رفتار تشنجی نمره ۵ را نشان دادند، در حالی که گروه کاینات پیش تیمار شده با کورکومین، ۵۷ درصد موش‌ها دارای حداکثر نمره تشنجی ۴ برای حداقل ۱ بار بودند، هر چند میانگین کلی رفتار تشنجی آنها کمتر بود.

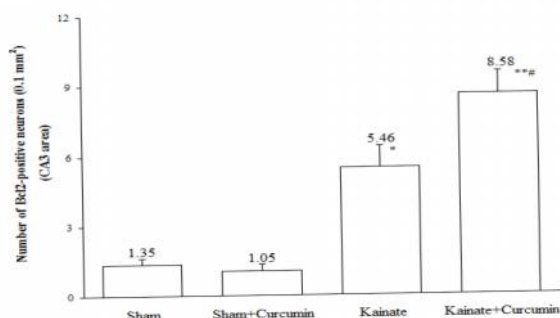


نمودار ۱. شدت رفتار تشنجی بر اساس تقسیم‌بندی راسین در موش‌های صحرایی کنترل و کنترل پیش تیمار شده با کورکومین و صرعی و صرعی پیش تیمار شده با کورکومین در طی ۲۴ ساعت اول پس از جراحی

$p < 0.01$ (در مقایسه با گروه کاینات) (آزمون t test غیر مزدوج)

در بررسی هیستوپاتولوژیک با روش رنگ آمیزی نیسل و استفاده از رنگ کرزیل ویوله، در گروه شم، در ناحیه CA3 هیپوکامپ، نورون‌های هرمی با محدوده سیتوپلاسمی واضح قابل مشاهده بودند، در گروه شم پیش تیمار شده با کورکومین، تغییر خاصی از این نظر مشاهده نشد؛ در گروه صرعی شده با اسید کاینیک (کاینات)، هر چند اندازه نورون‌ها کوچک‌تر و چروکیده‌تر به نظر می‌آمد ولی از نظر تعداد تفاوت معنی‌دار با گروه شم مشاهده نشد و در گروه صرعی و پیش تیمار شده با کورکومین تغییر معنی‌دار از این نظر در مقایسه با گروه‌های شم یا کاینات مشاهده نشد ($F(3,26)=1.9$) (نمودار ۲ و شکل ۱).

نورون‌ها در این ناحیه مشاهده شد و پیش تیمار گروه کاینات با کورکومین موجب افزایش معنی‌دار تعداد این نورون‌ها در مقایسه با گروه کاینات گردید ($F(3,25)=14.1$) ($p<0.05$) (نمودار ۴ و شکل ۲).

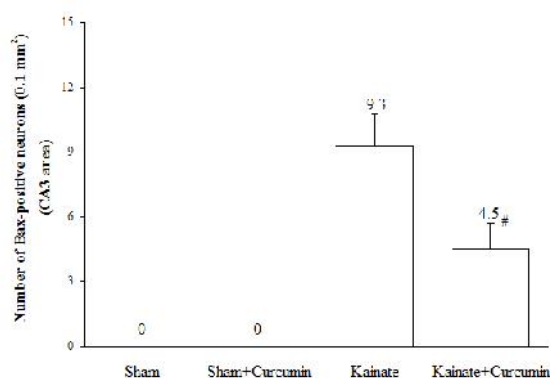


نمودار ۴. تراکم نورون‌های ایمونوراکتیو مثبت Bcl2 در ناحیه CA3

هیپوکامپ در گروه‌های مختلف

* $p<0.01$, ** $p<0.001$ (در مقایسه با گروه شم)

$p<0.05$ (در مقایسه با گروه کاینات) (آزمون t غیر مزدوج)

