

Original article

Morphological Evaluation of Cerebellar Purkinje Neurons in Adult Male Rats with Spinal Cord Injury Following Curcumin Treatment

Kaveh Samadi¹, Ramin Salimnejad², Mohammad Jannatdoost¹, Behnam Ahadi¹,
Zeinab Namjoo*²

1. Students Research Committee, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

2. Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

* *Corresponding author.* Tel: +984533534798, Fax: +984533534740, E-mail: z.namjoo@arums.ac.ir

Article info

Article history:

Received: Jul 30, 2025

Accepted: Oct 7, 2025

Keywords:

Cerebellum
Purkinje Neuron
Spinal Cord Injury
Curcumin

ABSTRACT

Background: Curcumin is the main and active compound of turmeric and a yellow phenolic pigment that has antioxidant and anti-inflammatory properties. This study aimed to investigate the effect of curcumin on the morphology of cerebellar Purkinje neurons in rats with spinal cord injury.

Methods: In this experimental study, 9 rats were randomly divided into 3 groups: 1) spinal cord injury (SCI); 2) laminectomy; and 3) spinal cord injury+curcumin (SCI+curcumin). Spinal cord injury was induced by compression at the T10 segment of the spinal cord by placing a 50-gram weight for 5 minutes. In the treatment group, curcumin was administered at a dose of 100 mg/kg daily for 8 weeks by gavage. At the end of the 8th week, the BBB motor test was performed on the rats in all three groups, and after euthanasia, their cerebellum was removed and stained with hematoxylin and eosin. Finally, the tissue organization of the molecular, Purkinje, and granular layers and the tissue damage index were analyzed histologically.

Results: The results of our study showed that the morphology of cerebellar Purkinje cells changes after spinal cord injury, but treatment with curcumin can reduce the destruction of these cells and maintain their typical morphological characteristics.

Conclusion: Based on the present study, curcumin can reduce the destruction of cerebellar Purkinje neurons in rats with spinal cord injury and also lead to motor improvement in these animals.

How to cite this article: Samadi K, Salimnejad R, Jannatdoost M, Ahadi B, Namjoo Z. Morphological Evaluation of Cerebellar Purkinje Neurons in Adult Male Rats with Spinal Cord Injury Following Curcumin Treatment. J Ardabil Univ Med Sci. 2025;25(2):234-246.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.

Extended Abstract

Background: Spinal cord injuries (SCI) represent a significant challenge in the field of neurology and rehabilitation, often resulting in profound and lasting effects on various bodily functions. Among the many complications arising from SCIs, the impact on the cerebellum is particularly noteworthy. When the spinal cord is injured, the communication pathways between the cerebellum and the rest of the central nervous system can be severely disrupted, leading to a cascade of neurological deficits. Oxidative stress is a significant consequence of SCI that can adversely affect various neural structures, including the cerebellum. Following an SCI, there is an increase in reactive oxygen species (ROS) and a decrease in antioxidant defenses, leading to oxidative damage to cells. The cerebellum, which is crucial for motor coordination, balance, and cognitive functions, can be particularly vulnerable to such oxidative stress.

Given the detrimental effects of oxidative stress on cerebellar function following SCI, antioxidants have emerged as a potential therapeutic strategy. Antioxidants can help neutralize ROS, thereby reducing oxidative damage and protecting neuronal integrity. Studies have shown that the administration of antioxidants such as beta-carotene, vitamins A, C, and E, melatonin, selenium, and others can reduce the destructive effects of SCI by controlling the ROS cascade and various enzymes such as superoxide dismutase (SOD), GPx, and catalase. Among these antioxidants, turmeric, scientifically known as curcumin, stands out as the main active compound of the turmeric plant and a polyphenol. Curcumin has been shown to possess a wide range of biological and pharmacological activities, including antioxidant and ROS-scavenging properties, anti-inflammatory, anti-tumor, antimicrobial, and antiviral effects. In several studies, the antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin have been reported against inducers of oxidative stress, including cadmium, acrylamide, acetate, and diabetes. Therefore, curcumin may serve as a strong antioxidant in preventing major abnormalities caused by oxidative stress and the generated free radicals, although the main mechanism is

still not fully understood. This study aimed to investigate the effect of curcumin on the morphology of cerebellar Purkinje neurons in rats with spinal cord injury.

Methods: Nine male Wistar rats, aged 10 weeks and weighing 200-250 grams, were used in the experiment. They were housed under controlled conditions and assessed for motor function using the Basso, Beattie, and Bresnahan (BBB) scale. Only rats with a perfect score of 21 were included in the study. The animals were randomly divided into 3 groups: 1) spinal cord injury (SCI); 2) laminectomy; and 3) spinal cord injury + curcumin (SCI+ curcumin). Under anesthesia, a laminectomy was performed at the T10 segment, followed by a compression injury using a standardized weight of 50 grams for five minutes. Post-surgery, the rats received saline and gentamicin to prevent urinary infections, along with intraperitoneal cefazolin injections for three days. The SCI + curcumin group was treated with a daily gavage of 100 mg/kg curcumin for eight weeks. To confirm the effectiveness of the SCI model, hematoxylin and eosin (HE) staining and BBB motor tests were employed. BBB scores were recorded pre-surgery and at 24, 48, and 72 hours post-surgery, with weekly assessments conducted over eight weeks. The scores ranged from 0 (no movement) to 21 (normal movement). At the end of the 8th week, the BBB motor test was performed on the rats in all three groups, and after euthanasia, their cerebellum was removed and stained with hematoxylin and eosin. The study evaluated various factors such as damaged neurons with pyknotic nuclei and morphological changes in cerebellar tissue across experimental groups. Tissue damage indices were scored on a scale from 0 (healthy) to 3 (severe) based on five regions per sample.

Results: To assess motor activity in the hind limbs of the animals, the BBB test was conducted weekly until the end of week 8 post-injury. The SCI group had a mean score of 0.56 ± 6.33 , indicating the lowest BBB score, while the laminectomy group had the highest BBB score of 0 ± 21 . Treatment with curcumin led to an improvement in the motor activity of the rats, with the score reaching 0.55 ± 2.5 in the curcumin-treated group seven days post-injury, and 0.82 ± 15.67 by the eighth week.

after SCI. The comparison of BBB results at the end of week eight between the rats in the SCI group and those receiving curcumin was statistically significant ($p<0.05$). Figure 1-D summarizes the data related to the BBB test. Histological examinations in the laminectomy group showed normal cerebellar structure, including molecular, Purkinje, and granular layers with normal cells. In this group, Purkinje cells were observed with a pear-shaped appearance and distinct nuclei and nucleoli. SCI caused damage to Purkinje cells, leading to a loss of their normal shape and a darker appearance. Additionally, in this group, the number of cells in the molecular layer decreased, and vacuoles were visible. Accordingly, in this study, it appears that the number of dark cells in the spinal cord injury group is greater than that in the laminectomy

group. Treatment with curcumin (SCI+CR) reduced the extent of damage to Purkinje cells and changes in the molecular layer compared to the SCI group. Furthermore, statistical analyses indicated that spinal cord injury significantly increased the tissue damage index ($p<0.05$). Curcumin treatment resulted in a significant reduction in the tissue damage index compared to the injury group ($p<0.05$).

