

بررسی تأثیر نانوذرات کورکومین و بتانین بر پاسخ آنتی‌اکسیدانسی و التهابی در رت‌های مبتلا به ایسکمی / خون‌رسانی مجدد مغز

یلدا ساغری^۱، منیره موحدی^۱، مجید تیبانیان^۲، ملیحه انتظاری^{۳*}

مقاله پژوهشی

مقدمه: محصولات طبیعی به دلیل عوارض کم می‌تواند در درمان بسیاری از بیماری‌ها کمک‌کننده باشند. در مطالعه حاضر اثر پیش‌تیمار با نانوبتانین و نانو کورکومین در موش‌های ایسکمی مغزی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: مطالعه حاضر از نوع تجربی بود. ۴۰ موش صحرایی نر نژاد ویستار در هشت گروه کنترل سالم، حیوانات سالم دریافت‌کننده نانوبتانین، سالم دریافت‌کننده نانو کورکومین، سالم دریافت‌کننده نانوبتانین+نانو کورکومین، I/R مغزی، I/R مغزی دریافت‌کننده نانوبتانین، I/R مغزی دریافت‌کننده نانو کورکومین و I/R مغزی دریافت‌کننده نانوبتانین+نانو کورکومین تقسیم شدند. تجویز خوراکی نانوبتانین و نانو کورکومین پنج‌روز قبل از القای انسداد دوطرفه شریان کاروتید مشترک (Bilateral Common Carotid Artery Occlusion) در رت‌ها شروع شد و به مدت سه روز پس از آن ادامه یافت. نمرات اختلالات عصبی ارزیابی شد. پس از تهیه هموزن مغز، شدت استرس اکسیداتیو، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و بیان سیتوکین‌های اینترلوکین-۱ (IL-1 β)، اینترلوکین ۶ (IL-6) و فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF- α) توسط کیت‌های مربوطه اندازه‌گیری شد. آنالیز داده‌ها در نرم‌افزار GraphPad prism V.8 انجام شد.

نتایج: نانوبتانین و نانو کورکومین اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی قوی در موش‌های ایسکمی/خون‌رسانی مجدد (I/R) مغزی نشان دادند. محتوی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در مغز رت‌های I/R مغزی دریافت‌کننده نانوبتانین و نانو کورکومین کاهش (P=0.00001) و فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی همچون سوپر اکسید دیسمیوتاز (P=0.00002) بهبود یافت و محتوی گلوتاتیون احیاء (P=0.0004) روندی افزایشی نشان داد. کاهش نمرات اختلالات عصبی (P=0.009) در موش‌های صحرایی I/R مغزی دریافت‌کننده نانوبتانین و نانو کورکومین مشاهده شد. همچنین، تجویز نانوبتانین و نانو کورکومین سطوح بیان سایتوکاین‌های التهابی IL-1 β (P=0.00003)، IL-6 (P=0.00006)، TNF- α (P=0.008) را در رت‌های دچار آسیب I/R مغزی کاهش داد.

نتیجه‌گیری: نانوبتانین و نانو کورکومین به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی دارای اثرات محافظت عصبی در شرایط I/R مغزی است که می‌تواند به‌عنوان یک گزینه کمک درمانی مناسب در شرایط سکتة مغزی در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: بتانین، کورکومین، ایسکمی، موش صحرایی

ارجاع: ساغری یلدا، موحدی منیره، تیبانیان مجید، انتظاری ملیحه. بررسی تأثیر نانوذرات کورکومین و بتانین بر پاسخ آنتی‌اکسیدانسی و التهابی در رت‌های مبتلا به ایسکمی /خون‌رسانی مجدد مغز. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۲؛ ۳۱ (۳): ۳۶-۶۵۲۶.

۱- گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

۲- گروه بیوتکنولوژی، مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران.

۳- گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی، تهران، ایران.

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۲۲۹۶۵۸۶۱، پست الکترونیکی: maliheh.entezari2021@gmail.com، صندوق پستی: ۱۶۵۱۱۵۳۳۱۱

ایسکمیک نشان داده‌اند (۱۲). با این حال، به نظر می‌رسد که سد خونی مغزی (BBB) از رسیدن کورکومین آزاد به مغز و اعمال اثرات آن جلوگیری می‌کند و فراهمی زیستی این ترکیب را در مغز کاهش می‌دهد (۱۳). برای غلبه بر BBB، فرمولاسیون نانوذرات کورکومین می‌تواند راه حلی باشد و گفته شده است که نانوذرات کورکومین می‌توانند بر این مانع غلبه کرده و غلظت کورکومین را در مغز افزایش دهند. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و محافظت عصبی نانوذرات کورکومین و بتانین در در رت‌های مبتلا به آسیب ایسکمیک/خون‌رسانی مجدد مغز بود.

