



Original Paper

## Effect of Curcumin on Cortisol, Catalase and Nerve Growth Factor Expression Level in Animal Model of Induced Multiple Sclerosis

Laleh Mavaddatiyan (M.Sc)<sup>1</sup> , Shiva Khezri (Ph.D)<sup>\*2</sup> , Seyyed Meysam Abtahi Froushani (Ph.D)<sup>3</sup> 

<sup>1</sup> M.Sc in Animal Physiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran. <sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran. <sup>3</sup> Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

### Abstract

**Background and Objective:** Multiple sclerosis (MS) is a common neurological disease that increases oxidative stress and causes immune system disorders. Curcumin is the active component of turmeric with anti-inflammatory properties. This study was conducted to determine the effects of curcumin on cortisol, catalase, and nerve growth factor (NGF) expression in an animal model of MS.

**Methods:** This experimental study was conducted on 30 female Wistar rats. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) was chosen as an experimental model of MS. The rats were divided into 3 groups of 10, including a healthy control group, an affected group, and a group treated with curcumin. The disease was induced by immunization of rats with homogenized guinea pig spinal cord and Freund's complete adjuvant. Then, the immunized animals were allocated into two equal groups. Treatment with curcumin (100 mg/kg daily) was started 12 days after the immunization when the rats showed the first symptoms of neurologic disability. The treatment was continued until day 24 post-immunization. Simultaneously, the EAE group received the medicine solvent (distilled water). Finally, the rats' weights as well as cortisol, catalase, and NGF levels were measured in the study groups.

**Results:** Curcumin significantly increased the level of cortisol to a level equal to that of healthy rats ( $P < 0.05$ ). It also significantly increased the expression of NGF and reduced the amount of catalase in the affected rats ( $P < 0.05$ ). The curcumin administration significantly increased the overall weight of rats with MS but had no significant effect on the spleen weight of the treated rats.

**Conclusion:** Curcumin can be beneficial for treating EAE by reducing the destructive effects of oxidative damage and increasing NGF.

**Keywords:** Multiple Sclerosis, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, Curcumin, Catalase, Nerve Growth Factor, Wistar Rats

\*Corresponding Author: Shiva Khezri (Ph.D), E-mail: sh.khezri@urmia.ac.ir

Received 31 Jul 2021

Final Revised 9 May 2022

Accepted 17 May 2022

Published Online 17 Oct 2022

Cite this article as: Mavaddatiyan L, Khezri Sh, Abtahi Froushani SM. [Effect of Curcumin on Cortisol, Catalase and Nerve Growth Factor Expression Level in Animal Model of Induced Multiple Sclerosis]. J Gorgan Univ Med Sci. 2022; 24(2): 10-18. [Article in Persian]





## تحقیقی

# اثر کورکومین بر میزان کورتیزول، کاتالاز و سطح بیان فاکتور رشد عصبی در مدل تجربی مالتیپل اسکلروزیس القا شده: یک مدل حیوانی

لاله مودتیان<sup>۱</sup>، دکتر شیوا خضری<sup>۲\*</sup>، دکتر سید میثم ابطحی فروشانی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. <sup>۲</sup> استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. <sup>۳</sup> دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

## چکیده

زمینه و هدف: بیماری مالتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis: MS) یکی از شایع‌ترین بیماری‌های نورولوژیک است که موجب افزایش استرس‌های اکسیداتیو و بروز اختلالات در سیستم دفاعی بدن می‌گردد. کورکومین جزء فعال زردچوبه است که دارای خواص ضدالتهابی است. این مطالعه به منظور تعیین اثر کورکومین بر میزان کورتیزول، کاتالاز و سطح بیان فاکتور رشد عصبی (NGF) در مدل تجربی مالتیپل اسکلروزیس القا شده انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه تجربی روی ۳۰ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار انجام شد. انسفالومیلیت خودایمن تجربی (EAE) به‌عنوان مدل تجربی بیماری MS انتخاب گردید. موش‌ها در سه گروه ۱۰ تایی شامل گروه کنترل (سالم)، گروه مبتلا و گروه درمان با کورکومین تقسیم شدند. بیماری توسط ایمن‌سازی موش‌های صحرایی با نخاع هموژنیزه شده خوکیه هندی و ادجوانت کامل فروند القاء شد. سپس حیوانات ایمن‌شده در دو گروه مبتلا و درمان با کورکومین قرار گرفتند. درمان با کورکومین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه) از روز دوازدهم بعد از ایمن‌سازی، همزمان با بروز اولین علائم ناتوانی نورولوژیک (اختلال در حرکت دم) در حیوانات آغاز شد. درمان تا ۲۴ روز بعد از ایمن‌سازی ادامه یافت. همزمان گروه مبتلا حلال دارو (آب مقطر) دریافت نمود. سپس وزن حیوانات، میزان هورمون کورتیزول، آنزیم کاتالاز و سطح بیان NGF در گروه‌های مختلف سنجیده شدند.

یافته‌ها: کورکومین باعث افزایش معنی‌دار سطح کورتیزول و بازگشت آن به سطح موش‌های صحرایی سالم ( $P < 0/05$ )، افزایش بیان NGF و کاهش میزان آنزیم کاتالاز نسبت به گروه مبتلا گردید ( $P < 0/05$ ). لازم به ذکر است که کورکومین تاثیر معنی‌داری بر میزان وزن طحال موش‌های صحرایی تحت تیمار نداشت؛ اما تجویز کورکومین در موش‌های صحرایی مبتلا به اسکروز متعدد موجب افزایش وزن نسبت به گروه بیمار شد. نتیجه‌گیری: کورکومین به دلیل کاهش اثرات مخرب آسیب‌های اکسیداتیو و افزایش فاکتور رشد عصبی، می‌تواند در بهبود بیماری آنسفالومیلیت خودایمن تجربی مفید واقع شود.