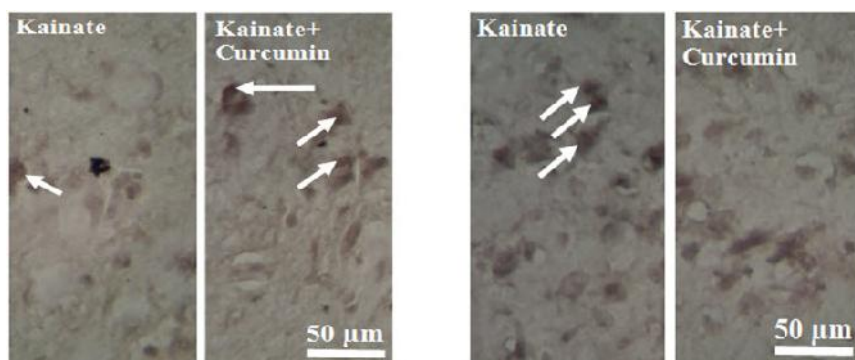


نمودار ۳. تراکم نورون‌های ایمونوراکتیو مثبت BAX در ناحیه CA3

هیپوکامپ در گروه‌های مختلف

$p<0.05$ (در مقایسه با گروه کاینات) (آزمون t غیر مزدوج)

در بررسی ایمونوهیستوشیمی و استفاده از آنتی‌بادی علیه پروتئین Bcl2، در گروه‌های شم و شم پیش تیمار شده با کورکومین، تعداد کمی نورون مثبت از این نظر در ناحیه CA3 هیپوکامپ در گروه شم مشاهده شد، پیش تیمار گروه شم با کورکومین تغییر معنی‌دار از این نظر ایجاد نمود، در گروه صرعی شده با کاینات، تعداد نسبتاً زیاد از این



شکل ۲. عکس میکروسکوپ نوری از ناحیه CA3 هیپوکامپ در دو گروه کاینات و کاینات پیش تیمار شده با کورکومین در ایمونوهیستوشیمی Bax

(راست) و Bcl2 (چپ)

رنگ‌آمیزی شده در ناحیه CA3 هیپوکامپ مشاهده نشد، در گروه صرعی شده، تعداد نسبتاً زیاد از نورون‌های Bax مثبت در این ناحیه مشاهده شد و پیش تیمار گروه کاینات با کورکومین موجب کاهش معنی‌دار تعداد این نورون‌ها در مقایسه با گروه کاینات گردید. همچنین، در گروه صرعی شده تعداد متوسطی از نورون‌های Bcl2 مثبت مشاهده شد و

بحث

نتایج این بررسی مشخص نمود که القاء صرع لب گیجگاهی با استفاده از تزریق داخل هیپوکامپی اسید کاینیک با یک رفتار تشنجی بارز همراه می‌باشد، تجویز کورکومین باعث کاهش معنی‌دار شدت حملات تشنج شد، در رنگ‌آمیزی نیسل تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها از نظر تعداد نورون

پیش تیمار این گروه با کورکومین موجب افزایش معنی‌دار تعداد این نورون‌ها گردید.

از نظر هیستوپاتولوژی، در صرع لب گیجگاهی تحلیل‌رفتن و آپوپتوز نورونی در مراحل اولیه (که به صورت افزایش بیان پروتئین Bax و کاهش بیان پروتئین حفاظتی Bcl2 خود را نشان می‌دهد) (۱۱)، آستروگلیوز و رشد فیبرهای خزه‌ای نابجا به داخل لایه مولکولی شکنج دندانه‌ای مشاهده می‌شود (۱۲). در مدل‌های حیوانی صرع القاشده توسط تزریق داخل هیپوکامپی اسید کاینیک، بعلت تخریب نورون‌های CA3 (نورون‌های هدف) که دارای تراکم بالایی از گیرنده‌های گلوتامات هستند، مسیرهای گلوتاماترژیک در آن ناحیه از هیپوکامپ تشدید می‌گردد و نهایتاً خود را بصورت درجات مختلفی از حملات صرع با توجه به شدت آسیب نشان می‌دهند (۱۳). مطالعات قبلی نشان داده است که تزریق داخل مغزی اسید کاینیک می‌تواند با ایجاد سمیت تحریکی باعث بروز تشنج و آسیب مغزی در موش صحرایی شود (۶). همچنین، تشنج ایجاد شده در موش صحرایی به واسطه اسید کاینیک باعث تغییر در بیان بسیاری از ژن‌های درگیر در پلاستیسیته سیناپسی و گلیوز می‌گردد (۱۴). از طرف دیگر تزریق اسید کاینیک با افزایش قابل توجه در میزان NO و در نتیجه استرس اکسیداتیو موجب نوروکسیسیتی در مغز می‌شود (۶). از آنجایی که مغز بیشترین مقدار اکسیژن را در مقایسه با سایر ارگان‌ها استفاده می‌کند و همچنین اسیدهای چرب غیراشباع زیادی را در بر می‌گیرد که مستعد پراکسیداسیون لیپیدی هستند، بسیار مستعد جهت آسیب اکسیداتیو است (۶). در جریان استرس اکسیداتیو برخی شاخص‌های بیوشیمیایی در هیپوکامپ مانند مالون دی‌آلدئید و نیتريت افزایش یافته و سطح فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) بعنوان سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌یابد (۶). بعلاوه مطالعات شین و همکاران نشان داده است که اسید کاینیک