روش بررسی

تهیه حیوانات: موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم) از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. شرایط محیطی 25 ± 1.5 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ درصد با چرخه ۱۲ ساعته تاریکی/نور برای نگهداری حیوانات استفاده شد. سازگاری حیوانات با شرایط آزمایشگاهی قبل از شروع آزمایش به مدت یک هفته انجام شد.

مواد: نانوذرات بتانین و کورکومین از شرکت نانو اکسیر سینا، ایران تهیه شد. دیگر مواد از درجه تحلیلی و از شرکت مرک، آلمان، تهیه شدند.

القاء آسیب ایسکمیک خون‌رسانی مجدد مغز در رت‌ها: القای سکتة مغزی با روش انسداد دوطرفه شریان کاروتید مشترک (Bilateral Common Carotid Artery Occlusion) انجام شد. ابتدا موش‌ها با کتامین (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۸-۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش شدند و یک برش ساژیتال از خط وسط گردن (طول ۱ سانتی‌متر) ایجاد شد و سپس هر دو شریان کاروتید بادقت از شریان مربوطه جدا شدند. واگ عصبی یک حلقه بخیه ابریشم ۵-۰ در اطراف هر شریان کاروتید مشترک ایجاد شد و سپس CCAها به مدت ۳۰ دقیقه با سفت کردن نخ‌های ابریشمی مسدود شدند. پس از بازگشایی هر دو CCA، یک دوره خون‌رسانی مجدد پنج‌دقیقه‌ای آغاز شد. پس از خون‌رسانی مجدد، زخم‌ها بخیه شدند. در طی این دوره، حیوانات از نظر دمای رکتوم ۳۷ درجه سانتی‌گراد،

سکتة مغزی یکی از علل اصلی مرگ و میر در جهان است و بسیاری از افراد ممکن است در مقطعی از زندگی خود آن را تجربه کنند (۱). کاهش شدید یا قطع موقت جریان خون در ناحیه‌ای از مغز باعث ایسکمیک می‌شود و پس از مدت کوتاهی سلول‌های ناحیه مرکزی از بین می‌روند، اما سلول‌های اطراف، به دلیل دریافت خون از نواحی مجاور، بیشتر زنده می‌مانند (۲). آسیب ایسکمیک/خون‌رسانی مجدد (I/R) مغز باعث افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود، عملکرد میتوکندری را مختل می‌کند و باعث تخریب عصبی می‌شود (۳). در عین حال، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت‌های بالای ROS به شدت کاهش می‌یابد و پراکسیداسیون لیپیدی و اکسیداسیون پروتئین‌ها و DNA آغاز می‌شود. تحقیقات نشان داده است که اگر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی همزمان با جریان خون کافی در ناحیه ایسکمیک استفاده شود، بیمار عوارض کمتری از آسیب (I/R) را تجربه خواهد کرد (۴). بتانین، زیر مجموعه‌ای از خانواده بتاسیانین، ترکیبی از گیاه *Beta vulgaris var. rubra* به دلیل داشتن گروه‌های آمین فنلی و حلقوی، خواص آنتی‌اکسیدانی و مهارکنندگی ROS خوبی دارد (۵). اثرات محافظتی بتانین در آسیب ایسکمیک-پرفیوژن مجدد طناب نخاعی (۶) و آسیب ایسکمیک-پرفیوژن مجدد ژژنوم (۷) گزارش شده است. هیچ مطالعه‌ای در مورد اثر بتانین بر آسیب مغزی I/R انجام نشده است. با این حال، اثر محافظت عصبی بتانین در تخریب عصبی ناشی از تری متیل‌تین (trimethyltin) در موش نشان داده شده است (۸). کورکومین ($C_{21}H_{20}O_6$) ماده فعال ریزوم گیاه زردچوبه *Curcuma longa* است و گزارش‌های زیادی در مورد نقش آنتی‌اکسیدانی آن وجود دارد (۹). بیان شده است که این ترکیب با از بین بردن فعالیت گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) نقش مهمی در محافظت در برابر آسیب اکسیداتیو ایفا می‌کند (۱۰). اثر آنتی‌اکسیدانی این ترکیب به گروه‌های فنلی یا گروه CH_2 از قسمت β -دیکتون نسبت داده شده است (۱۱). مطالعات اثرات محافظت کننده عصبی کورکومین را در برابر آسیب مغزی

آن به عنوان درصد استفاده شد (۱۶). اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز، گلووتیاتیون احیاء و سوپر اکسید دیسمیوتاز: اندازه‌گیری محتوای GSH بر اساس روش Jollow و همکاران انجام شد (۱۷) فعالیت SOD با روش (۱۸) و فعالیت CAT با روش Greenwald (۱۹) برآورد شد.