واژه‌های کلیدی: اسکروز متعدد، انسفالومیلیت خودایمن تجربی، کورکومین، کاتالاز، فاکتور رشد عصبی، موش صحرایی نژاد ویستار

\* نویسنده مسؤل: دکتر شیوا خضری، پست الکترونیکی sh.khezri@urmia.ac.ir

نشانی: ارومیه، کیلومتر ۱۱ جاده سرو، دانشگاه ارومیه، تلفن ۰۴۴-۳۱۹۴۲۱۲۲

وصول ۱۴۰۰/۵/۱۹ اصلاح نهایی ۱۴۰۱/۲/۱۹ پذیرش ۱۴۰۱/۲/۲۷ انتشار ۱۴۰۱/۷/۲۵

## مقدمه

گرفته است؛ اما این داروها اثرات درمانی کمی داشته و از طرفی مصرف طولانی مدت آنها با عوارض جانبی همراه بوده است.<sup>۱</sup> بنابراین مطالعه و تحقیق درباره ترکیبات اثرگذار طبیعی بر سیر پاتوژنز بیماری امری لازم و ضروری است. انسفالومیلیت خودایمن تجربی (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: EAE) به‌عنوان مدل تجربی بیماری MS استفاده شده و فرصت خوبی را برای مطالعه کارآمد ترکیبات با ویژگی‌های احتمالی دارویی فراهم آورده است.<sup>۲</sup> هر دو بیماری MS و EAE دارای یک ماهیت

اسکلروز متعدد (مالتیپل اسکلروزیس، Multiple Sclerosis: MS) یک بیماری شایع دمیله‌ن و التهابی سیستم عصبی مرکزی (Central Nervous System: CNS) است<sup>۱</sup> که عمدتاً در بالغین جوان در سنین ۲۰ تا ۴۰ سال و به‌طور شایع‌تر در زنان (تقریباً ۲ تا ۳ برابر مردان) بروز می‌کند.<sup>۳،۴</sup> کاهش عملکردهای اعصاب حسی، حرکتی و خودمختار شایع‌ترین نشانه‌های بالینی در مرحله پیشرفته MS هستند.<sup>۵</sup> داروهای مختلف تعدیل‌کننده پاسخ‌های ایمنی با مکانیسم‌های متفاوت، برای درمان بیماری MS مورد استفاده قرار

کلیه مراحل این تحقیق با رعایت حقوق حیوانات در مطالعات و پس از تایید در کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه (آد/IR-UU-AEC-3/1580) انجام شد. حیوانات تحت شرایط استاندارد  $25 \pm 2$  درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی  $50 \pm 10$  درصد نگهداری شدند. تمام حیوانات تحت شرایط تغذیه‌ای یکسان با کسانتره دامی به نسبت‌های برابر تغذیه شده و امکان دسترسی آزاد به آب نیز برای تمامی حیوانات وجود داشت. روند بیماری و تغییرات وزن موش‌های صحرایی روزانه مورد ارزیابی قرار گرفت.

به منظور القاء انسفالومیلیت خودایمن تجربی (EAE) در شروع کار، بافت هموژنیزه شده نخاع خوکچه هندی به نسبت ۱ به ۱ با ادجوانت کامل فروند (CFA) (Complete Freund's Adjuvant، sigma Aldrich-امریکا) که محتوی ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم پیکره کشته شده مایکوباکتریوم بود؛ به حالت امولسیون در آمد. برای تهیه سوسپانسیون مزبور از دو سرنگ شیشه‌ای که توسط رابطی از جنس استیل به هم متصل هستند؛ استفاده شد. در یکی از سرنگ‌ها محلول بافت مغز و نخاع هموژن شده خوکچه و سرنگ دیگر محتوی هم حجم آن CFA وارد شد و عمل پر و خالی کردن سرنگ‌ها به نوبت تا حصول امولسیون سفید رنگ، یکنواخت و با قوام ادامه یافت. همچنین قابل ذکر است که ادجوانت فروند کامل تجاری موجود در بازار حاوی یک میلی گرم در میلی لیتر از پیکره مایکوباکتریوم است. برای رسیدن به غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر، یک شیشه ادجوانت فروند کامل (۱۰ میلی لیتر) با دور RPM ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ و رسوب حاصل در یک سی سی از مایع رویی خود ادجوانت حل شد. پس از بیهوشی موش‌های صحرایی (کنامین ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم و زایلازین ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم - شرکت، Alfasan هلند)، ۴۰۰ میکرولیتر مخلوط آنتی ژن و ادجوانت مزبور به صورت زیرجلدی در ناحیه پشت و ۱۰۰ میکرولیتر در ناحیه بالشتک کف پای (Foot Pad) هر حیوان با سوزن ۲۵ گیج تزریق گردید. مقدار  $10^9$  باکتری برودتلا پاراپروتوسیس (مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، ATCC 15311, IBRC-M 10710) نیز در حجم ۳۰۰ میکرولیتر PBS (Phosphate Buffered Saline) در روز ایمن‌سازی و ۴۸ ساعت بعد به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. <sup>۲۵،۲۴</sup>

علائم نورولوژیک عدم بروز بیماری، اختلال در حرکت دم، فلج شدن دم، فلجی دو پا، فلجی چهار دست و پا و مرگ برای ارزیابی شدت بیماری EAE به ترتیب با اختصاص نمرات صفر، یک، دو، سه، چهار و پنج تعیین شد. <sup>۲۶</sup>

موش‌های صحرایی در ۳ گروه ۱۰ تایی شامل گروه کنترل (سالم)، گروه مبتلا و گروه درمان با کورکومین به شرح زیر تقسیم شدند.

