زیست‌شناسی جانوری، سال سیزدهم، شماره سوم، بهار ۱۴۰۰، صفحات ۱۳- ۱

مقاله پژوهشی

بررسی اثر کورکومین بر محافظت عصبی در مدل سلولی بیماری پارکینسون القاء شده با سم ٦- هیدروکسی دوپامین

مهدیه آذرشب[۱]، رامین حاجی‌خانی[۱*]، مهدی رهنما[۲]، محمدرضا بیگدلی[۳]، جلال صولتی[٤]

۱- گروه زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه زیست شناسی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

۳- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

٤- گروه زیست شناسی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

*مسئول مکاتبات: ramin_hajikhani@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۰۵

چکیده

بیماری پارکینسون یکی از شایع‌ترین انواع بیماری های نورودژنراتیو است که با اختلالات حرکتی مانند کندی حرکت، فقدان حرکت، سختی عضلانی و لرزش در حال استراحت و کاهش قدرت صدا مشخص می‌شود. علت اصلی بیماری، تخریب نورون-های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه در مغز میانی و کاهش غلظت دوپامین در پایانه‌های جسم مخطط است. این مطالعه، به منظور بررسی اثر کورکومین بر مدل سلولی بیماری پارکینسون القاء شده با سم ٦-هیدروکسی دوپامین با هدف کاهش التهاب سلولی انجام شد. محیط کشت مورد استفاده در این مطالعه FBS+DMEM ۱۰ درصد برای مطالعه سلول‌های کاتکول آمینرژیک می‌باشد. برای ایجاد مدل سلولی پارکینسون از سم ٦- هیدروکسی دوپامین استفاده شد. از دوزهای۲۰، ۲۵ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کورکومین به عنوان دارو و برای شمارش سلول‌های زنده از دو روش رنگ آمیزیMTT و BT استفاده شد. نتایج مطالعه حاضر، نشان دادکه مصرف کورکومین می‌تواند منجربه افزایش توان آنتی اکسیدانتی وحافظت سلول از آسیب‌های ناشی از بنیان‌های فعال اکسیژن گردد. درمان باکورکومین به جهت خاصیت ضدالتهابی، با توجه به نتایج آزمون MTT و BT نیز نشان داد که حفاظت سلولی افزایش، مرگ سلول‌های کاتکول آمینرژیک توسط سم ٦ – هیدروکسی دوپامین به صورت معناداری کاهش یافته است. که نشان دهنده اثرات آنتی اکسیدانتی و ضدالتهابی کورکومین، در برابر آسیب‌های ناشی از بیماری پارکینسون و کاهش پیشرفت علایم بیماری می‌باشد.

کلمات کلیدی: سلول کاتکول آمینرژیک، ٦- هیدروکسی دوپامین، پارکینسون، کورکومین.

مقدمه

بیماری پارکینسون (PD) یک اختلال مزمن پیشرونده و تخریب کننده‌ی عصبی است که به عنوان دومین بیماری تخریب کننده‌ی عصبی رایج در بین افراد، پس از بیماری آلزایمر می‌باشد. میزان شیوع این بیماری در افراد بالای ۵۰ سال حدوداً دو درصد گزارش شده است (۱۷، ۳۵). پارکینسون ثانویه در اثر مسمومیت با

منگنز، مومیت با مونوکسید کربن، ضربه‌ی مزمن و مداوم به سر و برخی مواد مخدر تزریقی ممکن است ایجاد گردد که علائمی مشابه با پارکینسون را دارد. در سال ۱۸۱۷ دانشمند بریتانیایی دکتر جیمز پارکینسون اولین گزارشات مربوط به بیماری پارکینسون را ارائه داد (۳۱). بیماری پارکینسون همراه با اختلالات حرکتی می باشد که می توان به سفتی عضلانی، لرزش در حال استراحت، آکینزی (مشکل در شروع حرکات)، برادیکینزی (آهسته بودن حرکات)، مشکل در شروع حرکات، ضعف در حفظ تعادل بدن و تغییر حالت چهره به هنگام صحت کردن اشاره کرد (۳۱). در اثر این بیماری ۵۰ تا ۷۰ درصد نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه متراکم جسم سیاه تخریب می شود (۹). علاوه بر نورون‌های دوپامینرژیک، سایر جمعیت‌های نورونی نیز که شامل بخش هایی از لوکوس سرلئوس، هسته‌های رافه‌ای و هسته حرکتی پشتی واگ (کولینرژیک)، قشرسینگولیت Cingulate و پیاز بویایی هم تخریب می‌شوند (۳۰,۱۹). این بیماری ناشی از یک عدم تعادل بین تحریک و مهار در هسته های قاعده ای است که با افزایش استیل کولین نسبت به دوپامین و مهار دوپامینی پوتامن می‌باشد (۲۱).

٦-هیدروکسی دوپامین یک آنالوگ هیدروکسیله شده از انتقال دهندهٔ عصبی دوپامین است. این ترکیب توسط Senob در سال ۱۹۵۹ ایزوله شد. آثار بیولوژیکی آن اولین بار توسط Porter و همکارانش بررسی شد. آنها نشان دادند که ٦-هیدروکسی دوپامین قادر به القاء کاهش نورآدرنالین در سیستم عصبی خودمختار و قلب است. نورون‌های دوپامینرژیک حاوی سطوح معنی داری از دوپامین، هیدروژن پراکسید و آهن آزاد می‌باشد که یک واکنش غیر آنزیمی بین این عناصر ممکن است منجر به شکل‌گیری ٦-هیدروکسی دوپامین گردد. ٦-هیدروکسی دوپامین آسیب به نورون‌های دوپامینرژیک جسم مخططی- جسم سیاه را از طریق تولید هیدروژن پراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل القاء می کند (٦، ۳۳).