اندازه‌گیری سطوح سیتوکاین‌های التهابی: از تکنیک الیزا برای اندازه‌گیری سطوح سیتوکین‌های التهابی $IL-1\beta$ ، TNF- α و IL-6 طبق دستورالعمل سازنده استفاده شد. برای بررسی بیان این پروتئین‌ها از کیت‌های BioLegend، Mybiosource و Abcam استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism V.8 انجام شد. از آنالیز واریانس یک‌راهه (ANOVA) برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. داده‌ها به صورت انحراف معیار میانگین بیان شدند.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر، توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی به شماره کد IR.IAU.TNB.REC.1400.022 مورد تأیید قرار گرفت.

نتایج

نمرات اختلالات نورولوژیکی: القاء آسیب ایسکمی خون‌رسانی مجدد مغز منجر افزایش نمرات اختلالات نورولوژیکی در مقایسه با کنترل سالم شد. با این وجود، تجویز نانوبتانین و ترکیب نانوبتانین+نانو کورکومین پنج‌روز قبل از القاء بیماری و سه روز پس از آن منجر به کاهش معنی‌دار در این شاخص در مقایسه با کنترل منفی (رت‌های I/R) شد (نمودار ۱). هیچ تفاوت معنی‌داری در نمرات اختلالات نورولوژیکی در رت‌های سالم دریافت‌کننده نانوبتانین، نانو کورکومین یا ترکیب آن دو در مقایسه با کنترل سالم مشاهده نشد؛ بنابراین، به نظر می‌رسد که نانوبتانین و نانو کورکومین اثرات محافظت از نورونی در شرایط آسیب ایسکمی خون‌رسانی مجدد مغز دارند.

رفلکس قرنیه در مواجهه با نور و حفظ مردمک‌های گشاد شده مورد بررسی قرار گرفتند. حیواناتی که این معیارها را نداشتند یا تشنج داشتند از مطالعه حذف شدند. سه روز پس از القای I/R مغزی، حیوانات برای جداسازی مغزشان در ابتدا بی‌هوش و سپس کشته شدند.

گروه‌بندی حیوانات: در مجموع از ۸۰ موش صحرایی در مطالعه حاضر استفاده شد و به ۸ گروه تقسیم شدند: (I) رت‌های کنترل سالم، (II) رت‌های سالم دریافت‌کننده بتانین، (III) رت‌های سالم دریافت‌کننده کورکومین، (IV) رت‌های I/R مغزی، (V) رت‌های I/R مغزی دریافت‌کننده نانوبتانین (۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم)، (VI) رت‌های I/R مغزی دریافت‌کننده نانو کورکومین و نانوبتانین (۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، (VII) رت‌های سالم دریافت‌کننده نانو کورکومین و نانوبتانین (۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، (VIII) رت‌های I/R مغزی دریافت‌کننده ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو بتانین و کورکومین. تجویز بتانین و کورکومین آزاد و نانو کورکومین و بتانین ۵ روز قبل از القای I/R مغزی شروع شد و تا سه روز پس از BCCAO ادامه یافت.

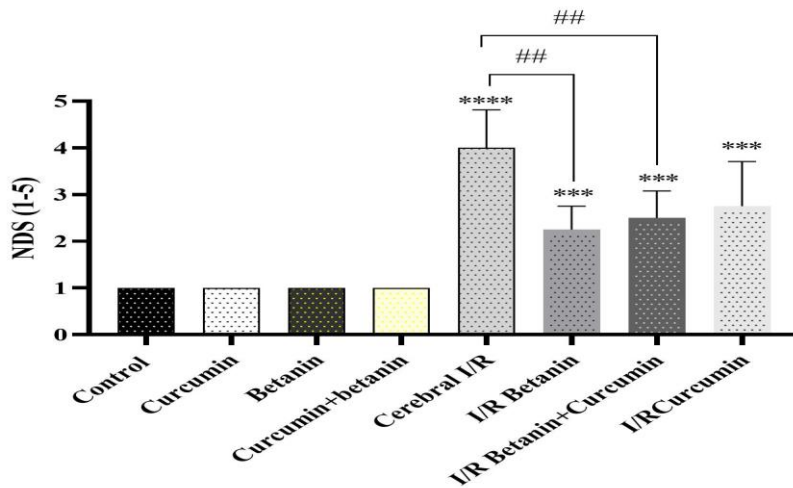
نمرات اختلالات نورولوژیکی: ۲۴ ساعت پس از القای I/R مغزی، نمرات اختلالات عصبی (NDS) با استفاده از آزمون پنج نقطه‌ای ارزیابی شد و به حیوانات امتیاز ۱ تا ۵ داده شد. به رت‌هایی که هیچ‌گونه اختلال در حرکت را نشان ندادند، نمره ۱ داده شد. نمره ۲ به حیواناتی داده شد که هنگام آویزان شدن از دم (flexion) به سمت مخالف نیمکره ایسکمیک خم شدند. نمره ۳ به حیواناتی داده شد که در ابتدای حرکت روی یک سطح صاف به سمت نیمکره ایسکمیک چرخیدند و موش‌هایی که رفلکس ایستادن را از دست دادند نمره ۴ گرفتند. به حیوانات بدون هیچ حرکتی نمره ۵ داده شد (۱۴).