Conclusion: The results of this study showed that SCI can cause cellular changes in supraspinal areas, including the cerebellum, leading to the destruction of Purkinje cells. On the other hand, it is suggested that curcumin may reduce the destruction of Purkinje neurons in mice with spinal cord injury and also lead to improved motor function in these rats.

بررسی مورفولوژی نورون‌های پورکنژ مخچه در موش‌های صحرایی نر بالغ مدل ضایعه نخاعی متعاقب درمان با کورکومین

کاوه صمدی^۱، رامین سلیم‌نژاد^۲، محمد جنت‌دوست^۱، بهنام احدی^۱، زینب نامجو^{۲*}

۱. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۲. گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۵۳۳۵۳۴۷۹۸ فاکس: ۰۴۵۳۳۵۳۴۷۴۰ پست الکترونیک: z.namjoo@arums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: کورکومین ترکیب اصلی و فعال زردچوبه و رنگدانه فنولیک زردرنگی است که دارای خواص آنتی‌اکسیدانتی و ضدالتهابی می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر کورکومین بر روی مورفولوژی نورون‌های پورکنژ مخچه موش صحرایی با ضایعه نخاعی می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی تعداد ۹ سر موش صحرایی به صورت تصادفی به ۳ گروه تقسیم شدند: (۱) ضایعه نخاعی، (۲) لامینکتومی و (۳) ضایعه نخاعی+کورکومین. آسیب نخاعی به روش Compression در محل سگمان T10 نخاع با قرار دادن وزنه ۵۰ گرمی به مدت ۵ دقیقه ایجاد شد. در گروه درمانی، کورکومین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت روزانه و به مدت ۸ هفته به صورت گاواژ تجویز شد. در پایان هفته ۸ با انجام تست حرکتی BBB از موش‌های صحرایی هر سه گروه مورد مطالعه، بعد از یوتانازی مخچه آن‌ها خارج و با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شد. در نهایت نظم بافتی لایه‌های مولکولار، پورکنژ و گرانولار و ایندکس آسیب بافتی مورد تحلیل بافت شناختی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج مطالعه ما نشان داد مورفولوژی سلول‌های پورکنژ مخچه بعد از ضایعه نخاعی تغییر می‌یابد اما درمان با کورکومین می‌تواند منجر به کاهش تخریب این سلول‌ها و حفظ ویژگی‌های مورفولوژیکی تیپیک آن‌ها گردد.

نتیجه‌گیری: بر اساس مطالعه حاضر کورکومین می‌تواند تخریب نورون‌های پورکنژ مخچه موش‌های صحرایی با ضایعه نخاعی را کاهش دهد و همچنین منجر به بهبود حرکتی در این حیوانات شود.

واژه‌های کلیدی: مخچه، نورون پورکنژ، ضایعه نخاعی، کورکومین

پذیرش: ۱۴۰۴/۷/۱۵

دریافت: ۱۴۰۴/۵/۸

مقدمه

بالتر بوده و یا شدت آن بیشتر باشد، عوارض آن هم وسیع تر است و محدودیت بیشتری همچون پاراپلژی کامل را برای فرد ایجاد می‌کند [۱]. هرچند که تاکنون تلاش‌های درمانی متعددی در سطوح مختلف سلولی، جراحی و توانبخشی صورت گرفته است، اما درصد

ضایعات نخاعی^۱ (SCI) یکی از شدیدترین معلولیت‌ها بوده و با تاثیر بر روی زندگی فرد، او را تا آخر عمر دچار محدودیتی وسیع می‌کند. هرچه محل ضایعه

^۱ Spinal Cord Injury

موفقیت همچنان پایین است. ممکن است بخشی از پایین بودن نتایج مثبت درمانی که اغلب متوجه ناحیه ضایعه می‌باشد ناشی از بروز تغییرات ناشناخته در سطوح بالاتر از ضایعه باشد [۲].

توسعه مدل‌های آزمایشگاهی برای مطالعه ضایعه نخاعی و همچنین ترکیب شدن این مطالعه‌ها با مطالعات بالینی باعث شده که میزان اطلاعات ما در مورد تغییرات به وجود آمده در سطح زیرین ضایعه و مراکز سوپرا اسپینال^۱ افزایش یابد [۳]. مطالعات گوناگون انجام شده بر ضایعه نخاعی نشان دادند که این ضایعه علاوه بر افزایش استرس اکسیداتیو باعث التهاب، نکروز پیشرونده هموراژیک، ادم، دمیلینه شدن و تخریب سلول می‌شود. این تخریب سلولی و سایر تغییرات اغلب سبب تحریک آپوپتوز و اکسیداسیون لیپیدها به واسطه رادیکال‌های آزاد (ROS)^۲ می‌شود، بطوریکه تحقیقات نشان داده‌اند آپوپتوز نورون‌ها به فاصله ۴ تا ۶ ساعت بعد از ضایعه آغاز می‌شود و در عرض ۳ روز به حداکثر رسیده و تا ۳ هفته تداوم می‌یابد. البته وقوع این آپوپتوز بیشتر در ناحیه ضایعه می‌باشد [۴، ۵].

علاوه بر اثراتی که ضایعه نخاعی در محل ضایعه به جا می‌گذارد، در مراکز سوپرا اسپینال مانند مخچه^۳ نیز اثراتی دارد؛ این تغییرات را به طور کلی می‌توان در دو دسته تأثیرات فیزیولوژیک و آناتومیک تقسیم‌بندی نمود. با توجه به ارتباط آناتومیک موجود بین نخاع و مخچه، آسیب وارده به آن بعد از ایجاد ضایعه احتمالاً وسیع می‌باشد. از اینرو مطالعه بر روی این مراکز و تغییرات به وجود آمده متعاقب SCI می‌تواند مفید باشد [۶، ۷].