خودالتهایی هستند. <sup>۹</sup> حمله لنفوسیت‌های CD4+T به بافت عصبی نقش اساسی را در شروع بیماری بازی می‌کند. <sup>۱۱،۱۰</sup> به دنبال اثبات اثرات مضر آنتی‌اکسیدان‌های شیمیایی و سنتز شده، گرایش به داروهای طبیعی با اثرات جانبی کمتر، افزایش یافته است. <sup>۱۲</sup> امروزه طیف وسیعی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان تحت عنوان افزودنی به جهت اهداف گوناگون، در تهیه فرآورده‌های غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند که از آن جمله می‌توان به زردچوبه اشاره کرد. <sup>۱۳،۱۴</sup> زردچوبه شامل ترکیبات متعددی است که مهم‌ترین آنها شامل اسانس‌هایی از قبیل ترمرون‌ها، الئوزین و کورکومینوئیدهاست. <sup>۱۵</sup> از دیگر مواد موجود در زردچوبه می‌توان به مواد معدنی (نظیر پتاسیم)، کاروتن و ویتامین C اشاره کرد. <sup>۱۶</sup> کورکومینوئیدها شامل کورکومین (Curcumin) (ماده تشکیل دهنده اصلی و مسؤول رنگ زرد)، دمتوکسی کورکومین و بیس‌دمتوکسی که در جاگیری گروه متوکسی بر روی حلقه آروماتیک با یکدیگر متفاوتند و جزء تازه کشف شده به نام سیکلوکورکومین هستند. <sup>۱۷،۱۸</sup> مهم‌ترین ترکیب فعال موجود در زردچوبه که خواص دارویی نیز به وجود آن مرتبط است؛ کورکومین است. <sup>۱۳،۱۹</sup> کورکومین (۷۰۱- بیس (۴- هیدروکسی ۳- متوکس فنیل) ۶- هیتادی ان ۳ و ۵- دی‌ان) رنگدانه زرد رنگی است که از ریشه‌های گیاه *Curcuma longa L.* از خانواده زنجبیل به دست می‌آید. کورکومین یک پلی‌فنل آب‌گریز و در حقیقت همان اولئوزین پالایش شده و بدون روغن فرار است. <sup>۲۰</sup> مولکول کورکومین ترکیبی از دو کروموفور آریل بوتن ۲- فریلول است که توسط یک گروه متیلن به همدیگر متصل شده‌اند. <sup>۲۱</sup> و برای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدتکثیری و ضدالتهابی کورکومین، گروه‌های هیدروکسی و متوکسی موجود در ساختار آن ضروری است. <sup>۲۲،۲۳</sup> قابل بیان است که در این بیماری سیتوکین‌های التهابی از قبیل TNF- $\alpha$  افزایش یافته و این فاکتور باعث فعال شدن آنزیم لیپوپروتئین لیپاز می‌گردد. این آنزیم باعث روان‌سازی چربی‌ها شده و شدیداً وزن بدن حیوان را کاهش می‌دهد. وزن طحال طی درمان با کورکومین افزایش می‌یابد. با توجه به این که طحال مرکز انجام واکنش‌های ایمنی بدن است؛ افزایش وزن طحال می‌تواند نشان‌دهنده افزایش فعال شدن لنفوسیت‌ها باشد. <sup>۷</sup> این مطالعه به منظور تعیین اثر کورکومین بر میزان کورتیزول، کاتالاز و سطح بیان فاکتور رشد عصبی (Nerve growth factor: NGF) در مدل تجربی مالتیپل اسکلروزیس القا شده انجام شد.

### روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۳۰ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار با وزن تقریبی  $80 \pm 7$  گرم تهیه شده از خانه حیوانات دانشکده علوم دانشگاه ارومیه طی سال ۹۶-۱۳۹۵ انجام شد.

دستگاه از بافر فسفات استفاده شد. در پایان، مقادیر بر حسب  $\mu\text{g}/\text{gr tissue}$  ( $\mu\text{H}_2\text{O}_2 / \text{min}$ ) بیان گردید و سپس در فرمول زیر قرار داده شد.

$$\Delta\dot{A} = A1 - A2$$

$$\Delta\dot{A} \text{ blank} > \Delta\dot{A} \text{ sample}$$

$$\text{Unite/ml} = [\Delta\dot{A}/\text{min} (\text{sample})] * dx/V$$

$$(0.5\text{ml} * 0.0436)$$

A1 بعد از ۲۰ ثانیه و A2 بعد از ۲ دقیقه

برای اندازه‌گیری میزان هورمون کورتیزول در مرحله نخست ۳۰ میکرولیتر (سرم/ پلاسما) یا ۵۰  $\mu\text{l}$  (کل خون) نمونه با استفاده از یک پیپت به لوله حاوی بافر تشخیص، انتقال داده شد. درب لوله بافر بسته شده و با تکان دادن نمونه به تعداد ۱۰ بار، کاملاً مخلوط شد. لازم به ذکر است مخلوط نمونه بایستی بلافاصله استفاده شود. در ادامه کار، ۷۵ میکرولیتر از ترکیب نمونه به وسیله پیپت برداشته شد و در کارتریج قرار گرفت. کارتریج حاوی نمونه به اتاق اسلات یا انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شد و سپس در انکوباتور به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری گردید. برای اسکن کارتریج حاوی نمونه (نمونه بارگیری شده)، کارتریج درون کارتریج نگهدارنده دستگاه قرار گرفت. دستگاه آزمایش، نتیجه آزمایش را به صورت خودکار محاسبه کرد و غلظت کورتیزول نمونه آزمایش بر حسب  $\text{nmol/L}$  حساب گردید.

به منظور اندازه‌گیری تغییرات بیان ژن NGF در ابتدا برای آماده کردن بافت، ۵۰-۲۵ میلی‌گرم نمونه بافت مغز را در هاوونی حاوی نیتروژن مایع له کرده؛ سپس نمونه به داخل میکروتیوب ۲ml ته گرد انتقال داده شد و به آن ۴۰۰ میکرولیتر محلول لیز اضافه و برای میکس و مخلوط شدن مواد داخل میکروتیوب روی ورتکس به مدت یک دقیقه قرار داده شد. در نهایت برای هموژنیزه کردن مواد حدقل ۱۰ بار از سرنگ ۲۰gauge عبور داده شد. در مراحل بعدی ۳۰۰ میکرولیتر محلول رسوب‌دهنده به مواد نمونه داخل میکروتیوب اضافه و سپس ۱۰ بار میکروتیوب سر و ته شد. نمونه به داخل میکروتیوب ستون‌دار منتقل و به مدت یک دقیقه با دور RPM ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید. سپس به میکروتیوب ۴۰۰ میکرولیتر بافر شستشوی ۱ (Wash buffer 1) اضافه و باز با دور RPM ۱۳۰۰۰ به مدت یک دقیقه سانتریفوژ گردید. بعد از این مرحله ۴۰۰ میکرولیتر بافر شستشوی ۲ (Wash buffer 2) اضافه و باز با دور RPM ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. از این مرحله به بعد هر سری میکروتیوب را دور انداخته و ستون جمع‌کننده را در میکروتیوب جدید قرار دادیم. مجدداً در مرحله بعد ۴۰۰ میکرولیتر بافر شستشوی ۲ اضافه و با دور RPM ۱۳۰۰۰ به مدت یک دقیقه سانتریفوژ گردید. بعد از دور انداختن میکروتیوب، به مدت ۲ دقیقه با دور RPM ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. در آخرین مرحله کار، RNase free water را به مدت ۵-۳

گروه کنترل (سالم غیربیمار): فرآیند القاء بیماری را نداشتند و همزمان با دیگر گروه‌ها حلال دارو را دریافت نمودند.

گروه تجربی اول (مبتلا): موش‌های صحرائی مبتلا به EAE که پس از بروز اولین علائم (روز ۱۲م پس از القاء) حلال دارو (آب مقطر) با حجم ۲۰۰ میکرولیتر تا روز ۲۴م دریافت نمودند.

گروه تجربی دوم (تیمار): موش‌های صحرائی مبتلا به EAE که پس از بروز اولین علائم (روز ۱۲م پس از القاء) کورکومین روزانه را به میزان  $100 \text{mg/kg}$  به روش گاواژ تا روز ۲۴م دریافت نمودند.