فعالیت کاسپاز ۳ را از طریق آزاد کردن سیتوکروم C تقویت کرده و از این طریق موجب آپوپتوز و در نهایت تحلیل رفتن نورونی می‌شود (۱۵). ارتباط نزدیکی میان فرایند سیگنالینگ آپوپتوز و سطح بیان پروتئین UCP2 که موجب تثبیت پتانسیل غشاء میتوکندری می‌شود، وجود دارد که این ارتباط پس از تجویز مرکزی اسید کاینیک تحت تاثیر قرار می‌گیرد (۱۵). در تحقیق حاضر با تزریق داخل هیپوکامپی اسید کاینیک مدل صرع لوب گیجگاهی بوجود آمد و نتایج رفتاری و بافتی با مطالعات قبلی که کیاسالاری در سال ۲۰۱۳ انجام داده، مطابقت داشت (۶).

در این بررسی، پیش تیمار موش‌های صرعی شده با کورکومین موجب کاهش شدت تشنج شد و نسبت Bax به Bcl2 به عنوان یک شاخص ارزشمند آپوپتوز کاهش یافت که این نورون‌ها را در جهت کاهش آپوپتوز هدایت می‌کند. در یک مطالعه قبلی توسط احمد مشخص شد که تجویز کورکومین به موش‌های صحرایی صرعی شده با لیتیوم و پیلوکارپین از طریق بهبود عملکرد سیستم‌های میانجی مغز و کاهش دادن شدت استرس اکسیداتیو در بافت هیپوکامپ و استریاتوم موجب اعمال اثرات ضد تشنجی می‌گردد (۱۶)، که با نتایج مطالعه حاضر در مورد اثر ضد تشنجی آن مطابقت دارد. همچنین مطالعه کیاسالاری و همکاران نیز اثر حفاظتی کورکومین در مدل تجربی صرع لوب گیجگاهی القاشده با اسید کاینیک را نشان دادند که در این رابطه مشخص شد پیش تیمار با کورکومین دارای اثر کاهش‌دهندگی تشنج می‌باشد که این مطلب با بررسی حاضر مطابق بود (۶). بعلاوه در بررسی انجام‌شده توسط ثمینی و همکاران معلوم گردید که تجویز کورکومین موجب بهبود عملکرد مغز و کاهش شدت آسیب مغزی بدنبال اعمال آسیب تروماتیک مغز در موش‌های صحرایی می‌گردد که بخشی از این اثرات سودمند از طریق کاهش دادن میزان پراکسیداسیون لیپیدی به انجام می‌رسد که