یک ترکیب زرد رنگ براقی با نام علمی Curcuma Longa ازخانواده زنجبیل است که برخی گیاهان تولید می کنند. کورکومین محصول اصلی گیاه زرد چوبه بوده و امروزه منبع اصلی استخراج کورکومین زرد چوبه می باشد. کورکومین بخش اصلی کورکومینویید های زرد چوبه است که جزو فنول های طبیعی حساب شده و رنگ زرد آن را بوجود می‌آورد (۱). در سال ۱۸۱۵ برای اولین بار کورکومین از زردچوبه جداسازی و خالص شد ودر سال ۱۹۱۰ ساختار آن به صورت دی فرولوئیل متان معرفی و بیان شد که کورکومین از اتصال دو گروه کروموفور آریل بوتن-۲- اُن (فرولوئیل) به یک گروه متیلن تشکیل شده است. کورکومین یک ماده فلورسانس لیپوفیل است که دارای گروه های فنولیک و پیوندهای کونژوگه می باشد(۲۲,۲۸).

کورکومین دامنه وسیعی از فعالیت‌های فارماکولوژیک شامل آنتی اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدمیکروبی و خواص ضدسرطانی را از خود نشان می دهد (۲۵). از جمله دیگر فعالیت هایی که برای کورکومین ذکر می شود می توان به کاهندگی چربی خون، محافظت کبدی، مهار لیپواکسیژناز ، مهار سیکلواکسیژناز، مهار پروتئازها جاروب کنندگی رادیکال‌های آزاد، مهار پراکسیداسیون چربی، کاهش کلسترول، کاهش تجمع پلاکتی، کاهش تکثیر سلول های سرطانی، بهبود هضم غذا از طریق افزایش جریان صفرا ، تعدیل سایتوکاین ها و دیگر عوامل التهابی اشاره نمود(۲۰.۳).

مطالعات محققان نشان می دهد که کورکومین می تواند باعث مهار آنزیم‌های سیکلواکسیژناز۲، لیپواکسیژناز و نیتیرک اکساید سینتاز شود. این

خصوصیت باعث می شود که کورکومین بتواند مانع تولید فاکتورهای التهابی مانند سیتوکین‌ها گردد (۱۶). اثرات ضدالتهابی کورکومین در بسیاری از مطالعات به اثبات رسیده است. از آنجایی که استرس اکسیداتیو منجر به بیماری های التهابی مزمن می شود، لذا ترکیبات آنتی اکسیدان می تواند در پیشگیری و درمان اختلالات التهابی سودمند باشد. کورکومین فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی از خود بروز می‌دهد (۲۶).

اول، کورکومین فعال شدن فاکتور NF-Kβ که القاءکننده بیان محصولات ژنی پیش التهابی است را مهار می‌نماید (۲۷، ۳۴). دوم ، کورکومین باعث تعدیل کاهشی بیان آنزیم های التهابی از قبیل سیکلواکسیژناز۲ ونیتریک اکساید سینتاز قابل القاء iNOS که دربسیاری ازالتهابات ایفای نقش می‌نمایند، می‌شود. سوم، کورکومین باعث مهاربیان آنزیم پیش التهابی دیگری مثل لیپواکسیژناز می‌شود. کورکومین به آنزیم لیپواکسیژناز-۵ (LOX-۵) متصل ومانع فعالیت آنزیم می‌شود (۲، ۱۶). چهارم، کورکومین باعث کاهش بیان مولکول‌های متعدد چسبیده به سطح سلول که به واسطه‌های التهابی متصل می‌شود، می‌گردد. پنجم، کورکومین باعث کاهش بیان سایتوکاین های التهابی مختلف TNF- α، IL-8 ، IL-6 و IL-1β می شود. علاوه براین کورکومین تکثیر و مهاجرت لنفوسیت‌های B,T را مهار می نماید(۱۵, ۷). امروزه کورکومین حاصل از زرد چوبه به عنوان یک ماده طبیعی ضد التهاب در حال شناخته شدن است و مطالعات متعددی اثرات مفید آن را بر روی بیماری-های مرتبط با التهاب، مانند روماتیسم و یا التهاب‌های ریوی نشان داده است (۳۲). این ماده در محیط با PH فیزیولوژیک و همچنین اسیدی پایدار بوده ولی در محیط های بازی به سرعت تخریب می‌شود. البته افزودن سرم جنین گاوی یا مواد آنتی اکسیدان، مانند اسید اسکوربیک و گلوتاتیون به محیط کشت سلول‌ها، از تخریب آن جلوگیری می‌کند (۱۲).

مواد و روش‌ها

تهیه محیط کشت: محیط کشت مورد استفاده در این مطالعه DMEM است که به صورت پودر خریداری می شود. برای تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت به مقدار ۱/۰۴ گرم پودر RPMI و ۰/۲گرم پودر بی کربنات وزن کرده با آب دیونیزه شده به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده می‌شود. روی دستگاه شیکر قرار داده تا حل و شفاف شود. سپس محیط کشت زیر هود لامینار با سر سرنگ ۰/۲ ، فیلتر می‌شود. برای تهیه محیط کامل ، به محیط کشت تهیه شده به مقدار۱۰ میلی‌لیتر ۱۰٪ FBS و ۱ میلی‌لیتر مخلوط آنتی‌بیوتیک-های پنی‌سیلین و استرپتومایسین (۱٪) در شرایط استریل اضافه می شود و بعد از تهیه، داخل یخچال ٤ ^{o}C نگهداری می‌گردد (۱۳).

دِفریز یا ذوب کردن سلول‌ها: از آنجایی که سلول‌ها به صورت منجمد در فریزر^{o}C۸۰- برای کوتاه مدت و تانک ازت ^{o}C ۱۹۶- برای طولانی مدت نگهداری می شوند، اولین اقدام برای مطالعه واستفاده ازاین سلول ها دفریزکردن است که باید بسیارسریع صورت گیرد. میکروویال حاوی سلول، از فریزر یا تانک ازت خارج شده ، در تماس با حرارت ^{o}C ۳۷ دست تحت تاثیرقرار می گیرد. درب میکروویال به آرامی باز شده و قطره قطره به سلول های محیط اضافه شده و به آهستگی پیپتاژ انجام می شود و آن مقدار از سلول که ذوب شده است به فالکون منتقل می‌شود. سپس برای دورریزکردن محیط حاویDMSO و تشکیل پلاک سلولی، فالکون حاوی سلول به مدت ٦ دقیقه و با سرعت rpm ۲۰۰۰ سانتریفوژ می‌شود و سپس محیط رویی، روی پلاک سلولی خارج می‌شود، در ته فالکون محیط کشت کامل ریخته شده و سوسپانسیون

سلولی تهیه می‌شود. سپس سوسپانسیون تهیه شده درون فلاسک ریخته و درون انکوباتور قرار می‌گیرد. به این ترتیب سلول‌ها روند رشد و تکثیر خود را آغاز می‌کنند (۱۳).