با بروز اولین علائم ناتوانی نورولوژیک (اختلال در حرکت دم) تیمار با کورکومین آغاز گردید.<sup>۷</sup> انتخاب دز کورکومین بر اساس مطالعات گذشته در مدل‌های خودایمنی و خود التهابی صورت گرفت.<sup>۲۷،۲۸</sup>

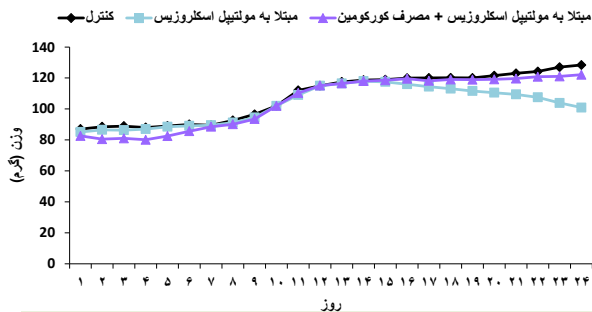
یک ماه پس از آغاز مطالعه، موش‌های صحرائی توسط کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند و پس از تشریح و باز شدن جلوی قفسه سینه توسط قیچی جراحی، خونگیری مستقیم از قلب حیوانات به میزان ۲ میلی‌لیتر انجام و سرم تهیه گردید.

تغییرات وزنی سه گروه مورد مطالعه از همان روز اول تیمار تا آخرین روز و قبل از قربانی شدن ثبت شد. پس از قربانی شدن، میانگین تغییرات وزنی گروه‌ها رسم گردید.

برای به‌دست آوردن وزن طحال، قبل از کشتار حیوانات، وزن هر یک از آنها گرفته شده و پس از کشتار نیز وزن طحال با استفاده از ترازوی حساس سنجیده شد. در ادامه و برای به‌دست آوردن وزن طحال هر موش صحرائی، وزن طحال بر وزن همان موش تقسیم شد. در آخر نیز از داده‌های به‌دست آمده هر گروه، میانگین گرفته شد و در نمودار با هم مقایسه شدند.

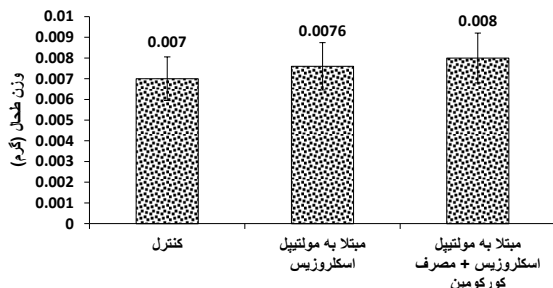
فعالیت کاتالاز براساس توانایی آن در تجزیه  $\text{H}_2\text{O}_2$  به‌روش Aebi اندازه‌گیری شد.<sup>۲۸</sup> تجزیه  $\text{H}_2\text{O}_2$  با کاهش جذب در طیف جذبی ۲۴۰ نانومتر قابل بررسی است. تفاوت جذب در واحد زمان معادل مقدار فعالیت کاتالاز است. محلول بافر فسفات تهیه و pH محلول روی ۶/۸ تنظیم گردید. برای تهیه محلول آب اکسیژنه ۰/۱۵ میلی‌لیتر آب اکسیژنه در یک بالن ۱۰۰ ریخته شد و با بافر فسفات تهیه شده، به‌حجم رسانده شد. سپس نمونه مغز و کبد وزن گردید. ۱۰ درصد وزن/حجم آن در داخل بافر فسفات ریخته شد و در هاوون قرار گرفت و در محیط یخ کوبیده شد. محلول هموژنای بافتی تهیه شد. به‌مدت ۵ دقیقه در دور RPM ۵۰۰۰ سانتریفوژ گردید. در مرحله بعدی ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی سانتریفوژ شده به ۲/۸ میلی‌لیتر بافر فسفات اضافه گردید و پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آب اکسیژنه، جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر در زمان‌های صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰ ثانیه توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (UNICO - 2100 آمریکا) اندازه‌گیری شد. برای صفر نمودن

توجهی افزایش یافت ( $P < 0/05$ ). به طوری که سطح فعالیت آنزیم کاتالاز به طور متوسط به میزان ۵/۱۸ برابر افزایش پیدا کرد. تیمار با کورکومین موجب کاهش معنی دار سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه مبتلا گردید ( $P < 0/05$ ).

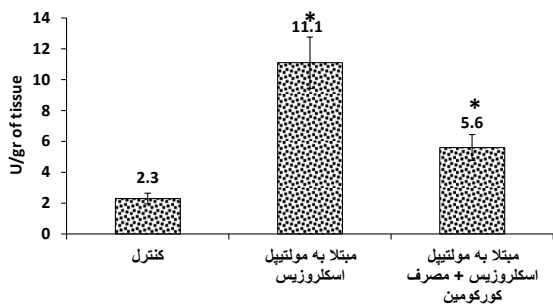


نمودار ۱: تغییرات وزنی موش های صحرایی مورد مطالعه

| گروه ها                               | قبل از تیمار | بعد از تیمار |
|---------------------------------------|--------------|--------------|
| کنترل                                 | ۸۷±۰/۵       | ۱۲۸/۴±۲      |
| مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس            | ۸۵/۱±۲       | ۱۰۰/۹±۰/۱۱   |
| مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس + کورکومین | ۸۲/۶±۹       | ۱۲۲/۱±۵      |



نمودار ۲: تغییرات وزن طحال موش های صحرایی مورد مطالعه



نمودار ۳: تغییرات سطح کاتالاز در بافت مغز موش های صحرایی مورد مطالعه  
 $P < 0/05$ \*

دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد گرم کرده و به میکروتیوب اضافه و با ۱۳۰۰۰ RPM و به مدت یک دقیقه سانتریفوژ نمودیم. برای انجام واکنش RT-PCR از ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس آماده، ۲ میکرولیتر نمونه (cDNA)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر فرورارد و ریورس هر ژن مدنظر با ۹/۵ میکرولیتر آب به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. پرایمرها طراحی شده از شرکت Cinna Gen خریداری شدند. توالی این پرایمرها در جدول یک آمده است.

| Forward                    | Reverse                   | Gene  |
|----------------------------|---------------------------|-------|
| 5'-AATTAGGCTCCCTGGAGGTG-3' | 5'-TGAGCTTGGGTCCAGGAT-3'  | NGF   |
| 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' | 5'-TCCACCACCCTGTGCTGTA-3' | GAPDH |

برای انجام واکنش طبق دستور بروشور موجود، PCR انجام شد. برای انجام PCR برای ژن GAPDH سیکل های دمایی به ترتیب ۹۵ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه (دناتوراسیون) و ۳۰ سیکل در ۹۴ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه (دناتوراسیون)، ۶۱ درجه سانتی گراد ۴۵ ثانیه (Annealing) و ۷۲ درجه سانتی گراد ۴۵ ثانیه (Elongation) گذاشته شد و در نهایت هم ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد برای بسط نهایی (Elongation) قرار داده شد. در نهایت دمای خنک سازی نمونه ها ۴ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. ولی برای ژن NGF، یکسری تغییراتی در این فاکتورها اعمال گردید. بدین صورت که ۳۵ سیکل در ۹۵ درجه سانتی گراد و ۳۰ ثانیه (دناتوراسیون) و Annealing ۶۰ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه در نظر گرفته شدند.

داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-21 تجزیه و تحلیل شدند. برای مقایسه دو داده نقطه ای از آزمون های T-student و آزمون غیرپارامتری یومن ویتنی و برای مقایسه چندین داده از One Way ANOVA و تست تعقیبی توکی استفاده شد. برای اطمینان از توزیع نرمال داده ها آزمون کولموگروف-اسمرنوف به کار رفت. سطح معنی داری آزمون ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شدند. داده ها به صورت Mean±SD گزارش گردید. برای رسم نمودارها از نرم افزار Microsoft Excel-2013 استفاده شد.

### یافته ها

وزن حیوانات براساس نتایج به دست آمده (نمودار یک، جدول ۲) در گروه تیمار با کورکومین افزایش یافت. این در حالی است که وزن حیوانات گروه مبتلا به EAE نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. با توجه به نمودار ۲ وزن طحال در گروه مبتلا به EAE نسبت به گروه کنترل کاهش جزئی یافت. درمان با کورکومین باعث افزایش وزن طحال نسبت به گروه مبتلا شد که البته این افزایش وزن معنی دار نبود.

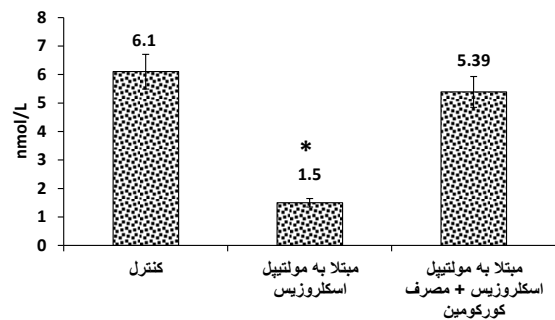
سطح فعالیت آنزیم کاتالاز با توجه به نمودار ۳ در موش های صحرایی گروه مبتلا به EAE نسبت به گروه کنترل به مقدار قابل

قبلاً اثرات مفید کورکومین در بیماری‌های سیستم اعصاب مرکزی گزارش شده است. برای مثال بیماران مبتلا به آلزایمر که رژیم غذایی کورکومین را دریافت کرده بودند؛ پلاک‌های آمیلوئید کمتری نسبت به سایر بیماران داشتند.<sup>۲۹</sup> علاوه بر این، نشان داده شده است که کورکومین موجب محافظت عصبی و همچنین تقویت قوای شناختی پس از آسیب ایسکمی مغز شده است.<sup>۳۰</sup> براساس برخی مطالعات، کورکومین به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی که دارد؛ در بهبود سمیت عصبی ناشی از دیازینون موثر است.<sup>۳۱</sup> در مورد تاثیر کورکومین در مدل تجربی اسکروز متعدد قبلاً چندین مطالعه صورت گرفته است. هرچند که اطلاعات کافی در مورد جنبه‌هایی از بیماری که در مطالعه حاضر صورت گرفته است؛ موجود نیست. به طور مثال در مطالعه قبلی ما تجویز کورکومین در موش‌های مبتلا به EAE با افزایش میزان بیان ژن MBP و کاهش شدت بیان NOGO-A، شدت علائم EAE را کاهش داد.<sup>۷</sup> در مطالعه Feng و همکاران نشان داده شد تجویز کورکومین در مراحل اولیه بیماری EAE در موش‌های C57bl/6 از طریق مهار پیشرفت آسیب میتوکندریایی موجب کاهش علائم بیماری شده است.<sup>۳۲</sup>

نتایج به دست آمده نشان داد که تیمار با کورکومین در موش‌های مبتلا به EAE موجب افزایش وزن مختصری در طحال شده است. هرچند که تغییر یاد شده از نظر آماری معنی دار نبود. بایستی توجه داشت که افزایش کلی وزن طحال مقیاسی از افزایش تعداد لنفوسیت‌ها و نه نوع آنها است. در بدن در شرایط فیزیولوژیک انواع و اقسامی از لنفوسیت‌های اختصاصی یک آنتی‌ژن، بسته به ریزمحیط اطرافش تشکیل می‌گردد. به عبارتی یک لنفوسیت با یک گیرنده آنتی‌ژنیک منحصر به فرد ممکن است که دارای عملکردهای متفاوتی باشد. براین اساس، انواع و اقسامی از رده‌های مختلفی از لنفوسیت‌های Th1، Th17 (عامل پاتوژن EAE)، Th2 و Threg (عامل بهبوددهنده EAE) را داریم.<sup>۳۳</sup> طبق این گفته‌ها؛ احتمالاً افزایش وزن مختصری که در طحال تیمار کورکومینی مشاهده نمودیم؛ به دلیل افزایش پلاریزاسیون لنفوسیت‌ها به سمت Th2 و Threg بوده است. زیرا در کل کورکومین منجر به بروز نتایج مفید شده است. در گذشته هم پیشنهاد گردید کورکومین از طریق مهار پلاریزه شدن لنفوسیت‌های Th17 موجب کاهش شدت EAE شده است. در این مطالعه نشان داده شده است که تجویز کورکومین موجب کاهش چشمگیر IL-17، TGF- $\beta$ ، IL-6، IL-21 و فسفوریلاسیون STAT3 همراه با کاهش بیان ROR- $\gamma$ t می‌شود.<sup>۳۳</sup>

آنزیم کاتالاز در شرایط حضور آسیب‌های اکسیداتیو در سلول‌ها افزایش پیدا می‌کند. به طوری که متناسب با میزان آسیب‌های وارد شده، سطح بیان آنزیم کاتالاز نیز به عنوان یک راهکار مقابله کننده با استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابد. بنابراین سلول‌هایی که تحت

با توجه به نمودار ۴، کورکومین تاثیر معنی‌داری بر روی میزان هورمون کورتیزول و بازگشت آن به سطح موش‌های صحرایی گروه کنترل داشت ( $P < 0.05$ ). سطح کورتیزول در گروه مبتلا و بدون درمان بسیار افت پیدا کرد؛ ولی سطح آن در گروه تیمار به سطح گروه کنترل برگشت.