SCI باعث آسیب به راه‌های عصبی نخاعی مخچه ای^۴ می‌شود. این آسیب بسته به شدت ضایعه می‌تواند متغیر باشد. از آنجا که در طی SCI علاوه بر راه‌های

نزولی^۵ حرکتی، راه‌های صعودی^۶ نیز آسیب می‌بینند، به نظر می‌رسد که با تغییر ورودی‌های نخاعی به مراکز سوپرا اسپینال نیز شاهد تغییراتی در سطح سلولی در این نواحی باشیم. بنابراین بررسی بروز تغییرات در مخچه در سطح سلولی و مولکولی ممکن است بر نتایج درمان‌های جاری تأثیرگذار باشد [۸، ۹]. با توجه به اینکه آکسون نورون‌های پورکنژ تنها خروجی‌های مخچه می‌باشند، ممکن است تغییرات متعاقب SCI بر روی آن‌ها تأثیر چشمگیری داشته باشد و ما در تحقیق حاضر به بررسی این تغییرات و تأثیر مداخله درمانی خود بر آن خواهیم پرداخت.

درمان‌های کنونی که برای ضایعه استفاده می‌شود در دو دسته نوروپروتکتیو^۷ و نورورجنراتیو^۸ تقسیم می‌شود. تمرکز اصلی در درمان‌های نوروپروتکتیو بر جلوگیری از پیشرفت بیشتر آسیب‌های ثانویه می‌باشد، در حالی که درمان‌های نورورجنراتیو بر بهبود و بازسازی مدارهای نورونی آسیب دیده در نخاع تأکید می‌کند. تحقیقات نشان داده است که بسیاری از عواملی که در بوجود آمدن آبشار آسیب ثانویه دخیل هستند، در طول دوره زمانی طولانی پس از آسیب دیدگی ایجاد می‌شود؛ بنابراین استفاده از درمان نوروپروتکتیو در این بازه زمانی می‌تواند بسیار موثر باشد [۱۰، ۱۱].

مطالعات ثابت کرده‌اند که تجویز آنتی‌اکسیدان‌هایی مثل بتاکاروتن، ویتامین‌های A، C یا E، ملاتونین، سلنیوم و مواردی دیگر می‌تواند با کنترل آبشار ROS و آنزیم‌های مختلف مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)^۹، GPx^{۱۰} و کاتالاز، اثرات تخریبی ناشی از SCI را کاهش دهند [۱۲]. از میان این آنتی‌اکسیدان‌ها، می‌توان به زردچوبه با نام علمی

^۵ Descending Tracts

^۶ Ascending Tracts

^۷ Neuroprotective

^۸ Neuroregenerative

^۹ Superoxide Dismutase

^{۱۰} Glutathione Peroxidase

^۱ Supraspinal

^۲ Reactive Oxygen Species

^۳ Cerebellum

^۴ Spino-cerebellar Tract

اکسیدانت در جهت بازگرداندن عملکردهای از دست رفته نیز ارزیابی شد.

روش کار

حیوانات و گروه‌های آزمایشی

در این مطالعه تجربی از ۹ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (۱۰ هفته‌ای با وزن 200-250 گرم) استفاده شد. این حیوانات از مرکز حیوانات آزمایشگاهی پاستور تهیه و در دمای محیطی 24 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی 35 ± 6 درصد و دوره روشنایی تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند.

قبل از آغاز مداخله بر روی حیوانات و قبل از انجام عمل جراحی، موش‌های صحرایی از نظر صحت و سلامت حرکتی مورد ارزیابی قرار گرفتند و فقط مواردی که دارای حرکت کاملاً سالم و نمره ۲۱ بر اساس مقیاس BBB^۲ بودند در پژوهش شرکت داده شدند. در نهایت، موش‌ها به طور تصادفی به ۳ گروه ۱- ضایعه نخاعی (SCI)، ۲- لامینکتومی^۳، و ۳- ضایعه نخاعی + کورکومین (SCI+ curcumin) تقسیم شدند.

ایجاد مدل SCI و تیمار حیوانات

موش‌های صحرایی با استفاده از ۷۰ میلی‌گرم کتامین و ۳ میلی‌گرم زایلازین به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دچار بیهوشی عمیق شدند. قبل از برش پوستی، با لمس و پیدا کردن دنده ۱۲، محل مهره ۱۳ سینه‌ای که هم سطح با آن و کمی پایین تر قرار دارد مشخص شد. سپس برش پوستی صورت گرفت و با استفاده از زوائد خاری، یک مهره بالاتر، یعنی در حد T۱۲، فاسیای سطحی و عمقی بریده و عضلات مجاور زوائد خاری مهره کنار زده شد. پس از لامینکتومی، نخاع در محل سگمان T۱۰ با قرار دادن وزنه‌ای با سطح مقطع و وزن ثابت ۵۰ گرمی به مدت ۵ دقیقه فشرده شده و ضایعه نخاعی به شکل Compression اعمال گردید. مراقبت‌های پس از جراحی شامل تزریق سالیین و

کورکومین^۱ اشاره کرد که ترکیب اصلی و فعال گیاه زردچوبه و یک پلی فنول است. مشخص شده است کورکومین دارای طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی و فارماکولوژیک مثل خواص آنتی‌اکسیدانتی و جاروب‌کننده ROS، ضدالتهابی، ضدتوموری، ضد میکروبی و ضدویروسی می‌باشد [۱۳]. در چندین مطالعه، خاصیت آنتی‌اکسیدانتی و ضدالتهابی کورکومین در برابر القاکننده‌های استرس اکسیداتیو از جمله کادمیوم، اکریل آمید، استات، و دیابت گزارش شده است. بنابراین کورکومین ممکن است به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی در جلوگیری از ناهنجاری‌های عمده ناشی از استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد تولید شده مفید و موثر واقع گردد، هر چند مکانسیم اصلی هنوز مشخص نیست [۱۴].

طبق نتایجی که از مطالعات تجویز کورکومین در کنترل استرس اکسیداتیو در شرایط پاتولوژیکی مختلف از جمله دیابت، لنفوم و اسپرماتوژنز حاصل شده است، ثابت شده که کورکومین قادر به فعال کردن مسیر Nrf2-ARE می‌باشد. Nrf2 فاکتور رونویسی تنظیم کننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان متعددی است که با اتصال مستقیم به جایگاه واکنشی پروموتور آنتی‌اکسیدانت‌ها (ARE) رونویسی آن‌ها را افزایش می‌دهد؛ اما در مورد چگونگی تاثیر بر التهاب، کورکومین با مهار فاکتور پیش‌التهابی NF-kB و کاهش بیان COX-2 و iNOS، مانع از بیان فاکتورهای التهابی دیگر و بروز یا تشدید التهاب می‌شود [۱۴، ۱۵]. در این تحقیق، با توجه به افزایش استرس اکسیداتیو و التهاب بعد از SCI و تاثیر متعاقب آن‌ها در بافت‌های سوپرا اسپینال، ما بر آن شدیم تا تاثیر کورکومین را بر هیستوپاتولوژی مخچه و پارامترهای مورفولوژی سلول‌های پورکنز در مدل ضایعه نخاعی در موش صحرایی نر بالغ بررسی کنیم. در ضمن، تاثیر این آنتی

^۱ Curcumin (Diferuloylmethane)

^۲ Basso, Beattie and Bresnahan (BBB)

^۳ Laminectomy

نمونه ۵ ناحیه مورد بررسی قرار گرفته و بسته به میزان تغییرات بر اساس مقیاس ۰ = سالم، ۱ = خفیف، ۲ = متوسط و ۳ = شدید نمره دهی شده و در نهایت داده‌ها بصورت نیمه کمی آنالیز شد [۷].