شمارش سلولی با رنگ تریپان بلو: برای شمارش سلول ها با این روش از یک قطره رنگ تریپان بلو و لام نئوبار (hemocytometer) استفاده می شود. در این روش تعداد سلول‌ها در یک سطح معین با عمق مشخص شمارش شده و غلظت سلولی محاسبه می گردد. برای تهیه سوسپانسیون سلولی، سلول‌ها با سرعت rpm ۲۰۰۰ و به مدت ٦ دقیقه سانتریفیوژمی شود. سوپرناتانت خارج و ۱میلی لیتر محیط کامل روی سلول‌ها ریخته وری ساسپن (resuspension) انجام می‌شود. که این مقدارمحیط برای محاسبات تعداد سلول در نظر گرفته می شود. برای شمارش سلولی حجم برابری از رنگ تریپان بلو و سوسپانسیون سلولی تهیه شده، با هم مخلوط می شود.۱۰ ماکرولیتر تریپان بلو و ۱۰ ماکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با هم مخلوط شده و ۱۰ ماکرولیتر از این مخلوط روی لام نئوبار به زیر میکروسکوپ منتقل می‌شود. سلول‌ها در میکروسکوپ نوری معمولی invert با بزرگنمایی X 10 مانند گلبول های سفید وقرمز شمارش می‌شوند (٤). در این روش، رنگ تریپان بلو به درون سلول-های زنده نفوذ نمی کند که به دلیل مقاومت سلول-های زنده است. و سلول های زنده زیر میکروسکوپ شفاف دیده می شود. درحالی که سلول های مرده رنگ را جذب کرده و غشای آن ها به رنگ آبی تیره دیده می‌شود (۲۳). تعداد سلول های زنده در هر ۵ بخش لام شمارش شده و میانگین گرفته می شود . تعداد کل سلول‌ها در ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی عبارت انداز : مجموع سلول های شمارش شده در ۵ خانه از لام نئوبار تقسیم بر۵ ، ضرب در ضریب رقت۱ ضرب در ضریب حجم (۱۰).

سطح مدرج لام نئوبار جهت شمارش سلولی:

$$\frac{a_1 + a_2 + a_3 + a_4 + a_5}{5} \times 10^4 \times 1$$

تعویض محیط کشت سلول ها: بسته به سرعت رشد ومتابولیسم و نوع سلول‌ها، بعد از مدت زمان مشخصی، سلول‌ها به تعویض محیط کشت نیاز دارند. تغییر PH ۰/۱ در یک روزتغییر چندانی در رشد سلول‌ها ایجاد نمی‌کند ولی تغییر ۰/٤ در اسیدیته نشان دهنده‌ی این است که در فاصله ٢٤ تا ٤٨ ساعت باید مواد غذایی به محیط کشت اضافه شود. اگر سلول‌ها سریع تکثیر شوند و رشد کنند، مواد غذایی محیط کشت زودتر و بیشتر استفاده می‌شود. اگررنگ محیط از قرمزبه زرد تغییرکند، نشانگرزمان تعویض محیط است. بنابراین محیط سلول ها بسته به نوع سلول باید هر ٤٨ -٢٤ ساعت تعویض شود. تعویض محیط به این صورت است که فلاسک حاوی سلول ازدستگاه انکوباتورCo_2 خارج شده وبعد از مشاهده میکروسکوپی، محیط قبلی داخل فلاسک را دورریز ومحیط کشت کامل تازه که دمای آن به ^oC ۳۷ رسیده را با پیپت داخل فلاسک می‌ریزیم (۱۳).

پاساژ دادن سلول‌ها: زمانی که سلول‌ها تکثیر پیدا کرد و تراکم سلولی در کف فلاسک به ۸۰ درصد رسید، موجب کمبود فضای کافی برای رشد و تکثیر سلول‌ها می شود. بنابراین سلول‌ها نیازمند فضای بیشتر بوده در این حالت سلول‌ها باید به دو یا چند فلاسک مورد نیاز پاساژ داده شوند. مراحل پاساژ به ترتیب زیر انجام می‌شود :

۱ - فلاسک حاوی سلول را بعد از بررسی میکروسکوپی و اطمینان از عدم آلودگی به زیرهود لامینار منتقل کرده، محیط کشت را تخلیه نموده و برای حذف مقدارکم باقی مانده سرم جنین

گاوی(FBS) موجود درمحیط، سلول ها۲مرتبه بابافر) (PBS phosphate-buffered saline شسته می شوند.
۲ – بافر PBS را از فلاسک خارج نموده، برای جدا کردن سلول‌ها از کف فلاسک از , Trypsin- EDTA) (1X استفاده می‌شود. Trypsin دارای خاصیت آنزیمی است وموجب کنده شدن سلول‌ها ازته فلاسک می-شود که باEDTA ترکیب شده Trypsin-EDTA به صورت منجمدشده در میکروویال‌های ۱/۵ یا ۲ میلی لیتری در فریزر $۲۰^{o}C$ – نگهداری می‌شود. به میزان ۰/۱ میلی لیتر به ازای هر سانتی متر مربع از سطح ظرف، Trypsin - EDTA در فلاسک ریخته می شود.

۳- بعد از گذشت ۳ تا ۵ دقیقه، سلول‌ها از کف ظرف کنده شده و شناور می شوند. پس از مشاهده سلول‌ها در زیر میکروسکوپ و حصول اطمینان از جدا شدن آنها، برای جلوگیری از اثر تخریبی تریپسین بر سلول‌ها، به محیط کشت (۱۰٪ FBS) اضافه می-شود تا اثر هضم‌کنندگی تریپسین را خنثی کند و مانع از آسیب زدن این آنزیم به سلول‌ها شود. محتویات فلاسک بعد از چند بار پیپتاژ، با پیپت جمع‌آوری شده و داخل یک فالکون ۱۵ ریخته می‌شود و سلول ها به مدت ٦ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ می شود. سپس محلول حاوی آنزیم تریپسین و محیط کشت قبلی که اسیدی شده، دور ریز می‌شود و ته فالکون پلاک سلولی تشکیل می‌گردد که با محیط کامل تازه سوسپانسیون شده، به فلاسک‌های جدید منتقل می شود(۱۳).