نمودار ۴: اثر کورکومین بر سطح کورتیزول موش‌های صحرایی مورد مطالعه  
 $P < 0.05$ \*

نتایج حاصل از آنالیز تکنیک RT-PCR (جدول ۳) و همچنین تصاویر حاصل از الکتروفورز (شکل یک) آشکار کرد که در روز ۲۴ام میزان بیان ژن NGF در گروه مبتلا به EAE به طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه کنترل است ( $P < 0.05$ ). کورکومین، سطح بیان ژن NGF را در گروه تیمار به صورت معنی‌داری بالاتر از گروه مبتلا و حتی گروه کنترل رساند ( $P < 0.05$ ).

| گروه‌ها                              | (Area/GAPDH) NGF |
|--------------------------------------|------------------|
| کنترل                                | ۰/۶              |
| مبتلا به مولتیپل اسکروزیس            | ۰/۴۲             |
| مبتلا به مولتیپل اسکروزیس + کورکومین | ۰/۸۸             |



شکل ۱: باندهای ژن NGF موش‌های صحرایی مورد مطالعه

## بحث

با توجه به نتایج مطالعه، وزن موش‌های صحرایی گروه تیمار شده با کورکومین با گذشت زمان و تا آخرین روز، روندی رو به افزایش داشت؛ ولی گروه مبتلا در روزهای پایانی کاهش وزن پیدا کرده و روندی رو به پایین داشتند که این کاهش وزن به علت بیماری در موش‌های صحرایی گروه مبتلا بود. به نظر می‌رسد که کورکومین توانسته با بهبود بیماری و کاهش شدت آسیب، باعث بالا رفتن وزن موش‌های صحرایی گردد.



NGF می‌کنند. NGF در رشد و نمو دستگاه عصبی، تکوین و تمایز نورون‌ها طی دوره جنینی نقش دارد و باعث بقای نورون‌ها به دنبال بسیاری از آسیب‌های عصبی می‌شود.<sup>۴۰</sup> در بیماری EAE با توجه به داده‌های به‌دست آمده و آنالیز آنها، مشخص شد که مقدار آن در گروه مبتلا کاهش معنی‌دار پیدا کرده است. سطح بیان ژن NGF گروه بیمار شده با کورکومین از سطح گروه کنترل فراتر رفته که به علت جبران کمبود بیان NGF در گروه مبتلایان بدون درمان است؛ اما همان‌طور که به‌نظر می‌رسد کورکومین توانسته است اثر مثبتی بر روی میزان و افزایش بیان این ژن داشته باشد و سطح بیان آن را بهبود بخشد که حاکی از افزایش میزان میلین‌سازی و به تبع آن افزایش سلول‌های شوان است. کاهش سطح بیان NGF طی دمی‌لیناسیون در مطالعات بسیاری از جمله مطالعه Yang و همکاران<sup>۴۱</sup> اثبات شده است و بیان ژن NGF با کاهش دمی‌لیناسیون، به سطح گروه کنترل و طبیعی برمی‌گردد.

مهم‌ترین محدودیت مطالعه حاضر استفاده از تنها یک دوز کورکومین در زمان بعد از شروع علائم درمانگاهی بوده است. مسلماً بهتر است که در آینده برای نتیجه‌گیری مناسب‌تر از دوزهای مختلف کورکومین و در فواصل زمانی دورتری از شروع علائم درمانگاهی استفاده شود. همچنین پیشنهاد می‌گردد که برای بررسی دقیق‌تر اثر کورکومین بر روی بیماری در کنار دوزهای مختلف کورکومین از ترکیب کورکومین با داروهای انتخابی بیماری MS از قبیل اینترفرون بتا، استفاده گردد.

### نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که کورکومین با بهبود بیماری تاثیر مثبتی در افزایش وزن حیوانات مورد بررسی داشته و با اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانتی خود، باعث برگشت سطح آنزیم کاتالاز و کورتیزول و افزایش سطح بیان ژن NGF در مقایسه با موش‌های صحرایی گروه کنترل گردید. لذا کورکومین می‌تواند اثر مثبتی در کاهش شدت بیماری مالتیپل اسکلروزیس القاء شده در مدل حیوانی داشته و روند بیماری را بهبود بخشد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه (شماره کد ۳۷۳-۲ع) خانم لاله مودتیان برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته فیزیولوژی از دانشکده علوم دانشگاه ارومیه بود که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه انجام گردید. نویسندگان تعارض منافی نداشتند.

### References

- Rabiei MM, Cheraghi Z, Ramezani M, Pakdaman H. Migraine Headache as a Presenting Feature of Multiple Sclerosis: A Case Report: Migraine and Multiple Sclerosis. *Int Clin Neurosci J*. 2011; 8(4): 208-11.
- McGinley MP, Goldschmidt CH, Rae-Grant AD. Diagnosis and Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *JAMA*. 2021 Feb; 325(8): 765-79. DOI: 10.1001/jama.2020.26858

آسیب اکسیداتیو هستند؛ احتمالاً در شرایطی که هنوز آسیب منجر به مرگ سلولی نشده است؛ سطح کاتالاز بیشتری نسبت به سلول‌های سالم دارند.<sup>۴۲</sup> در اینجا به‌نظر می‌رسد کورکومین به دلیل اثرات آنتی‌قوی اکسیدانتی، منجر به کاهش نیاز سلول به کاتالاز و برگشت فعالیت آنزیم کاتالاز به حد پایین‌تر در گروه مبتلا و تحت درمان شده است. در گذشته هم نشان داده شده است که افزایش فعالیت کاتالاز در کورتکس موش‌های صحرایی مبتلا به EAE رخ می‌دهد. همچنین گزارش شده است که سیاهدانه از طریق کاهش فعالیت کاتالاز در کاهش شدت علائم EAE در موش‌های صحرایی مبتلا موثر بوده است.<sup>۴۳</sup>