اندازه‌گیری سطوح پراکسیداسیون لیپید و ROS: محتوای مالون دی آلدئید (MDA) به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی بر اساس روش Dhindsa و همکاران (۱۹۸۱) تعیین شد (۱۵). تبدیل H2DCFDA به DCFDA توسط طیف‌سنج‌های ۴۹۹ نانومتر و ۵۲۰ نانومتر به عنوان شاخصی برای اندازه‌گیری سطوح ROS در میتوکندری‌های مغز پس از نرمال‌سازی و بیان

است. باین وجود، نانوبتاین، نانو کورکومین و یا ترکیب آن‌ها منجر به افزایش سطح گلوتاتیون احیاء در مغز رت‌های دچار آسیب I/R مغزی در مقایسه با گروه کنترل منفی شد (نمودار ۳c) که نشان‌دهنده بهبود در ظرفیت آنتی‌اکسیداتی مغز است. سطوح سیتوکاین‌های التهابی: IL-1 β : القاء آسیب ایسکمی خون‌رسانی مجدد منجر به افزایش تقریباً سه برابری در سطوح بیان IL-1 β در مغز رت‌ها در مقایسه با گروه کنترل سالم شد که نشان‌دهنده افزایش التهاب می‌باشد. باین وجود، کاهش در سطوح بیان این سیتوکاین در رت‌های دریافت‌کننده نانوبتاین، نانو کورکومین یا ترکیب هر دوی آن‌ها در مقایسه با رت‌های گروه کنترل منفی مشاهده شد که نشان‌دهنده اثرات ضدالتهابی این ترکیبات است. نتایج هم‌چنین نشان داد که ترکیب نانو کورکومین+نانوبتاین در کاهش سطوح سیتوکاین IL-1 β بیشترین اثر را دارد (نمودار 4a). القاء آسیب ایسکمی خون‌رسانی مجدد منجر به افزایش معنی‌دار در بیان سیتوکاین TNF- α در مغز رت‌ها در مقایسه با گروه کنترل سالم شد که نشان‌دهنده افزایش التهاب می‌باشد. باین وجود، کاهش در سطوح بیان این سیتوکاین در رت‌های دریافت‌کننده نانوبتاین، نانو کورکومین یا ترکیب هر دوی آن‌ها در مقایسه با رت‌های گروه کنترل منفی مشاهده شد که نشان‌دهنده اثرات ضدالتهابی این ترکیبات است (نمودار 4b). القاء آسیب I/R مغز منجر به افزایش معنی‌دار در بیان سیتوکاین IL-6 در مغز رت‌ها در مقایسه با گروه کنترل سالم شد که نشان‌دهنده افزایش التهاب می‌باشد. باین وجود، کاهش در سطوح بیان این سیتوکاین در رت‌های دریافت‌کننده نانوبتاین، نانو کورکومین یا ترکیب هر دوی آن‌ها در مقایسه با رت‌های گروه کنترل منفی مشاهده شد که نشان‌دهنده اثرات ضدالتهابی این ترکیبات است (نمودار 4c).