ذخیره و منجمد کردن سلول‌ها: به دلیل نگهداری سلول‌ها برای مطالعات بعدی، جلوگیری ازپیری سلول‌ها و کاهش تغییرات ژنتیکی و مورفولوژی آنها، ذخیره کردن سلول‌ها به صورت منجمد، بهترین روش می‌باشد. در این روش سوسپانسیون سلولی باید با غلظت زیاد و در حضور یک cryoprotective مانند DMSO فریز شود. cryoprotective با کاهش نقطه انجماد باعث کاهش سرعت فریز شدن سلول‌ها می-گردد. این انجماد تدریجی، ریسک تشکیل بلورهای یخ و در نتیجه آسیب سلولی را کاهش می‌دهد. برای تهیه ذخیره سلولی و فریز کردن، ابتدا، پس از تهیه سوسپانسیون سلولی، سلول‌ها سانتریفیوژ می‌شوند. برای تهیه استوکی به حجم ۱ میلی‌لیتر و ۹۰۰ ماکرولیتر سرم FBS به پلاک سلولی داخل فالکون اضافه شده وپیپتاژانجام می شود. سوسپانسیون سلولی به میکروویال منتقل شده و ۱۰۰ ماکرولیتر DMSO به آن اضافه می‌شود. به سرعت میکروویال حاوی سلول به مدت ۱ تا ۲ ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده می شود. سپس به فریزر ۷۰- منتقل می‌شود. در صورت نیاز برای نگهداری طولانی مدت بعد از ۲٤ ساعت به تانک ازت ^{o}C ۱۹٦- منتقل می‌گردد و مشخصات کامل سلول‌ها ثبت می‌گردد (۱۳).

سنجش توان حیاتی سلول‌ها: یکی از موارد مهم در بحث زیست شناسی سلولی تعیین بقای سلول است. از جمله آزمایش‌هایی که در این زمینه از اهمیت خاصی برخوردار است سنجش توان حیاتی سلول‌ها یا همان تست MTT (نمک تترازولیوم محلول در آب) است. در این تست محلول زرد رنگ تهیه شده از پودر MTT، توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز سلول های زنده و فعال از نظر متابولیکی، در مدت ٤ ساعت در انکوباتور، به بلورهای ارغوانی رنگ فورمازان تبدیل می‌شود (١٤). میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول هایی که از نظر متابولیک فعال هستند، رابطه مستقیم دارد. هرچه سلول‌ها فعال‌تر و تعدادشان بیشتر باشد، میزان رنگ تولید شده بیشتر است. کریستال‌های فورمازان ساخته شده در آب غیرمحلول است و به کمک حلال DMSO حل شده و جذب نوری محلول ارغوانی رنگ به وسیله الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومترخوانده می‌شود. در نهایت به

کمک منحنی استاندارد تعداد سلول‌های زنده محاسبه می‌شود. برای هر رده سلولی ارتباط خطی بین تعداد سلول‌ها و جذب نوری محلول نهایی وجود دارد (۱۱).

ایجاد مدل سلولی پارکینسون: در این مطالعه نیز٦ - هیدروکسی دوپامین به عنوان نوروتوکسین به همراه کورکومین در سالین به عنوان حلال با اضافه کردن ۰/۱٪ اسید اسکوربیک به عنوان محافظ ٦- هیدروکسی دوپامین برای جلوگیری از اکسیده شدن آن تا زمان انتقال به محیط کشت، استفاده می‌شود. سلول‌های مورد استفاده محیط کشت سلول‌های کاتکول آمینرژیک (SH-SY5Y) هستند. شبیه سلول‌های دوپامینی مغز بوده و در حقیقت سلول اولیه سلول‌های دوپامینی می‌باشد. در این مدل، خود سلول‌های دوپامینی به دلیل سمیت استفاده نمی شوند. غلظت‌های مورد استفاده برای محلول٦ - هیدروکسی دوپامین ۵۰ میکرومولار و برای محلول‌های کورکومین ۲۰، ۲۵، ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است که با فیلتر سرنگی استرلیزه و با سمپلر به محیط کشت اضافه می شود.

محیط کشت یک: گروه کنترل (DMEM+FBS10%)، محیط کشت دو: فقط ٦- هیدروکسی دوپامین، محیط کشت سه: ٦- هیدروکسی دوپامین با غلظت‌های کورکومین

بررسی اثرات داروها: برای انجام این تست ابتدا سوسپانسیون سلولی تهیه شده و شمارش سلولی انجام می شود که مشخص شود چه تعداد از سلول ها زنده مانده است. سپس سلول‌ها به تعداد ۵۰۰۰ در هر چاهک به پلیت ۹٦ خانه ته صاف با محیط کشت کامل منتقل شده و به مدت ٢٤ ساعت در انکوباتور CO2با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری می شود. پس از ٢٤ ساعت محیط کشت قبلی سلول ها با محیط کشت تازه که تیمارها درآن صورت گرفته بود تعویض می‌شود. تیمارها به این شکل انجام شد.

تیمار محلول MTT: غلظت‌های مختلف از ٦- هیدروکسی دوپامین و کورکومین تهیه شده و ۱ ماکرولیتر از هر یک از غلظت‌های تهیه شده برداشته و با محیط کشت کامل به حجم ۲۰۰ ماکرولیتر رسانده و سپس به داخل چاهک ریخته می‌شود و بعد پلیت به انکوباتور برگردانده می‌شود. هر تیمار در پلیت ۵ بار تکرار و چند چاهک به عنوان کنترل درنظر گرفته می شود. پس از ٤٨ ساعت، پلیت از انکوباتور خارج و محیط کشت حاوی تیمارها تخلیه و ۲۰۰ ماکرولیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه می‌شود (با غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیر). اضافه کردن محلول MTT به چاهک‌ها باید در تاریکی و دور از نور مستقیم انجام شود. سپس پلیت با فویل پوشیده و به مدت ٤ ساعت انکوبه می‌شود. بعد از انکوباسیون، بلورهای فورمازان ظاهرو به هر چاهک ۲۰۰ ماکرولیتر DMSO اضافه می‌شود. بلورهای ارغوانی فورمازان حل شده و جذب نمونه‌ها در ۵۷۰nm با دستگاه الایزا اندازگیری می شود و درصد سایتوتوکسیسیتی ٦-هیدروکسی دوپامین و(dose-response) داروها محاسبه شده که نشان می دهد کورکومین تا چه حد توانسته ازسلول های کاتکول آمینرژیک در مقابل نوروتوکسین محافظت کند. میزان رنگ تولید شده در آزمون MTT با تعداد سلول هایی که از نظر متابولیک فعال هستند، رابطه مستقیم دارد. هر چه سلول‌ها فعال‌تر و تعدادشان بیشتر باشد، میزان رنگ تولید شده نیزبیشتراست.