مطالعات گذشته به‌خوبی مشخص کرده است که یکی از دلایل عمده ابتلا به بیماری خودایمنی از جمله MS و مدل تجربی آن EAE، اختلال در محور HPA (Hypothalamus-Pituitary-Adrenal) است.<sup>۴۴</sup> به‌طوری که در مبتلایان به دلیل اختلال در این سیستم سطح مناسبی از کورتیزول به داخل خون ترشح نشده و لذا نمی‌تواند از فعالیت بیش از حد و غیرعادی سیستم ایمنی ممانعت به‌عمل آورد. در افراد سالم در صورت فعالیت اتفاقی سیستم ایمنی در اثر اتوایمنی‌توی، محور HPA فعال شده و با افزایش تولید کورتیزول، سطح فعالیت سیستم ایمنی را به حالت طبیعی برمی‌گرداند.<sup>۴۵</sup> اصولاً افزایش سطح کورتیزول نقش مهمی در انتهای بیماری‌های عفونی برای برگشت سیستم ایمنی به حد پایه بازی می‌کند.<sup>۴۶</sup> براساس نتایج به‌دست آمده به‌نظر می‌رسد که موش‌های صحرایی گروه مبتلا به EAE نسبت به موش‌های صحرایی گروه کنترل، کاهش مشخص و کاملاً معنی‌داری را در سطح کورتیزول سرم نشان داده‌اند. خوشبختانه درمان با کورکومین در این گونه موش‌ها منجر به بازگشت سطح کورتیزول به‌حد طبیعی و در حد موش‌های صحرایی گروه کنترل شده است. به‌عبارتی دیگر کورکومین توانسته است فعالیت محور HPA را که به‌دنبال استرس ناشی از القاء بیماری مهار شده بود؛ به‌حد طبیعی خود بازگرداند. به نحو جالب توجهی در گذشته نشان داده شده است که کورکومین کانال‌های پتاسیمی bTREK-1 را مهار کرده و سطح ترشح کورتیزول را از سلول‌های قشر آدرنال افزایش می‌دهد.<sup>۴۷</sup>

فاکتور رشد عصب ۲ یا NGF، فاکتور اختصاصی برای زنده ماندن نورون‌های حسی و سمپاتیک طی تکامل سیستم عصبی است. به دنبال قطع آکسون، سلول‌های شوان در قطعه انتهایی شروع به تولید

- Małeczka I, Przybek-Skrzypecka J, Kurowska K, Mirowska-Guzel D, Członkowska A. Clinical and laboratory parameters by age for patients diagnosed with multiple sclerosis between 2000 and 2015. *Neurol Neurochir Pol*. 2021; 55(4): 387-93. DOI: 10.5603/PJNNS.a2021.0055
- Adamec I, Krbot Skorić M, Habek M. Peripheral nervous system in multiple sclerosis-understanding the involvement via

- autonomic nervous system. *Neurol Sci.* 2021 Jul; 42(7): 2731-36. DOI: 10.1007/s10072-021-05309-9
5. Kadhim SM, Abbood SM, Taay YM, Mohammed MT. Oxidative Stress in Multiple Sclerosis Disease. *Diyala Journal of Medicine.* 2021; 21(2): 33-40. DOI: 10.26505/DJM.21026040523
  6. Simbrich A, Thibaut J, Khil L, Maximov S, Wiendl H, Berger K; REGIMS Investigators. Chances and Challenges of Registry-Based Pharmacovigilance in Multiple Sclerosis: Lessons Learnt from the Implementation of the Multicenter REGIMS Registry. *Drug Saf.* 2021 Jan; 44(1): 7-15. DOI: 10.1007/s40264-020-01007-1
  7. Mavaddatiyan L, Khezri S, Abtahi Froushani SM. Molecular effects of curcumin on the experimental autoimmune encephalomyelitis. *Vet Res Forum.* 2021; 12(1): 47-52. DOI: 10.30466/vrf.2019.98789.2356
  8. Glatigny S, Bettelli E. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS). *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018 Nov; 8(11): a028977. DOI: 10.1101/cshperspect.a028977
  9. Brambilla R. The contribution of astrocytes to the neuroinflammatory response in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol.* 2019 May; 137(5): 757-83. DOI: 10.1007/s00401-019-01980-7
  10. Khaw YM, Tierney A, Cunningham C, Soto-Díaz K, Kang E, Steelman AJ, et al. Astrocytes lure CXCR2-expressing CD4+ T cells to gray matter via TAK1-mediated chemokine production in a mouse model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021 Feb; 118(8): e2017213118. DOI: 10.1073/pnas.2017213118
  11. Rossi B, Santos-Lima B, Terrabuio E, Zenaro E, Constantin G. Common Peripheral Immunity Mechanisms in Multiple Sclerosis and Alzheimer's Disease. *Front Immunol.* 2021 Feb; 12: 639369. DOI: 10.3389/fimmu.2021.639369
  12. Mehrandish R, Rahimian A, Shahriary A. Heavy metals detoxification: A review of herbal compounds for chelation therapy in heavy metals toxicity. *J Herbm Pharm.* 2019; 8: 69-77. DOI: 10.15171/jhp.2019.12
  13. Abd El-Hack ME, El-Saadony MT, Swelum AA, Arif M, Abo Ghanima MM, Shukry M, et al. Curcumin, the active substance of turmeric: its effects on health and ways to improve its bioavailability. *J Sci Food Agric.* 2021 Nov; 101(14): 5747-62. DOI: 10.1002/jsfa.11372
  14. Gutiérrez-Del-Río I, López-Ibáñez S, Magadán-Corpas P, Fernández-Calleja L, Pérez-Valero Á, Tuñón-Granda M, et al. Terpenoids and Polyphenols as Natural Antioxidant Agents in Food Preservation. *Antioxidants (Basel).* 2021 Aug; 10(8): 1264. DOI: 10.3390/antiox10081264
  15. Ogori AF, Amove J, Aduloju P, Sardo G, Okpala COR, Bono G, et al. Functional and Quality Characteristics of Ginger, Pineapple, and Turmeric Juice Mix as Influenced by Blend Variations. *Foods.* 2021 Mar; 10(3): 525. DOI: 10.3390/foods10030525
  16. Soleimani V, Sahebkar A, Hosseinzadeh H. Turmeric (*Curcuma longa*) and its major constituent (curcumin) as nontoxic and safe substances: Review. *Phytother Res.* 2018 Jun; 32(6): 985-95. DOI: 10.1002/ptr.6054
  17. Wahyuni DSC, Artanti AN, Rinanto Y. Quantitative analysis of Curcuminoid collected from different location in Indonesia by TLC-Densitometry and its antioxidant capacity. *The 12th Joint Conference on Chemistry. IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering.* 2018; 349: 012015. DOI: 10.1088/1757-899X/349/1/012015
  18. Zhao S, Pi C, Ye Y, Zhao L, Wei Y. Recent advances of analogues of curcumin for treatment of cancer. *Eur J Med Chem.* 2019 Oct; 180: 524-35. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.07.034
  19. Hosseini A, Hosseinzadeh H. Antidotal or protective effects of *Curcuma longa* (turmeric) and its active ingredient, curcumin, against natural and chemical toxicities: A review. *Biomed Pharmacother.* 2018 Mar; 99: 411-21. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.01.072
  20. Stohs SJ, Chen O, Ray SD, Ji J, Bucci LR, Preuss HG. Highly Bioavailable Forms of Curcumin and Promising Avenues for Curcumin-Based Research and Application: A Review. *Molecules.* 2020 Mar; 25(6): 1397. DOI: 10.3390/molecules25061397
  21. Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice. *Cancer Res Treat.* 2014 Jan; 46(1): 2-18. DOI: 10.4143/crt.2014.46.1.2
  22. Nouredin SA, El-Shishtawy RM, Al-Footy KO. Curcumin analogues and their hybrid molecules as multifunctional drugs. *Eur J Med Chem.* 2019 Nov; 182: 111631. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.111631
  23. Zokhtareh R, Rahimnejad M. An investigation of new electrochemical sensors for curcumin detection: a mini review. *Analytical Methods.* 2019; 11(35): 4401-409. DOI: 10.1039/C9AY01352K
  24. Khezri S, Abtahi Froushani SM, Shahmoradi M. Nicotine Augments the Beneficial Effects of Mesenchymal Stem Cell-based Therapy in Rat Model of Multiple Sclerosis. *Immunol Invest.* 2018 Feb; 47(2): 113-24. DOI: 10.1080/08820139.2017.1391841
  25. Chen GQ, Chen YY, Wang XS, Wu SZ, Yang HM, Xu HQ, et al. Chronic caffeine treatment attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis induced by guinea pig spinal cord homogenates in Wistar rats. *Brain Res.* 2010 Jan; 1309: 116-25. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.10.054
  26. Skundric DS, Zakarian V, Dai R, Lisak RP, Tse HY, James J. Distinct immune regulation of the response to H-2b restricted epitope of MOG causes relapsing-remitting EAE in H-2b/s mice. *J Neuroimmunol.* 2003 Mar; 136(1-2): 34-45. DOI: 10.1016/s0165-5728(03)00005-5
  27. Park EJ, Jeon CH, Ko G, Kim J, Sohn DH. Protective effect of curcumin in rat liver injury induced by carbon tetrachloride. *J Pharm Pharmacol.* 2000 Apr; 52(4): 437-40. DOI: 10.1211/0022357001774048
  28. Bendou O, Gutiérrez-Fernández I, Marcos-Barbero EL, Buenoramos N, González-Hernández AI, Morcuende R, et al. Theoretical and Experimental Considerations for a Rapid and High Throughput Measurement of Catalase In Vitro. *Antioxidants (Basel).* 2021 Dec; 11(1): 21. DOI: 10.3390/antiox11010021
  29. Pluta R, Ułamek-Kozioł M, Czuczwar SJ. Neuroprotective and Neurological/Cognitive Enhancement Effects of Curcumin after Brain Ischemia Injury with Alzheimer's Disease Phenotype. *Int J Mol Sci.* 2018 Dec; 19(12): 4002. DOI: 10.3390/ijms19124002
  30. Abdel-Diam MM, Samak DH, El-Sayed YS, Aleya L, Alarifi S, Alkhahtani S. Curcumin and quercetin synergistically attenuate subacute diazinon-induced inflammation and oxidative neurohepatic damage, and acetylcholinesterase inhibition in albino rats. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2019 Feb; 26(4): 3659-65. DOI: 10.1007/s11356-018-3907-9
  31. Seyedzadeh MH, Safari Z, Zare A, Gholizadeh Navashenaq J, Razavi SA, Kardar GA, et al. Study of curcumin immunomodulatory effects on reactive astrocyte cell function. *Int Immunopharmacol.* 2014 Sep; 22(1): 230-35. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.06.035
  18. Zhao S, Pi C, Ye Y, Zhao L, Wei Y. Recent advances of