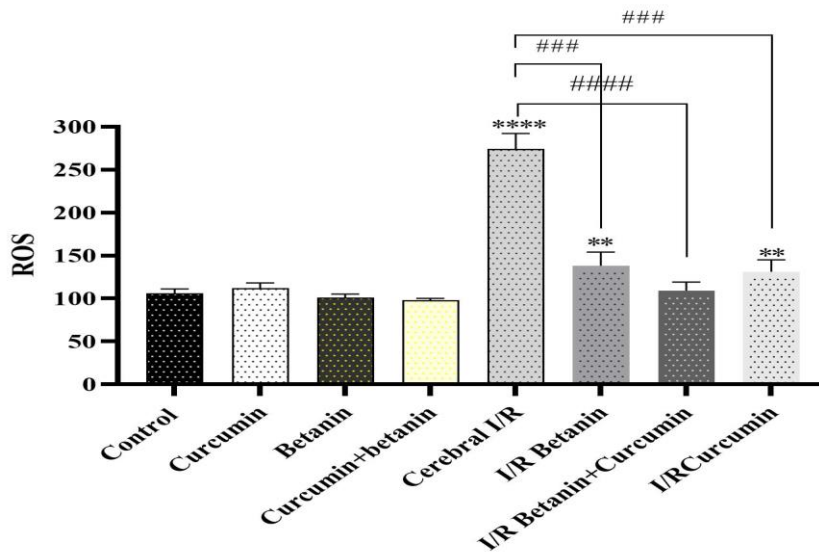
محتوی ROS: یافته‌های مطالعه حاضر حاکی از این بود که آسیب ایسکمی خون‌رسانی مجدد مغز منجر به افزایش تنش اکسیداتیو در مغز می‌گردد، به طوری‌که افزایش ۲/۵ برابری در محتوی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در رت‌های دچار آسیب I/R مغزی در مقایسه با رت‌های گروه کنترل سالم مشاهده شد ($P < 0.0001$). باین وجود، کاهش معنی‌دار محتوی ROS در رت‌های دریافت‌کننده نانو کورکومین، نانوبتاین و یا ترکیب هر دوی آن‌ها به مدت ۵ روز قبل از القاء بیماری و سه روز پس از آن در مقایسه با گروه کنترل منفی مشاهده شد. قوی‌ترین تأثیر کاهش محتوی ROS در تیمار ترکیبی نانوبتاین+نانو کورکومین در رت‌های I/R مغزی دیده شد (نمودار ۲). بنابراین، نانو کورکومین و نانوبتاین با اثرات آنتی‌اکسیداتی قوی منجر به کاهش تنش اکسیداتیو در شرایط آسیب ایسکمی خون‌رسانی مجدد مغز می‌شوند.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتی: کاهش در فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیداتی سوپر اکسید دیسمیوتاز در مغز رت‌ها در شرایط آسیب ایسکمی خون‌رسانی مجدد در مقایسه با گروه کنترل سالم مشاهده شد (نمودار 3a). باین وجود، نانوبتاین، نانو کورکومین و یا ترکیب آن‌ها منجر به افزایش سطح فعالیت این آنزیم در مغز رت‌های دچار آسیب I/R مغزی در مقایسه با گروه کنترل منفی شد. کاهش فعالیت در فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیداتی کاتالاز در مغز رت‌ها در شرایط آسیب ایسکمی خون‌رسانی مجدد در مقایسه با گروه کنترل سالم مشاهده شد (نمودار 3). باین وجود، نانوبتاین، نانو کورکومین و یا ترکیب آن‌ها منجر به افزایش سطح فعالیت این آنزیم در مغز رت‌های دچار آسیب I/R مغزی در مقایسه با گروه کنترل منفی شد (نمودار 3b). کاهش شدید در محتوی گلوتاتیون احیاء در مغز رت‌های دچار آسیب I/R مغزی در مقایسه با گروه کنترل سالم مشاهده شد که نشان‌دهنده کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیداتی مغز



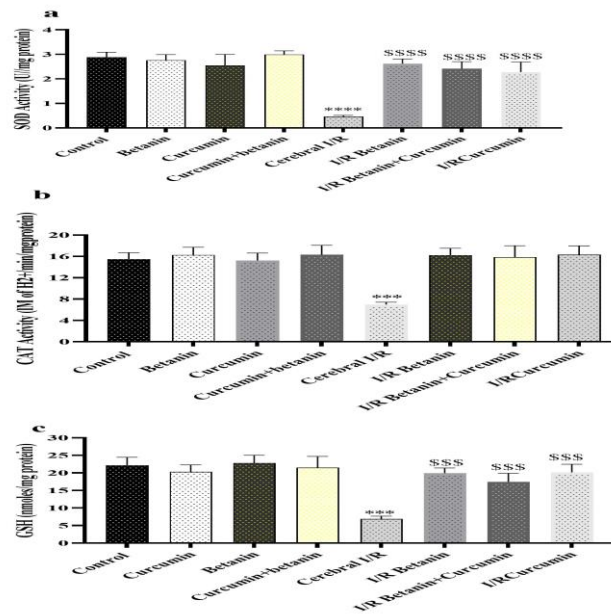
نمودار ۱: تأثیر تجویز نانو کورکومین، نانوبتانین و ترکیب آن‌ها روی نمرات اختلالات نورولوژیکی در شرایط آسیب ایسکمی خون‌رسانی مجدد مغز در مدل رت. نانوبتانین و نانو کورکومین ۵ روز قبل از القاء بیماری و سه روز پس از آن تجویز شد.

*** و **** نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل سالم در سطح احتمال $P < 0.0001$ و $P < 0.001$ می‌باشد. ### نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل منفی در سطح احتمال $P < 0.01$ است.