تیمار محلول TB: در این روش، حجم برابری ازرنگ تریپان بلو وسوسپانسیون سلولی تهیه، روی لام نئوبار قرارگرفته وزیرمیکروسکوپ معمولی مشاهده می‌شود. رنگ تریپان بلوبه درون سلول‌های زنده نفوذ نمی‌کند که به دلیل مقاومت سلول‌های زنده است. و سلول-های زنده زیر میکروسکوپ شفاف دیده می شوند.

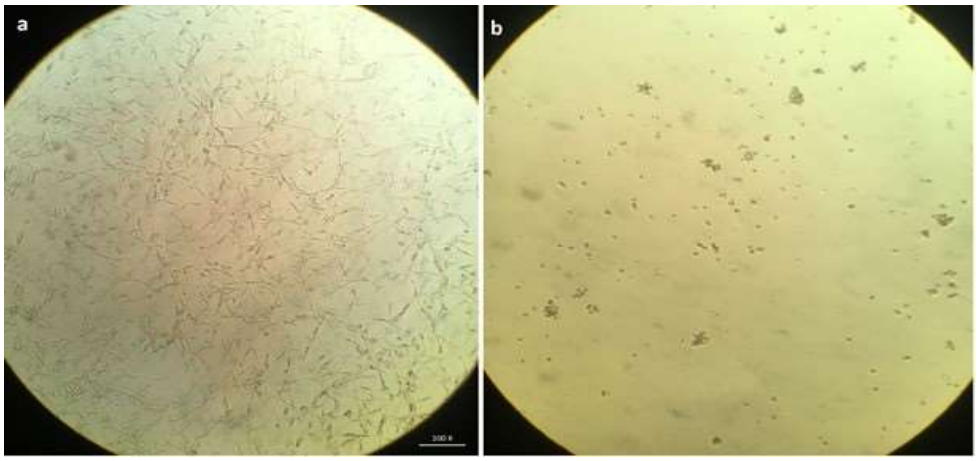
درحالی که سلول‌های مرده رنگ را جذب کرده وغشای آن ها به رنگ آبی تیره می شود.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: تمام داده‌ها از نظر آماری با استفاده از نرم افزار SPSS آنالیز واریانس (ANOVA) بررسی شد. نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار ارائه گشت معیار استنتاج آماری ($p <$ ۰/۰۵) در نظر گرفته شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار GraphPad استفاده شد.

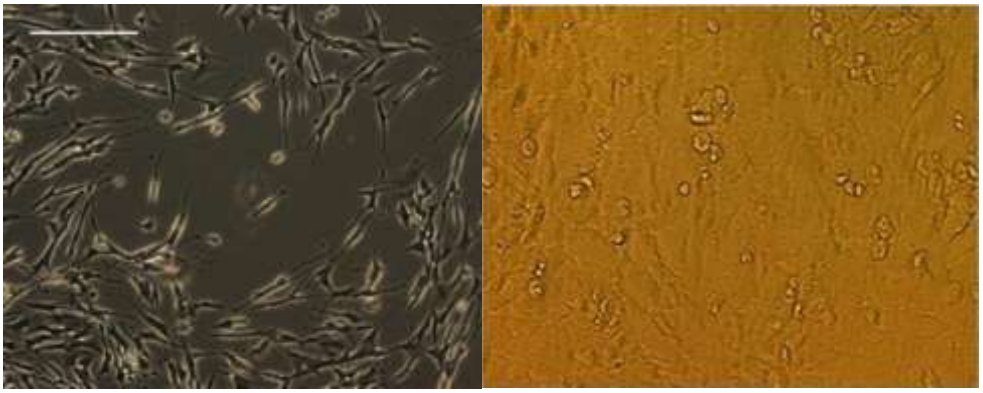
نتایج

بر اساس تجزیه وتحلیل آماری مشخص شد که تفاوت معناداری در گروه تیماری با کورکومین، نسبت به سلول‌های گروه کنترل وجود دارد. یافته‌های این تحقیق نشان دهنده تأثیر مثبت نوروتوکسین ٦- هیدروکسی دوپامین بر سلول‌های اولیه کاتکول آمینرژیک برای ایجاد بیماری پارکینسون با تخریب نورون‌های کاتکول آمینرژیک است. یافته‌های این پژوهش در دو بخش رنگ‌سنجی بررسی شد. آزمون MTT,BT نیزنشان داد که پس از درمان باکورکومین، حفاظت سلولی افزایش و مرگ نورونی کاهش یافته است. نمودار ۱ نتایج حاصل از بررسی تغییر رنگ در تست MTT را نشان می‌دهد. مقایسه گروه سلولی کنترل که دارو و ٦-HD دریافت نکردند، گروه سلولی دریافت‌کننده فقط ٦- HD و گروه‌های تیماری دریافت کننده ٦-HD و کورکومین با دوزهای ۲۵، ۲۰ و ۳۰ که دوز ۳۰ موثر شد. مرگ نورونی در گروه‌های تیماری کمترشده است و با دوز۳۰ حفاظت نورونی بیشترازبقیه تیمارها و به گروه کنترل نزدیکتراست. نمودار ۲ نتایج حاصل از بررسی تعداد نورون‌های زنده در محیط کشت سلولی با رنگ‌آمیزی تریپان آبی TB را نشان می‌دهد. مقایسه گروه سلولی کنترل که دارو و ٦-HD دریافت نکردند، گروه سلولی دریافت کننده فقط ٦- HD و گروه‌های تیماری دریافت کننده ٦-HD و کورکومین با دوزهای ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر که دوز۳۰ موثر شد. مرگ نورونی در گروه‌های تیماری کمترشده است.وبا دوز۳۰ حفاظت نورونی بیشتراز بقیه تیمارها و به گروه کنترل نزدیکتر است ($p <$ ۰/۰۰۱).