محاسبات آماری

برای آنالیز آماری داده‌های تست حرکتی از نرم افزار SPSS-16 استفاده شد. داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ گزارش شده اند. مقایسه BBB بین گروه‌ها با روش آنالیز واریانس دوطرفه^۱ و تست تعقیبی توکی^۲ با همان سطح معنی‌داری $p < 0.05$ انجام شد.

یافته‌ها

تایید مدل ضایعه نخاعی

رنگ آمیزی بافتی هوماتوکسیلین و ائوزین جهت ارزیابی گستره آسیب و ترمیم بافتی در ناحیه آسیب دیده نخاع انجام گردید. در این رنگ آمیزی حفراتی با اندازه‌های مختلف در محل ضایعه در هر دو گروه SCI و Curcumin + SCI قابل رویت بود (شکل ۱- B و C). این حفرات در ناحیه آسیب دیده و در هر دو ماده خاکستری و سفید قابل مشاهده بودند، اما وسعت ضایعه در گروه SCI بسیار بزرگتر بود. همانطور که در شکل B-۱ نشان داده شده است، بررسی بافت شناسی در گروه SCI از عدم تشکیل بافت عصبی قابل تشخیص در محل ضایعه حکایت داشت، در حالیکه اندازه حفره محل ضایعه در گروه Curcumin + SCI بصورت مشهودی کاهش یافته بود (شکل ۱- C) که می‌تواند به دلیل ترمیم سلول‌های عصبی و یا مهاجرت سلول‌های القا کننده ترمیم بافت عصبی به این ناحیه باشد.

آنتی بیوتیک جنتامایسین جهت جلوگیری از عفونت ادراری صورت گرفت. همچنین به منظور کنترل عفونت‌های مختلف تا ۳ روز بعد از جراحی هر ۸ ساعت ۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم سفازولین به صورت داخل صفاقی تزریق گردید [۱۶]. موش‌های صحرایی گروه SCI+ curcumin روزانه به مدت ۸ هفته ۱۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم کورکومین را به صورت گاواژ دریافت کردند [۱۷].

برای تایید مدل SCI از رنگ آمیزی هوماتوکسیلین و ائوزین و همچنین تست حرکتی BBB استفاده شد [۱۶]. آزمون BBB قبل از جراحی، ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت پس از جراحی صورت گرفت و در صورت هر گونه ایراد، حیوان از مطالعه خارج شد. در این تست نمرات صفر و ۲۱ به ترتیب به معنای عدم مشاهده حرکت و مشاهده حرکت نرمال در حیوانات می‌باشد. از تمام حیوانات گروه‌های مورد مطالعه به صورت هفتگی به مدت ۸ هفته تست حرکتی به عمل آمد و امتیازهای آن جهت تحلیل نهایی ثبت شد.

رنگ آمیزی هوماتوکسیلین و ائوزین

برای بررسی تغییرات مورفولوژی بافت مخچه و نخاع از رنگ آمیزی هوماتوکسیلین و ائوزین و میکروسکوپ نوری استفاده گردید. در این رنگ آمیزی، هسته سلول‌ها آبی تا بنفش شده و سیتوپلاسم قرمز روشن می‌شود. لایه مولکولار ماده خاکستری مخچه به صورت لایه ای با تراکم سلولی زیاد و تیره تر و لایه گرانولار به صورت لایه ای با تراکم کمتر سلولی قابل مشاهده هستند. سلول‌های پورکنز بزرگ و گلابی شکل با هسته کروی مرکزی و انشعابات مشخص در بین لایه‌های مولکولار و گرانولار قرار می‌گیرند. فاکتورهای مختلف از جمله سلول‌های عصبی آسیب دیده با هسته‌های پیکنوتیک و رنگ تیره تر، اندازه بدنه سلول‌های پورکنز و تغییرات مورفولوژیکی بافت مخچه در گروه‌های مختلف آزمایشی ارزیابی شد. جهت بررسی ایندکس آسیب بافتی (شامل میزان تخریب سلول‌های پورکنز و واکولیزاسیون) در هر