32. Feng J, Tao T, Yan W, Chen CS, Qin X. Curcumin inhibits mitochondrial injury and apoptosis from the early stage in EAE mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014: 728751. DOI: 10.1155/2014/728751
33. DiToro D, Harbour SN, Bando JK, Benavides G, Witte S, Laufer VA, et al. Insulin-Like Growth Factors Are Key Regulators of T Helper 17 Regulatory T Cell Balance in Autoimmunity. *Immunity*. 2020 Apr; 52(4): 650-667.e10. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.03.013
34. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 2000 Nov; 153(1-3): 83-104. DOI: 10.1016/s0300-483x(00)00306-1
35. Fahmy HM, Noor NA, Mohammed FF, Elsayed AA, Radwan NM. *Nigella sativa* as an anti-inflammatory and promising remyelinating agent in the cortex and hippocampus of experimental autoimmune encephalomyelitis-induced rats. *The Journal of Basic & Applied Zoology*. 2014; 67(5): 182-95. DOI: 10.1016/j.jobaz.2014.08.005
36. Doolin K, Farrell C, Tozzi L, Harkin A, Frodl T, O'Keane V. Diurnal Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Measures and Inflammatory Marker Correlates in Major Depressive Disorder. *Int J Mol Sci*. 2017 Oct; 18(10): 2226. DOI: 10.3390/ijms18102226
37. Deckx N, Lee WP, Berneman ZN, Cools N. Neuroendocrine immunoregulation in multiple sclerosis. *Clin Dev Immunol*. 2013; 2013: 705232. DOI: 10.1155/2013/705232
38. Herman JP, McKlveen JM, Ghosal S, Kopp B, Wulsin A, Makinson R, et al. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Compr Physiol*. 2016 Mar; 6(2): 603-21. DOI: 10.1002/cphy.c150015
39. Enyeart JA, Liu H, Enyeart JJ. Curcumin inhibits bTREK-1 K<sup>+</sup> channels and stimulates cortisol secretion from adrenocortical cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Jun; 370(4): 623-28. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.04.001
40. Mesentier-Louro LA, Rosso P, Carito V, Mendez-Otero R, Santiago MF, Rama P, et al. Nerve Growth Factor Role on Retinal Ganglion Cell Survival and Axon Regrowth: Effects of Ocular Administration in Experimental Model of Optic Nerve Injury. *Mol Neurobiol*. 2019 Feb; 56(2): 1056-69. DOI: 10.1007/s12035-018-1154-1
41. Yang X, Zhiyu L, Shujiang Z, Ting L, Zuoxiao L. Effects of recombinant adeno-associated virus mediated nerve growth factor gene transfection on oligodendrocyte apoptosis and myelination in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*. 2021; 25(23): 3678. DOI: 10.12307/2021.039