این به خوبی موید اثرات حفاظتی این ماده می‌باشد (۱۷). در مطالعه کیاسالاری و همکاران نیز مشخص شد که تجویز خوراکی کورکومین از یک هفته قبل از جراحی با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم موجب کاهش اثرات سمی اسید کاینیک در بافت هیپوکمپ می‌شود، بطوری که شدت تشنج کاهش نشان داد، میزان آسیب نورونی هیپوکمپ بطور چشمگیر کاهش یافت و میزان جوانه‌زدن نورونی در لایه مولکولی نیز تخفیف یافت که بخشی از این اثرات سودمند از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان به انجام رسید (۶) که این وقایع در مطالعه حاضر نیز می‌تواند رخ داده باشد که با کاهش آپوپتوز نورونی در ناحیه هیپوکمپ همراه می‌شود. همچنین در مطالعه یو^۱ و همکاران، مشخص شد که کورکومین قادر است مسیر مرگ سلولی وابسته و غیروابسته به کاسپازها را بطور موثر مهار نماید (۱۸) که این می‌تواند کاهش نسبت Bax به Bcl2 در تحقیق حاضر را تا حدی توجیه نماید. بعلاوه کورکومین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی مطرح شده است که در جهت کاهش تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن عمل می‌نماید و موجب تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان می‌شود و به راحتی از سد خونی مغزی عبور می‌کند، لذا این ماده می‌تواند به سهولت در دسترس سلول‌های عصبی قرار گرفته و موجب حفاظت آنها در برابر عوامل آسیب‌رسان گردد (۱۹). همچنین در مطالعه گوئو و همکاران مشخص شد که اضافه نمودن کورکومین به محیط کشت میکروگلیاها و نورون‌های قشر مغز آسیب اکسیداتیو را از طریق مهار پراکسیداسیون لیپیدی کاهش می‌دهد و همچنین باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌شود و در مجموع باعث کاهش پاسخ التهابی می‌گردد و با میزان کمتر از آپوپتوز همراه می‌باشد (۲۰). برخلاف

مطالعه حاضر، در یک مطالعه که توسط کور^۲ و همکاران انجام شد، مشخص گردید که تجویز خوراکی کورکومین به میزان ۱۰۰ mg/kg در هنگام تزریق پنتیلین تترازول فاقد اثر ضد تشنجی بوده، هر چند موجب کاهش استرس اکسیداتیو میتوکندریایی و اختلال یادگیری حافظه می‌شود (۵). البته در مطالعه ما برای صرعی شدن از اسید کاینیک استفاده شده و کورکومین قبل از صرعی نمودن تجویز شده که این می‌تواند علت تفاوت مطالعه حاضر با بررسی کور باشد.

یکی از محدودیت‌های این تحقیق، عدم بررسی اثربخشی کورکومین بعد از تزریق کورکومین می‌باشد که توصیه می‌شود این امر در بررسی‌های آتی در این زمینه لحاظ شود. بعلاوه، اندازه‌گیری شاخص‌های استرس اکسیداتیو و التهابی در این مدل بدنبال تجویز کورکومین در آینده توصیه می‌شود.

نتیجه گیری

پیش‌تیمار با کورکومین در مدل تجربی صرع لب گیجگاهی دارای خاصیت ضد تشنجی بوده، موجب کاهش بیان پروتئین پیش برنده آپوپتوز (Bax) شد، و موجب افزایش بیان پروتئین آنتی‌آپوپتوتیک (Bcl2) گردید که در جهت کاهش آپوپتوز نورونی می‌تواند عمل نماید.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر حاصل پایان نامه دانشجوی پزشکی اطهر عبدالرزاق نژاد مصوب معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد در سال ۱۳۹۱ (۵۱۹-۹۳) می‌باشد و با حمایت مالی این دانشگاه به انجام رسیده است که بدینوسیله تشکر و قدردانی می‌گردد.