شکل ۱ تصاویر میکروسکوپی حاصل از هر دو روش رنگ آمیزی را نشان داده و جدول ۱ نشان‌دهنده‌ی نتایج بررسی تغییر رنگ MTT و BT نیز موید کاهش مرگ نورون‌های کاتکول آمینرژیک می‌باشد.



a: سلول‌های مرده در روش MTT b: سلول‌های زنده در روش MTT

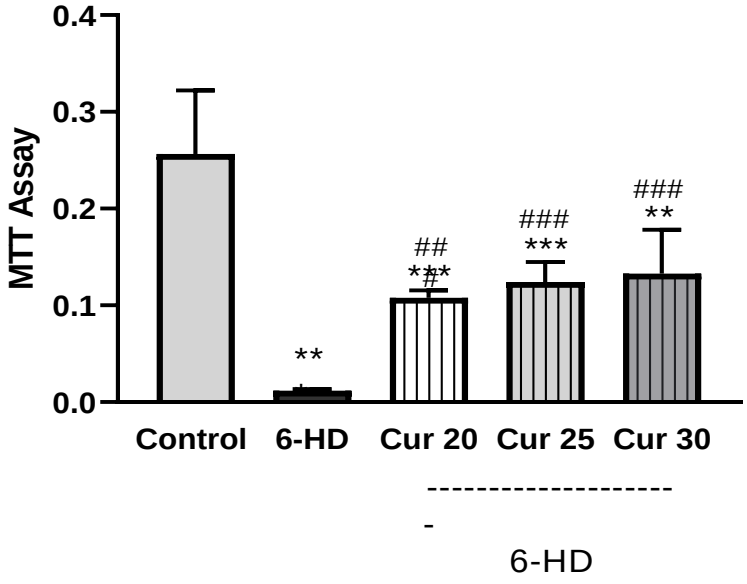


سلول‌های مرده در روش BT سلول‌های زنده در روش BT

شکل ۱- تصاویر میکروسکوپی حاصل از رنگ‌آمیزی MTT و BT

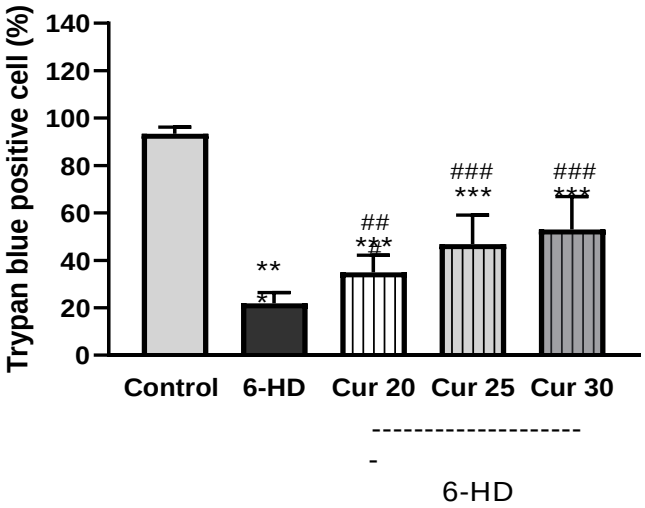
جدول ۱- نتایج از بررسی تغییر رنگ MTT و BT

گروه	MTT	BT
کنترل	۰/۲٤ ± ۰/۰۳	۹٤ ±۲/٦
6-HD	۰/۰۱ ± ۰/۰۱	۲۰ ± ۱/۳
Cur20	۰/۱۱ ± ۰/۰۲	۳٥ ± ۱/۷
Cur25	۰/۱۳ ±۰/۰۱	٥۱ ± ۱/٥
Cur30	۰/۱٤ ± ۰/۰۲	٥٦ ± ۲/۱



نمودار ۱- مقایسه گروه سلولی کنترل با گروه دریافت کننده فقط HD -٦ و گروه‌های تیمار دریافت‌کننده HD-٦ و کورکومین با دوزهای ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر که دوز ۳۰ موثر واقع شد. مرگ نورونی در گروه‌های تیماری کمتر شده و با دوز ۳۰ حفاظت نورونی بیشتر از بقیه تیمارها و به گروه کنترل سالم نزدیکتر است.

$p < ۰/۰۰۱$ *** و $p <۰/۰۱$ **



نمودار ۲- مقایسه گروه سلولی کنترل، گروه دریافت کننده فقط HD -٦ و گروه‌های تیمار دریافت کننده HD-٦ و کورکومین با دوزهای۲۰، ۲۵ و ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر که دوز ۳۰ موثر واقع شد. مرگ نورونی درگروه های تیماری کمتر شده است و با دوز۳۰ حفاظت نورونی بیشتر از بقیه تیمارها و به گروه کنترل سالم نزدیکتراست. $p <۰/۰۰۱$ ***

بحث

بیماری پارکینسون یک بیماری تخریب کنندهٔ سیستم عصبی است که به واسطهٔ مشکلات متعدد حرکتی که ایجاد می‌کند، شناخته شده است. علت اصلی بیماری، تخریب نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه درمغز میانی وکاهش غلظت دوپامین در پایانه های جسم مخطط است. ازآنجا که افزایش مصرف اکسیژن با استرس اکسیداتیو همراه خواهد بود، مغز بافتی است که به علت نیاز زیاد به اکسیژن، بیشتر در معرض آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو قرار می-گیرد. استرس اکسیداتیو یکی از عواملی است که در تخریب نورون های دوپامینرژیک در بیماری پارکینسون نقش دارد. همچنین مطالعات آزمایشگاهی نشان دادند که سرم ومایع مغزی-نخاعی بیماران پارکینسونی سطوح بالاتری از IL-12، TNF-α و IL-1β را دارا می‌باشد (۱۰). از طرفی نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه به عوامل پیش‌برنده التهابی و میانجی‌های اکسیداتیو حساسیت بیشتری دارند. چون غلظت گلوتاتیون داخل سلولی در این نورون ها نسبت به سایر سلول ها کمتر است(۸).