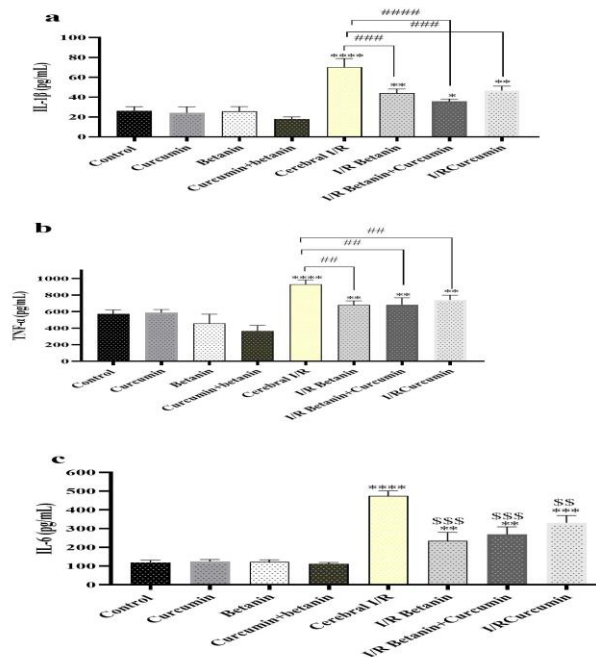


نمودار ۲: تأثیر تجویز نانو کورکومین، نانوبتانین و ترکیب آن‌ها روی محتوی ROS مغز در شرایط آسیب ایسکمی خون‌رسانی مجدد مغز در مدل رت. نانوبتانین و نانو کورکومین ۵ روز قبل از القاء بیماری و سه روز پس از آن تجویز شد.

**** و *** نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل سالم در سطح احتمال $P < 0.0001$ و $P < 0.01$ می‌باشد. ##### و ### نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل منفی در سطح احتمال $P < 0.0001$ و $P < 0.001$ است.



نمودار ۳: تأثیر تجویز نانو کورکومین، نانوبتاین و ترکیب آن‌ها روی فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسمیوتاز (a)، کاتالاز (b) و محتوی گلوکوتاتیون احیاء مغز در شرایط آسیب ایسکمی خون‌رسانی مجدد مغز در مدل رت. نانوبتاین و نانو کورکومین ۵ روز قبل از القاء بیماری و سه روز پس از آن تجویز شد. **** و ***** به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل سالم در سطح احتمال $P < 0.0001$ و $P < 0.001$ می‌باشد. \$\$\$ و \$\$\$\$ به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل مثبت در سطح احتمال $P < 0.001$ و $P < 0.0001$ می‌باشد.



نمودار ۴: تأثیر تجویز نانو کورکومین، نانوبتاین و ترکیب آن‌ها روی سطوح بیان سیتوکاین‌های IL-1β (a)، TNF-α (b) و IL-6 (c) مغز در شرایط آسیب ایسکمی خون‌رسانی مجدد مغز در مدل رت. نانوبتاین و نانو کورکومین ۵ روز قبل از القاء بیماری و سه روز پس از آن تجویز شد. *****, ****, ** و * نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل سالم در سطح احتمال $P < 0.0001$, $P < 0.01$ و $P < 0.05$ می‌باشد. #####, ####, ### و ## نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل مثبت در سطح احتمال $P < 0.0001$, $P < 0.001$ و $P < 0.01$ می‌باشد.

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که نانوذرات بتانین و کورکومین دارای اثرات محافظت عصبی در آسیب I/R مغزی است. همچنین اثرات قوی در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از I/R مغزی در موش‌ها نشان داد و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند SOD و CAT را بهبود بخشید و همچنین محتوای GSH را افزایش داد. القای استرس اکسیداتیو در آسیب I/R مغزی در بسیاری از مطالعات گزارش شده است (۲۰) و بنابراین تجویز ترکیبات آنتی‌اکسیدانی برای کاهش اثرات کشنده آن در نظر گرفته شده است (۲۱). در مطالعه حاضر نانوکورکومین و بتانین توانستند تا حد زیادی از تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد جلوگیری کند و به نظر می‌رسد این ترکیبات دارای اثر آنتی‌اکسیدانی قوی هستند. این را می‌توان به اندازه کوچکتر و توانایی آن‌ها در عبور از مانع خونی مغزی (BBB) نسبت داد (۸). بنابراین، برای کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از آسیب I/R مغزی، می‌توان از نانوبتانین و کورکومین به عنوان یک گزینه درمانی مناسب استفاده کرد. محتوای ROS درون سلولی به شدت بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تأثیر می‌گذارد و محتوای بالای آن می‌تواند منجر به غیرفعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و مصرف سریع آنتی‌اکسیدان‌های داخلی شود (۲۲). به دلیل سطوح بالای اسیدهای چرب اشباع نشده چندانگانه (polyunsaturated fatty acids)، مغز به استرس اکسیداتیو بسیار حساس است و در نتیجه مقادیر زیادی پراکسیداسیون لیپیدی ایجاد می‌کند (۲۳). در مطالعه حاضر مشاهده شد که آسیب I/R مغزی باعث افزایش تولید ROS و در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدی به شدت افزایش یافت. با این حال، هنگامی که نانوبتانین و کورکومین به موش‌ها داده شد، محتوای ROS و پراکسیداسیون لیپیدی در مغز به شدت کاهش یافت، که نشان‌دهنده اثر آنتی‌اکسیدانی قوی آن‌ها است. به نظر می‌رسد که تولید بیش از حد ROS در آسیب I/R مغزی به دلیل کاهش فعالیت آنزیم‌های CAT (پاک کننده رادیکال‌های H_2O_2) و SOD (پاک کننده رادیکال‌های سوپراکسید) و همچنین کاهش محتوای GSH باشد (۲۴). نشان داده شده است که القای I/R مغزی باعث افزایش التهاب و تولید سیتوکین‌های پیش التهابی در مغز