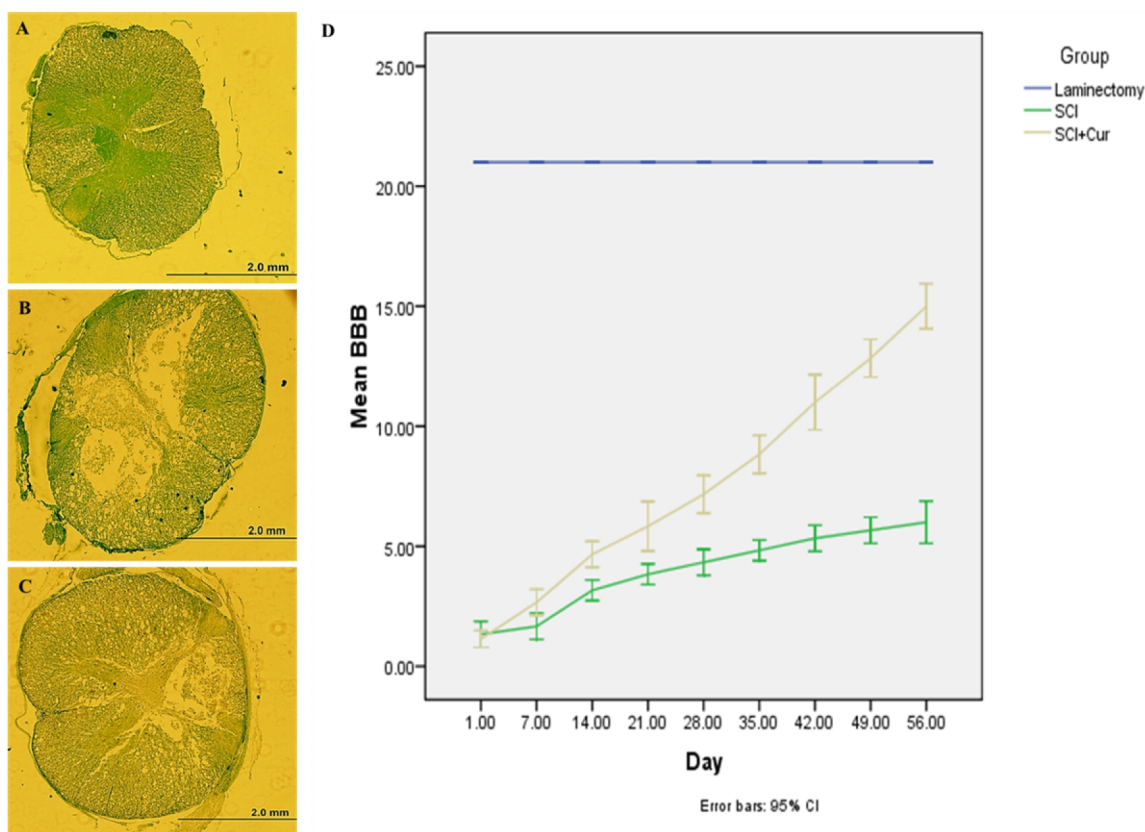
¹ Two Way ANOVA

² Post-hoc Tukey

ارزیابی بهبود حرکتی

جهت ارزیابی فعالیت حرکتی در اندام خلفی حیوان از تست BBB بصورت هفتگی تا پایان هفته ۸ بعد از ضایعه استفاده شد. گروه SCI با میانگین $6/33 \pm 0/56$ نشان دهنده پایین ترین نمره BBB بود و گروه لامینکتومی با امتیاز 21 ± 0 بالاترین نمره BBB را داشت. درمان با کورکومین سبب بهبود فعالیت حرکتی موش‌های صحرایی گردید، به طوری که این

عدد ۷ روز پس از ضایعه در گروه دریافت کننده کورکومین به $2/5 \pm 0/55$ و در هفته هشتم بعد از SCI به $15/67 \pm 0/82$ رسید. مقایسه نتایج BBB در پایان هفته هشتم بین موش‌های صحرایی گروه SCI و گروه دریافت کننده کورکومین معنی‌دار بود ($p < 0/05$). شکل D-۱ خلاصه‌های داده‌های مربوط به تست BBB را نشان می‌دهد.



شکل ۱. تصویر میکروسکوپی از نخاع در محل ایجاد آسیب نخاعی در گروه‌های مختلف (بزرگنمایی تصاویر: $40\times$ ؛ رنگ آمیزی: هماتوکسیلین و ائوزین) و تست حرکتی BBB جهت ارزیابی آسیب و ترمیم بافتی در نخاع آسیب دیده. حفراتی با اندازه‌های مختلف در محل ضایعه در هر دو گروه SCI (B) و Curcumin + SCI (C) قابل رویت است، اما به نظر می‌رسد اندازه حفره محل ضایعه در گروه Curcumin + SCI به صورت مشهودی کاهش یافته است (C). مقایسه نتایج BBB در پایان هفته هشتم (D) بین موش‌های صحرایی گروه SCI و گروه دریافت کننده کورکومین معنی دار بود ($p < 0.05$).

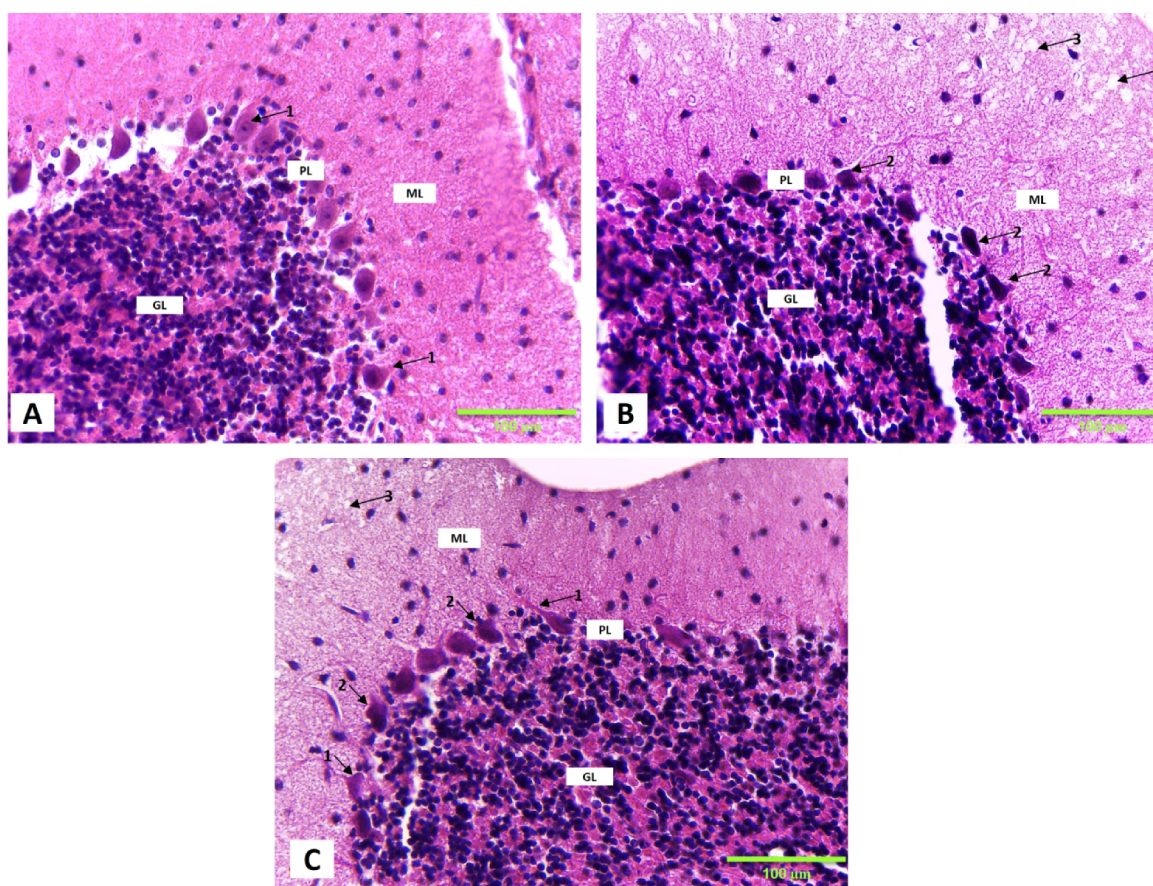
ارزیابی‌های بافت شناسی

رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین برای ارزیابی ریخت‌شناسی سلول‌های پورکنژ مورد استفاده قرار گرفت. با این رنگ آمیزی دو نوع مختلف از سلول‌های پورکنژ مشاهده شد که شامل سلول‌های تیره و روشن بودند. سلول‌های پورکنژ نرمال روشن بوده و