مطالعات Berry و همکارانش در سال ۲۰۱۰ آشکار ساخت که استرس اکسیداتیو، یکی از علل اصلی پیشبرد انحطاط جسم سیاه می‌باشد. درمطالعات متعدد آسیب‌پذیری بالای نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه به گونه‌های فعال اکسیژن، به اثبات رسیده است.

استرس اکسیداتیو توسط عدم تعادل بین تولید گونه های فعال اکسیژن و توانایی غیرسمی کردن متابولیت-های فعال تولید شده و ترمیم آسیب‌های ایجاد شده مشخص می‌گردد (۵).

بر اساس گزارش Mc Geer و همکارانش در سال ۲۰۰٤ شروع پارکینسون با فعال شدن سلول‌های میکروگلیا و تولید فاکتورهای التهابی توسط آنها همراه است که این فاکتورهای التهابی با پیشرفت بیماری افزایش پیدا می‌کنند. فاکتورهای التهابی باعث آسیب وکاهش نورون های دوپامینرژیک جسم سیاه می شود. بطوریکه استفاده از داروهای ضدالتهاب موجب حفاظت عصبی در نورون‌های دوپامینرژیک می‌گردد (۲۱).

تحقیقات Jobin و همکارانش آشکار ساختند که کورکومین باعث مهار تولید سایتوکین‌ها و مانع فعالیت NF-KB شده و در نتیجه موجب بیان ژن مرتبط با تولید سیتوکین‌های التهابی بوسیله فعالیت کینازی-I KB می‌شود (۱۸).

مطالعات Roberto Motterlini وهمکارانش در سال ۲۰۰۰ نشان داد که کورکومین فعالیت آنتی کسیدانی و ضد التهابی دارد. این مطالعه که بر روی سلول های اندوتلیال صورت گرفت، نشان داد که کورکومین از آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کند و تولید فاکتورهای التهابی را نیز کاهش می‌دهد (۲٤).

مطالعات سمیعی و همکارانش در ۲۰۱۷ نشان داد که کورکومین موجود در زردچوبه بر روی برخی باکتری های بیماری زا اثر آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی دارد و این خاصیت به خاطر داشتن ترکیبات فنولی می-باشد (۲۹).

اثرات آنتی‌اکسیدانی کورکومین در غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد ثابت شده است. اما، این اثرات اغلب وابسته به مقدار کورکومین و شرایط محیطی می باشد. کورکومین با مهار کردن آنزیم های تحریک کننده به طور غیرمستقیم، و یا به وسیله تشدید سنتز گلوتاتیون، خاصیت آنتی‌اکسیدانی از خود نشان می‌دهد. کورکومین رادیکال‌های آزاد را کاوش کرده ومانع از اکسایش زیاد چربی می‌شود (۱).

در بخش سلولی بعد از ایجاد پارکینسون، برای سنجش مقدار درمان بیماری دونوع آزمون برای مشخص شدن بقای سلول‌های اولیه در محیط کشت انجام گرفت.

در آزمون MTT این تغییررنگ از زرد به ارغوانی نشان دهنده فعالیت آنزیمی سوکسینات دهیدروژناز میتوکندیایی سلول‌های زنده است که مشخص کننده تعداد سلول‌های زنده می‌باشد و هرچقدر رنگ حاصل بیشترباشد، واکنش و تعداد سلول‌های زنده نیز بیشتر است.

آزمون تریپان بلو (BT) نشان دهنده تعداد سلول‌های زنده و مرده پس ازتزریق سم ٦–OHDA می باشد.این ترکیب به دلیل مقاومت سلول‌های زنده، به درون سلول‌های زنده نفوذ نمی‌کند و دیواره سلول‌ها زیر میکروسکوپ شفاف دیده می‌شوند. در حالیکه سلول-های مرده رنگ را جذب کرده و دیواره آنها زیر میکروسکوپ به رنگ تیره دیده می‌شود.

در این تحقیق مشاهده شد که درمان باکورکومین برای حفاظت سلول‌های پارکینسونی شده، موفقیت آمیزبوده است. آزمون MTT وBT نیزنشان داد که حفاظت سلولی افزایش ومرگ نورونی کاهش یافته است.

در بخش سلولی به این نتیجه رسیدیم که مصرف داروی کورکومین به علت داشتن خاصیت آنتی اکسیدانتی و ضد التهابی می‌تواند از پیشرفت تخریب نورون‌های کاتکول آمینرژیک (SH-SY5Y) و ایجاد بیماری پارکینسون جلوگیری کند.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر، نشان داد مصرف کورکومین می‌تواند منجربه افزایش فعالیت و توان آنتی اکسیدانی گردد. و در پی آن موجب محافظت سلول از آسیب ناشی از بنیان‌های فعال اکسیژن می‌گردد. نتایج این پژوهش پیشنهاد می‌کند مصرف کورکومین می‌تواند نقـش محافظتی در برابر بیماری پارکینسون و بیماری‌های عصبی تحلیل برنده را داشته باشد. همچنین در این مدل سلولی با کاهش مرگ نورون‌های عصبی، اثرات محافظتی وضد التهابی کورکومین مشخص شد. بطور کلی این تحقیق نشان داد، که کورکومین به دلیل داشتن خاصیت آنتی اکسیدانتی و ضدالتهابی می توانـد اثرات حفاظت نورونی برای نورون‌های کاتکول آمینرژیک در برابر سم 6-OHDA را داشته باشد. کاربرد این دارو می‌تواند سبب کاهش و یا آهسته نمودن مرگ نورون‌های کاتکول آمینرژیک شود و در کاهش پیشرفت علایم بیماری موثر باشد.

منابع

1- Aggarwal B.B., Sundaram C., Malani N., Ichikawa H. 2007. Curcumin: In The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease. *The Indian Solid Gold*, 5(1): 69-75.

2- Ammon H., Safayhi H., Mack T., Sabieraj J. 1993. Mechanism of antiinflammatory actions of curcumine and boswellic acids. *Journal of Ethnopharmacology*, *38*(2): 105-112.

3- Araujo C., Leon L. 2001. Biological activities of Curcuma longa L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 9(3): 723-728.