¹ Yue

² Kaur

References

- 1- Aylward RL. Epilepsy: a review of reports, guidelines, recommendations and models for the provision of care for patients with epilepsy. *Clin Med. (London)* 2008 Aug;8(4):433-8.
- 2- Galanopoulou AS, Kokaia M, Loeb JA, Nehlig A, Pitkanen A, Rogawski MA, et al. Epilepsy therapy development: technical and methodologic issues in studies with animal models. *Epilepsia*. 2013 Aug;54 Suppl 4:13-23.
- 3- Obulesu M, Lakshmi MJ. Apoptosis in Alzheimer's disease: an understanding of the physiology, pathology and therapeutic avenues. *Neurochem Res*. 2014 Dec;39(12):2301-12.
- 4- Abdollahi Fard M, Shojaii A. Efficacy of Iranian traditional medicine in the treatment of epilepsy. *Biomed Res Int*. 2013 Jul;2013:1-8.
- 5- Kaur H, Bal A, Sandhir R. Curcumin supplementation improves mitochondrial and behavioral deficits in experimental model of chronic epilepsy. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014 Oct;125:55-64.
- 6- Kiasalari Z, Roghani M, Khalili M, Rahmati B, Baluchnejadmojarad T. Antiepileptogenic effect of curcumin on kainate-induced model of temporal lobe epilepsy. *Pharm Biol*. 2013 Dec;51(12):1572-8.
- 7- Noor NA, Aboul Ezz HS, Faraag AR, Khadrawy YA. Evaluation of the antiepileptic effect of curcumin and *Nigella sativa* oil in the pilocarpine model of epilepsy in comparison with valproate. *Epilepsy Behav*. 2012 Jun;24(2):199-206.
- 8- Ezz HS, Khadrawy YA, Noor NA. The neuroprotective effect of curcumin and *Nigella sativa* oil against oxidative stress in the pilocarpine model of epilepsy: a comparison with valproate. *Neurochem Res*. 2011 Nov;36(11):2195-204.
- 9- Reeta KH, Mehla J, Pahuja M, Gupta YK. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions of valproate, phenytoin, phenobarbitone and carbamazepine with curcumin in experimental models of epilepsy in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2011 Sep;99(3):399-407.
- 10- Ovbiagele B. Potential role of curcumin in stroke prevention. *Expert Rev Neurother*. 2008 Aug;8(8):1175-6.
- 11- Bhowmik M, Saini N, Vohora D. Histamine H3 receptor antagonism by ABT-239 attenuates kainic acid induced excitotoxicity in mice. *Brain Res*. 2014 Sep;1581:129-40.
- 12- Dariani S, Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Thymoquinone attenuates astrogliosis, neurodegeneration, mossy fiber sprouting, and oxidative stress in a model of temporal lobe epilepsy. *J Mol Neurosci*. 2013 Nov;51(3):679-86.
- 13- Polli RS, Malheiros JM, Dos Santos R, Hamani C, Longo BM, Tannus A, et al. Changes in hippocampal volume are correlated with cell loss but not with seizure frequency in two chronic models of temporal lobe epilepsy. *Front Neurol*. 2014 Jul;5:111.
- 14- Bazan NG, Tu B, Rodriguez de Turco EB. What synaptic lipid signaling tells us about seizure-induced damage and epileptogenesis. *Prog Brain Res*. 2002;135:175-85.
- 15- Shin EJ, Ko KH, Kim WK, Chae JS, Yen TP, Kim HJ, et al. Role of glutathione peroxidase in the ontogeny of hippocampal oxidative stress and kainate seizure sensitivity in the genetically epilepsy-prone rats. *Neurochem Int*. 2008 May;52(6):1134-47.
- 16- Ahmad M. Protective effects of curcumin against lithium-pilocarpine induced status epilepticus, cognitive dysfunction and oxidative stress in young rats. *Saudi J Biol Sci*. 2013 Apr;20(2):155-62.
- 17- Samini F, Samarghandian S, Borji A, Mohammadi G, Bakaian M. Curcumin pretreatment attenuates brain lesion size and improves neurological function following traumatic brain injury in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013 Sep;110:238-44.
- 18- Yue YK, Mo B, Zhao J, Yu YJ, Liu L, Yue CL, et al. Neuroprotective effect of curcumin against oxidative damage in BV-2 microglia and high intraocular pressure animal model. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2014 Oct; 30(8): 657-64.
- 19- Pyun CW, Kim JH, Han KH, Hong GE, Lee CH. In vivo protective effects of dietary curcumin and capsaicin against alcohol-induced oxidative stress. *Biofactors*. 2014 Sep-Oct; 40(5): 494-500.
- 20- Guo L, Xing Y, Pan R, Jiang M, Gong Z, Lin L, et al. Curcumin protects microglia and primary rat cortical neurons against HIV-1 gp120-mediated inflammation and apoptosis. *PLoS One*. 2013 Aug;8(8):e70565.