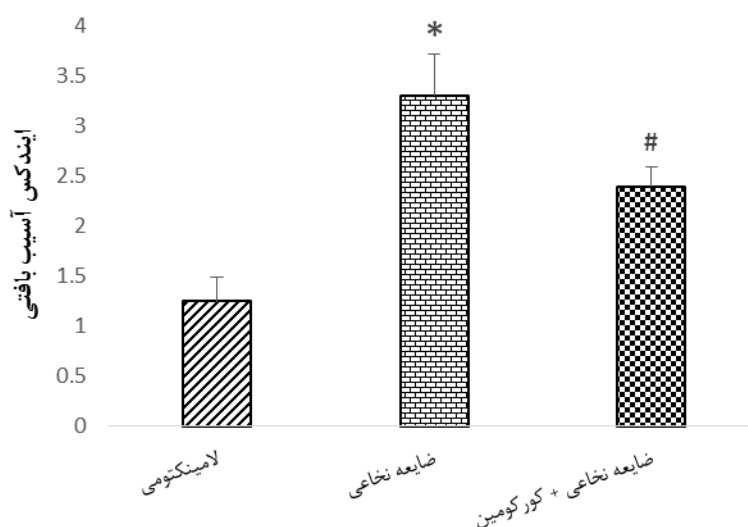
دارای هسته، هستک و سیتوپلاسم روشن و واضح می‌باشند. سلول‌های پورکنژ تیره نشان دهنده تغییرات سلولی و مورفولوژیکی متعاقب انواع خاصی از آسیب به نورون‌ها هستند. بررسی‌های بافت شناسی در گروه لامینکتومی، ساختمان طبیعی مخچه شامل لایه‌های مولکولار، پورکنژ و گرانولار با سلول‌های

است. بر همین اساس، در این مطالعه، به نظر می‌رسد تعداد سلول‌های تیره در گروه ضایعه نخاعی نسبت به گروه لامینکتومی بیشتر است. درمان با کورکومین (SCI+CR) از میزان آسیب سلول‌های پورکنز و تغییرات لایه مولکولار نسبت به گروه SCI کاسته است (شکل ۲-۲). از طرفی بررسی‌های آماری (شکل ۳) نیز نشان داد که ضایعه نخاعی به‌طور معناداری باعث افزایش ایندکس آسیب بافتی می‌شود ($p < 0.05$). درمان با کورکومین نسبت به گروه آسیب سبب کاهش معنادار ایندکس آسیب بافتی گردید ($p < 0.05$).

طبیعی را نشان داد. در این گروه سلول‌های پورکنز با شکل گلابی و هسته و هستک مشخص دیده می‌شود. آسیب طناب نخاعی باعث آسیب سلول‌های پورکنز شده، بطوری که این سلول‌ها شکل طبیعی خود را از دست داده و تیره دیده می‌شوند. همانطور که در شکل ۲ مشخص است، محو شدن هسته (مشخص نبودن محدوده هسته از سیتوپلاسم)، اسیدوفیلی سیتوپلاسم و از بین رفتن غشای سلولی در گروه SCI نسبت به گروه لامینکتومی دیده می‌شود (شکل ۲-۲). همچنین در این گروه تعداد سلول‌های لایه مولکولار کاهش یافته و واکوئل‌هایی قابل مشاهده



شکل ۲. تصویر میکروسکوپیک مخچه در گروه‌های مورد مطالعه (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوژین $\times 400$). در گروه لامینکتومی (A) ساختمان طبیعی مخچه شامل لایه‌های مولکولار (ML)، پورکنز (PL) و گرانولار (GL) به همراه سلول‌های طبیعی پورکنز (۱) با دندریت راسی دیده می‌شود. در گروه آسیب طناب نخاعی (B)، تخریب سلول‌های پورکنز (۲) و واکوئل شدن لایه مولکولار (۳) در نواحی مختلف قابل مشاهده است. درمان با کورکومین از میزان آسیب لایه‌های مختلف کاسته است (C).



شکل ۳. نمودار بررسی ایندکس آسیب بافتی در گروه‌های مورد مطالعه. بررسی‌ها نشان داد که میزان آسیب بافتی در گروه ضایعه نخاعی به‌طور معناداری نسبت به گروه لامینکتومی افزایش داشته است ($p < 0.05$). درمان با کور کومین به‌طور معناداری باعث کاهش ایندکس آسیب بافتی نسبت به گروه ضایعه نخاعی شد ($p < 0.05$).

بحث

تمرکز اصلی اکثر مطالعاتی که در مورد ضایعه نخاعی هستند بر روی تغییرات حسی، حرکتی و بافتی در سطح و یا زیر محل ضایعه است و در این میان تحقیقات اندکی بر روی تغییرات احتمالی نواحی بالاتر از سطح آسیب انجام شده است. مخچه، که در لاتین به معنای مخ کوچک است، ساختار اصلی مغز خلفی بوده و مسئول هماهنگی حرکات ارادی و برخی از عملکردها مانند مهارت‌های حرکتی، تعادل، هماهنگی و وضعیت بدن می‌باشد. مخچه دارای دو ورودی اصلی از نخاع است: راه‌های مخچه ای نخاعی قدامی و خلفی [۱۸، ۱۹]. بنابراین این احتمال وجود دارد که پس از ضایعه نخاعی در مخچه نیز تغییراتی ایجاد شود [۲۰]. بر اساس مکانیسم آسیب به نخاع، انواع مدل‌های آسیب نخاعی شامل کوفتگی، فشردگی، جابجاشدن یا دررفتگی، قطع کامل، قطع ناکامل می‌شود. در مدلی از ایجاد ضایعه نخاعی که به آن فشردگی^۱ می‌گویند، مشخصه آن فشار بر روی نخاع در یک بازه زمانی خاص می‌باشد. در حقیقت این مدل ضایعه ترکیبی از فشردگی و کوفتگی می‌باشد که شامل اثر حاد بوسیله

فشرده سازی نخاع در یک بازه زمانی خاص است. این مدل آسیب به نخاع دقیقاً متناظر در رفتگی، شکستگی و جابجایی مهره در محیط جوامع و در تصادفات می‌باشد [۲۱]. در تحقیق حاضر نیز از وزنه‌ای با سطح مقطع و وزن ثابت ۵۰ گرم در جهت ایجاد ضایعه نخاعی در سطح سگمان ۱۰ نخاع سینه‌ای به مدت ۵ دقیقه استفاده شد.