4- Aslantürk ÖS., 2017. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays Principles, Advantages, and Disadvantages. InTech. 71923

5- Berry C., La Vecchia C., Nicotera P., 2010. Paraquat and Parkinson's disease. *Cell Death and Differentiation*, *17*(3): 1115.

6- Blum D., Torch S., Lambeng N., Nissou M.F., Benabid A.L., Sadoul R., Verna J.M. 2001. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA dopamine and MPTP contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 65(4): 135-172.

7- Cho J.W., Lee K.S., Kim C.W. 2007. Curcumin attenuates the expression of IL-1β, IL-6, and TNF-α as well as cyclin E in TNF-α-treated HaCaT cells; NF-κB and MAPKs as potential upstream targets. *International Journal of Molecular Medicine*, *19*(2): 469-474.

8- Collins L.M., Toulouse A., Connor T.J., Nolan Y.M. 2012. Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, 62(4): 2154-2168.

9- Elbaz A., Bower J.H., Maraganore D.M., McDonnell S.K., Peterson B.J., Ahlskog J.E., Schaid D.J., Rocca W.A. 2002. Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease. *Journal of Clinical Epidemiology*, *5*(3): 25-31.

10- Ferrari C.C., Tarelli R. 2011. Parkinson's disease and systemic inflammation. Foundation PD. *Parkinson's Statistics*,10(4): 4061-4072

11- Francis D., Rapid R.L. 1986. Colorometric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89(3): 271-277.

12- Gupta S. C., Kim J. H., Prasad S., Aggarwal B.B. 2010. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metastasis Review*, 29(3): 405–434.

13- Hasanzadeh SH., Bonyady F. 2017. Principles and methods of animal cell

culture. *Urmia University*, 237-289.[in persian]

14- Hayon T., Dvilansky A., Shpilberg O., Nathan I. 2003.Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia. *Leukemia and Lymphoma*, 44(11): 1957-1962.

15- Hong J., Bose M., Ju J., Ryu J.H., Chen X., Sang S., Lee M. J., Yang C.S. 2004. Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related β-diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A 2, cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. *Carcinogenesis*, *25*(2): 1671-1679.

16- Huang M. T., Lysz T., Ferraro T., Abidi T.F., Laskin J.D., Conney A.H. 1991. Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. *Cancer Research*, *5(1*): 813-819.

17- Hubble JP., Cao T., Hassanein R., Neuberger J., Roller W., 1993. Risk factors for Parkinson's disease. *Neurology, 43*(3): 1693-1693.

18- Jobin C., Bradham C.A., Russo M.P., Juma B., Narula A.S., BrennerD.A., Sartor R.B., 1999. Curcumin blocks cytokine-mediated NF-κB activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-κB kinase activity. *The Journal of Immunology*, *163*(6): 3474-3483.

19- Lin T.K., Liou C.W., Chen S.D., Chuang Y.C., Tiao M.M., Wang P.W., Chen J.B., Chuang J.H., 2009. Mitochondrial dysfunction and biogenesis in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Chang Gung Medical Journal*, *32*(3): 589-599.

20- Maheshwari R.K., Singh A.K., Gaddipati J., Srimal R.C., 2006. Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Sciences*, 78(4): 2081-2087.

21- McGeer P.L., McGeer E.G., 2004. Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*, 10(3): S32-S37.

22- Moken Y., Xianping D., Yaoshu T. 1984. Studies on the chemical constituents of common turmeric (*Curcuma longa*). *Zhongcoayoa*, 15(3): 197-198.

23- Moldeus T., Hogberg J., Orrhenius S., Fleischer S., Packer L.,1978. Trypan blue dye exclusion method. *Meth Enzym*, 5(2): 60-71.

24- Motterlini R., Clark J.E., Foresti R., Sarathchandra P., Mann B.E., Green C.J. 2002. Carbon monoxide-releasing molecules characterization of biochemical and vascular activities. *Circulation Research*, 90(2): 17-24.

25- Ono K., Hasegawa K., Naiki H., Yamada M. 2004. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's β-amyloid fibrils in vitro. *Journal of Neuroscience Research*, 75(4): 742-750.

26- Philip S., Kundu G.C. 2003. Osteopontin induces nuclear factor-kB-mediated promatrix metalloproteinase-2 activation through IkB alpha/IKK signaling pathways and curcumin (Diferulolylmethane) down regulates these pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 278(16): 1487-1497.

27- Pulido-Moran M., Moreno-Fernandez J., Ramirez-Tortosa C., Ramirez-Tortosa M. 2016. Curcumin and health. *Molecules*, 21(3): 264-273.

28- Sahu A., Kasoju N., and Bora U., 2008. Fluorescence study of the curcumin− casein micelle complexation and its application as a drug nanocarrier to cancer cells. *Biomacromolecules* ,9(3): 2905-2912.

29- Samiei A., Tabatabaei-Yazdi F., Mazaheri Tehrani M., 2017. An investigation into the antioxidant activity, phenolic compounds, antimicrobial effect and interaction of the essential oils of Curcuma longa and Ocimum basilicum on some pathogenic bacteria. *Food Science and Technology, Faculty of Agriculture*,

Ferdowsi University of Mashhad, 74(15): 99 -107.[in persian]

30- Savica R., Rocca W.A., Ahlskog J.E. 2010. When does Parkinson disease start? *Archives of neurology*, 67(3): 798-801.

31- Schapira A.H. 2009. Neurobiology and treatment of Parkinson's disease. *Trends in pharmacological sciences*, 30(3): 41-47.

32- Sikora E., Scapagnini G., and Barbagallo M., 2010. Curcumin, inflammation, ageing and age-related diseases. *Immunity & Ageing*, 7(1): 12-18.

33- Thoenen H., Tranzer J. 1968. Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-hydroxydopamine. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Pharmakologie und Experimentelle Pathologie*, 261(3): 271-288.

34- Tomita M., Kawakami H., Uchihara J. n., Okudaira T., Masuda M., Takasu N., Matsuda T., Ohta T., Tanaka Y., Ohshiro K. 2006. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive active NF-kappaB, leading to suppression of cell growth of human T-cell leukemia virus type I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *International Journal of Cancer*, 118(4): 765-772.

35- Veldman B., Wijn A., Knoers N., Praamstra P., Horstink M. 1998. Genetic and environmental risk factors in Parkinson's disease. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 100(4): 15-26.