ویرتگی و همکاران نشان دادند که میزان ماده خاکستری در منطقه قشر حرکتی اولیه در بیمارانی که در ناحیه توراسیک دارای ضایعه بودند به میزان قابل توجهی کاهش یافته است. همچنین در بررسی از طریق MRI مشاهده شد که ضایعه نخاعی می‌تواند باعث کاهش پیش رونده در میزان ماده خاکستری شود که این کاهش نه تنها در کورتکس حسی- حرکتی بلکه در سایر نواحی مغز که ارتباط مستقیمی با سطح آسیب دیده ندارند نیز دیده می‌شود. برای مثال قشر مدیال پره فرونتال و قشر سینگولیت قدامی که نقش مستقیمی در پردازش اطلاعات عاطفی ایفا می‌کنند [۲۲، ۲۳]. از طرف دیگر، مطالعات نشان داده اند که ۱۲-۱۰ هفته پس از ضایعه نخاعی، میزان زیادی از سلول‌های عصبی در نواحی مانند کورتکس Dentate

¹ Compression

gyrus، تالاموس و همچنین هیپوکامپ از بین می‌روند که البته این تغییرات در کاهش نورون‌ها در مدت طولانی پس از ایجاد ضایعه (تقریباً یکسال) قابل مشاهده می‌باشد [۲۴].

حسن زاده و همکاران با القای مدل SCI در موش‌های صحرایی نر و ارزیابی سلولی و مولکولی توسط تکنیک‌های تانل، ایمونوهیستوشیمی، وسترن بلات و رنگ آمیزی نیسل نشان دادند که ضایعه نخاعی نه تنها تاثیرات مخربی در سطح ضایعه در نخاع برجای می‌گذارد بلکه منجر به تغییرات نورونی خاص در مناطق سوپرااسپینال از جمله تغییر در بقا و مورفولوژی سلول‌های پورکنز در مخچه می‌شود [۷]. در مطالعه ما نیز ارزیابی هیستوپاتولوژی مخچه با رنگ آمیزی H&E در موش‌های صحرایی مدل ضایعه نخاعی نشان داد که علیرغم وجود تخریب در ماده‌های خاکستری و سفید نخاع به دنبال SCI، بافت مخچه نیز دچار تغییرات ساختاری شده و به نظر می‌رسد تعداد سلول‌های پورکنز نیز کاهش یافته باشد (شکل 2B).

از میان مطالعات پیرامون ارزیابی تاثیر کورکومین در مدل SCI، می‌توان به تحقیقی که توسط جوکسی و همکاران انجام شده است اشاره کرد؛ نتایج تجویز داخل صفاقی ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم کورکومین به مدت ۷ روز در موش صحرایی مدل SCI نشان داد که کورکومین با افزایش سطح آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و کاهش بیان سیتوکین‌های التهابی و فاکتورهای استرس اکسیداتیو به میزان قابل توجهی نسبت به گروه کنترل و حتی گروهی که ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم متیل پردنیزولون دریافت می‌کند سبب حفاظت از بافت نخاعی در برابر استرس اکسیداتیو می‌شود [۲۵].

در این تحقیق بررسی مورفولوژیک سلول‌های پورکنز با رنگ آمیزی H&E در گروه‌های SCI و SCI دریافت کننده کورکومین، دو نوع مختلف از سلول‌ها را نشان داد که شامل سلول‌های تیره و روشن

می‌باشند. سلول‌های پورکنز روشن دارای هسته، هستک و سیتوپلاسم روشن و واضح هستند. این سلول‌ها به عنوان سلول‌های نرمال در نظر گرفته می‌شوند. سلول‌های پورکنز تیره به طور کلاسیک نشان دهنده تغییرات سلولی و مورفولوژیکی متعاقب انواع خاصی از آسیب، از جمله قرار گرفتن در معرض سموم، تروما و هر نوع محرومیت ورودی به نورون‌ها است. در این مطالعه، افزایش تعداد سلول‌های تیره در گروه ضایعه نخاعی نسبت به گروه‌های دیگر مشاهده شد ($p < 0.001$) که این از بین رفتن نورون‌ها متعاقب ضایعه نخاعی در مطالعات دیگر نیز مشاهده شده است. البته این مطالعات به طور مستقیم در بافت مخچه نبوده و سایر قسمت‌های سیستم عصبی مرکزی را ارزیابی می‌کنند. برای مثال یانگ و همکاران در تحقیقی تعداد سلول‌های تیره را در سه منطقه نخاع، قشر سوپراونتریکلار و منطقه CA1 از هیپوکامپ قبل و بعد از ضایعه نخاعی در موش‌های صحرایی مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند بعد از ایجاد ضایعه تعداد سلول‌های تیره در این مناطق افزایش چشمگیری داشته است که این امر بعد از درمان با متیل پردنیزولون دچار تغییر شده و میزان این سلول‌ها کاهش یافته و در عوض تعداد نورون‌های طبیعی افزایش معناداری داشته است [۲۶]. در تحقیق ما نیز تعداد سلول‌های تیره در گروهی که کورکومین دریافت کرده‌اند کاهش داشته است. نتایج در مورد سلول‌های پورکنز روشن کاملاً بر عکس بودند به طوریکه میزان سلول‌های روشن در گروه ضایعه نخاعی نسبت به سایر گروه‌ها کاهش یافته بود و بعد از استفاده از کورکومین افزایش پیدا کردند و با گروه ضایعه نخاعی تفاوت داشتند.

در این پژوهش، تاثیر کورکومین بر روی پارامترهای مورفولوژیک سلول‌های پورکنز مخچه در مدل ضایعه نخاعی بررسی شد و نتایج نشان داد که احتمال بهبود شاخص‌های کیفی سلول‌های پورکنز در مدل SCI به

واسطه تیمار با کورکومین وجود دارد که می‌تواند در جهت درمان و یا کاهش آسیب‌های ثانویه متعاقب ضایعات نخاعی در نظر گرفته شود.

محدودیت‌های مطالعه

در این مطالعه محدودیت‌هایی از جمله عدم دسترسی به رنگ آمیزی اختصاصی بافت عصبی مثل نیترات نقره و کیت تانل برای ارزیابی آپوپتوز سلولی وجود داشت که قطعا در صورت وجود می‌توانند نتایج علمی بسیار معتبرتری در این حیطه را فراهم سازند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که آسیب طناب نخاعی می‌تواند سبب ایجاد تغییرات سلولی در مناطق سوپراسپینال از جمله مخچه شده و سبب تخریب سلول‌های پورکنز گردد. از طرفی احتمال داده

می‌شود که کورکومین می‌تواند تخریب نورون‌های پورکنز مخچه موش‌های با ضایعه نخاعی را کاهش دهد و همچنین منجر به بهبود حرکتی در این موش‌های صحرایی شود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی ندارند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با کد اخلاق IR.ARUMS.AEC.1400.002 توسط کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل تصویب شده است و نویسندگان از حمایت مالی کمیته تحقیقات دانشجویی کمال تشکر را دارند.

References

- 1- Academy of Spinal Cord Injury Professionals 2022 ASCIP Hybrid Educational Conference & Expo September 7–10 Kansas City, MO, POSTER ABSTRACTS P1–P25: J Spinal Cord Med. 2022 29;45(5):789-803.
- 2- Hamidabadi HG, Simorgh S, Kamrava SK, Namjoo Z, Bagher Z, Bojnordi MN, et al. Promoting motor functions in a spinal cord injury model of rats using transplantation of differentiated human olfactory stem cells: A step towards future therapy. Behav Brain Res. 2021;405:113205.
- 3- Sun L, Peng C, Joosten E, Cheung CW, Tan F, Jiang W, et al. Spinal cord stimulation and treatment of peripheral or central neuropathic pain: mechanisms and clinical application. Neural Plast. 2021;2021:5607898.
- 4- Basnak'ian AG, Baskov AV, Sokolov NN, Borshchenko IA. Apoptosis during spinal cord trauma: prospects for pharmacological correction]. Vopr Med Khim. 2000;46(5):431-43.
- 5- Yang R, Pan J, Wang Y, Xia P, Tai M, Jiang Z, et al. Application and prospects of somatic cell reprogramming technology for spinal cord injury treatment. Front Cell Neurosci. 2022;16:1005399.
- 6- Winchester P, McColl R, Querry R, Foreman N, Mosby J, Tansey K, et al. Changes in supraspinal activation patterns following robotic locomotor therapy in motor-incomplete spinal cord injury. Neurorehabil Neural Repair. 2005;19(4):313-24.
- 7- Hassanzadeh S, Jameie SB, Mehdizadeh M, Soleimani M, Namjoo Z, Soleimani M. FNDC5 expression in Purkinje neurons of adult male rats with acute spinal cord injury following treatment with methylprednisolone. Neuropeptides. 2018;70:16-25.
- 8- Seth A, Chung YG, Kim D, Ramachandran A, Cristofaro V, Gomez P, et al. The impact of discrete modes of spinal cord injury on bladder muscle contractility. BMC Urol. 2013;13:24.
- 9- Bruehlmeier M, Dietz V, Leenders KL, Roelcke U, Missimer J, Curt A. How does the human brain deal with a spinal cord injury? Eur J Neurosci. 1998;10(12):3918-22.
- 10- Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, Vaccaro AR. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. Spine J. 2004;4(4):451-64.
- 11- Hamid S, Hayek R. Role of electrical stimulation for rehabilitation and regeneration after spinal cord injury: an overview. Eur Spine J. 2008;17(9):1256-69.

- 12- Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev.* 2012;70(5):257-65.
- 13- Alizadeh F, Javadi M, Karami AA, Gholaminejad F, Kavianpour M, Haghighian HK. Curcumin nanomicelle improves semen parameters, oxidative stress, inflammatory biomarkers, and reproductive hormones in infertile men: A randomized clinical trial. *Phytother Res.* 2018;32(3):514-21.
- 14- Yang SH, He JB, Yu LH, Li L, Long M, Liu MD, et al. Protective role of curcumin in cadmium-induced testicular injury in mice by attenuating oxidative stress via Nrf2/ARE pathway. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2019;26(33):34575-83.
- 15- Aktas C, Kanter M, Erboga M, Ozturk S. Anti-apoptotic effects of curcumin on cadmium-induced apoptosis in rat testes. *Toxicol Ind Health.* 2012;28(2):122-30.
- 16- Namjoo Z, Moradi F, Aryanpour R, Piryaee A, Joghataei MT, Abbasi Y, et al. Combined effects of rat Schwann cells and 17 β -estradiol in a spinal cord injury model. *Metab Brain Dis.* 2018;33(4):1229-42.
- 17- Zhang Q, Yang H, An J, Zhang R, Chen B, Hao D-J. Therapeutic effects of traditional chinese medicine on spinal cord injury: a promising supplementary treatment in future. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016;2016:8958721.
- 18- Schmammann JD. The cerebellum and cognition. *Neurosci. Lett.* 2019;688:62-75.
- 19- Priori A, Ciocca M, Parazzini M, Vergari M, Ferrucci R. Transcranial cerebellar direct current stimulation and transcutaneous spinal cord direct current stimulation as innovative tools for neuroscientists. *Physiol. J.* 2014;592(16):3345-69.
- 20- Young W, Bracken MB. The second national acute spinal cord injury study. *J Neurotrauma.* 1992;9: 397-405.
- 21- Harif-Alhoseini M, Khormali M, Rezaei M, Safdarian M, Hajighadery A, Khalatbari MM, et al. Animal models of spinal cord injury: a systematic review. *Spinal cord.* 2017;55(8):714-21.
- 22- Wrigley PJ, Gustin SM, Macey PM, Nash PG, Gandevia SC, Macefield VG, et al. Anatomical changes in human motor cortex and motor pathways following complete thoracic spinal cord injury. *Cereb. Cortex.* 2009;19(1):224-32.
- 23- Freund P, Rothwell J, Craggs M, Thompson AJ, Bestmann S. Corticomotor representation to a human forearm muscle changes following cervical spinal cord injury. *Eur J Neurosci.* 2011;34(11):1839-46.
- 24- Piao CS, Stoica BA, Wu J, Sabirzhanov B, Zhao Z, Cabatbat R, et al. Late exercise reduces neuroinflammation and cognitive dysfunction after traumatic brain injury. *Neurobiol Dis.* 2013;54:252-63.
- 25- Gokce EC, Kahveci R, Gokce A, Sargon MF, Kisa U, Aksoy N, et al. Curcumin attenuates inflammation, oxidative stress, and ultrastructural damage induced by spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2016;25(5):1196-207.
- 26- Chang C-M, Lee M-H, Wang T-C, Weng H-H, Chung C-Y, Yang J-T. Brain protection by methylprednisolone in rats with spinal cord injury. *Neuroreport.* 2009;20(10):968-72.