می‌شود که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. در این میان، NF-kB نقش مهمی در تنظیم بیان سیتوکین‌های التهابی مانند IL-1، IL-6 و TNF- α ایفا می‌کند (۲۵). تولید این سیتوکین‌ها مسیر JAK2 / STAT3 را فعال می‌کند و در نتیجه پاسخ‌های التهابی را تشدید می‌کند (۲۶). بنابراین، در مطالعه حاضر، بیان بیش از حد سیتوکین‌های التهابی IL-1، IL-6 و TNF- α در شرایط آسیب ایسکمی خون‌رسانی مجدد مغز را می‌توان به افزایش بیان NF-kB نسبت داد. با این حال، تجویز نانوکورکومین و نانوبتانین بیان تمام این سیتوکین‌های التهابی را در شرایط I/R مغزی کاهش داد که نشان‌دهنده اثرات ضد التهابی قوی این ترکیب است. اثرات محافظت از نورون کورکومین و بتانین در شرایط I/R مغزی که در مطالعه حاضر مشاهده شد مطابق با یافته‌های دیگر مطالعات در این زمینه است. به عنوان مثال، مو و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که کورکومین اثرات محافظت از نورون در I/R مغزی داشته و این اثرات را با اثرگذاری بر سیگنالینگ پروتئین کیناز C تا اعمال می‌کند (۲۷). همچنین، هانگ و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که کورکومین اثرات محافظت از نورون در شرایط I/R مغزی را با اثرگذاری بر مسیر اتوفازای و التهاب اعمال می‌کند (۲۸). کاهش التهاب مغزی نیز در پژوهش حاضر دیده شد. اخیراً، لی و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند که بتانین از رت‌ها در برابر آسیب ایسکمی خون‌رسانی مجدد محافظت می‌کند (۲۹) که مطابق با یافته‌های مطالعه حاضر است. در پژوهش حاضر نشان داده شد که ترکیب نانوکورمین و نانوبتانین در کاهش آسیب ناشی از آسیب I/R مغزی مؤثر است که از نوآوری تحقیق می‌باشد. از محدودیت‌های تحقیق حاضر می‌توان به استفاده از مدل حیوانی اشاره کرد که برای تأیید اثرات محافظتی ترکیبات مورد بررسی نیاز به مطالعات بالینی می‌باشد. همچنین، اندازه نمونه بزرگتر در مطالعات آینده توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر اثر پیش تیمار با نانوبتانین و نانو کورکومین بر آسیب I/R مغزی در موش‌های صحرایی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاکی از اثرات مثبت آن‌ها بر کاهش

سپاس‌گزاری

این مقاله حاصل از رساله دکتری یلدا ساغری به استاد راهنمایی اول دکتر ملیحه انتظاری در دانشگاه آزاد اسلامی - واحد تهران شمال است. از کلیه پرسنل انیستیتو پاستور که در انجام این پژوهش یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌گردد.
حامی مالی: ندارد.
تعارض منافع: وجود ندارد.

استرس اکسیداتیو، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش التهاب در مغز بود. همچنین، این ترکیبات منجر به کاهش نمره اختلالات نورولوژیکی در رت‌های I/R شد که نشان‌دهنده اثرات محافظت از نورونی این ترکیبات می‌باشد. به‌طور کلی، نتیجه‌گیری می‌شود که نانوبتائین و نانو کورکومین به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی، اثرات محافظت‌کننده عصبی قوی در شرایط I/R مغزی دارد و می‌تواند به‌عنوان یک گزینه کمک درمانی مناسب در شرایط سکتة مغزی در نظر گرفته شود.

References:

- 1-Pérez-Asensio FJ, Hurtado O, Burguete MC, Moro MA, Salom JB, Lizasoain I, et al. *Inhibition of Inos Activity by 1400W Decreases Glutamate Release and Ameliorates Stroke outcome after Experimental Ischemia*. Neurobiol Dis 2005; 18(2): 375-84.
- 2-Zhao G, Zhang W, Li L, Wu S, Du G. *Pinocembrin Protects the Brain Against Ischemia-Reperfusion Injury and Reverses the Autophagy Dysfunction in the Penumbra Area*. Molecules 2014; 19(10): 15786-98.
- 3-Li L, Xiao L, Hou Y, He Q, Zhu J, Li Y, et al. *Sestrin2 Silencing Exacerbates Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury By Decreasing Mitochondrial Biogenesis through the AMPK/PGC-1 α Pathway in Rats*. Sci Rep 2016; 6: 30272.
- 4-Radak D, Resanovic I, Isenovic ER. *Link between Oxidative Stress and Acute Brain Ischemia*. Angiology 2014; 65(8): 667-76.
- 5-Azeredo HMC. *Betalains: Properties, Sources, Applications, and Stability – A Review*. International Journal of Food Science & Technology 2009; 44(12): 2365-76.
- 6-Tural K, Ozden O, Bilgi Z, Kubat E, Ermutlu CS, Merhan O, et al. *The Protective Effect of Betanin and Copper on Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury*. The Journal of Spinal Cord Medicine 2021; 44(5): 704-10.
- 7-Toth S, Jonecova Z, Marettta M, Curgali K, Kalpakidis T, Pribula M, et al. *The Effect of Betanin Parenteral Pretreatment on Jejunal and Pulmonary Tissue Histological Architecture and Inflammatory Response after Jejunal Ischemia-Reperfusion Injury*. Experimental and Molecular Pathology 2019; 110: 104292.
- 8-Thong-asa W, Prasartsri S, Klomkleaw N, Thongwan N. *The Neuroprotective Effect of Betanin in Trimethyltin-Induced Neurodegeneration in Mice*. Metabolic Brain Disease 2020; 35(8): 1395-405.
- 9-Abrahams S, Haylett WL, Johnson G, Carr JA, Barden S. *Antioxidant Effects of Curcumin in Models of Neurodegeneration, Aging, Oxidative and Nitrosative Stress: A Review*. Neuroscience. 2019; 406: 1-21.

- 10-Malik P, Singh M. *Study of Curcumin Antioxidant Activities in Robust Oil–Water Nanoemulsions*. New Journal of Chemistry 2017; 41(21): 12506-19.
- 11-Farooqui T, Farooqui AA. *Chapter 2 - Curcumin: Historical Background, Chemistry, Pharmacological Action, and Potential Therapeutic Value*. In: Farooqui T, Farooqui AA, Editors. *Curcumin for Neurological and Psychiatric Disorders*: Academic Press; 2019; 23-44.
- 12-Forouzanfar F, Read MI, Barreto GE, Sahebkar A. *Neuroprotective Effects of Curcumin through Autophagy Modulation*. IUBMB Life 2020; 72(4): 652-64.
- 13-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; 46(1): 2-18.
- 14-Chen A, Xu Y, Yuan J. *Ginkgolide B Ameliorates NLRP3 Inflammasome Activation after Hypoxic-Ischemic Brain Injury in the Neonatal Male Rat*. Int J Dev Neurosci 2018; 69: 106-11.
- 15-Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA. *Leaf Senescence: Correlated with Increased Levels of Membrane Permeability and Lipid Peroxidation, and Decreased Levels of Superoxide Dismutase and Catalase*. Journal of Experimental botany 1981; 32(1): 93-101.
- 16-Batandier C, Fontaine E, Kériel C, Leverve X. *Determination of Mitochondrial Reactive Oxygen Species: Methodological Aspects*. J Cell Mol Med 2002; 6(2): 175-87.
- 17-Jollow D, Mitchell J, Zampaglione N, Gillette J. *Bromobenzene-Induced Liver Necrosis. Protective Role of Glutathione and Evidence for 3, 4-Bromobenzene Oxide as the Hepatotoxic Metabolite*. Pharmacology 1974; 11(3): 151-69.
- 18-Kono Y. *Generation of Superoxide Radical during Autoxidation of Hydroxylamine and an Assay for Superoxide Dismutase*. Arch Biochem Biophys 1978;186(1): 726: 109247.
- 19-Greenwald RA. *Handbook Methods for Oxygen Radical Research: CRC Press*; 2018.
- 20-Crack PJ, Wong CH. *Modulation of Neuro-Inflammation and Vascular Response by Oxidative Stress Following Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury*. Current Medicinal Chemistry 2008; 15(1): 1-14.
- 21-Torki A, Khalaji-Pirbalouty V, Lorigooini Z, Rafieian-Kopaei M, Sadeghimanesh A, Rabiei Z. *Anchusa Italica Extract: Phytochemical and Neuroprotective Evaluation on Global Cerebral Ischemia and Reperfusion*. Braz J Pharm Sci 2018; 54(1).
- 22-Bodega G, Alique M, Puebla L, Carracedo J, Ramírez R. *Microvesicles: ROS Scavengers and ROS Producers*. Journal of Extracellular Vesicles 2019; 8(1): 1626654.
- 23-El-Demerdash FM. *Lipid Peroxidation, Oxidative Stress and Acetylcholinesterase in Rat Brain Exposed to Organophosphate and Pyrethroid Insecticides*. Food and Chemical Toxicology 2011; 49(6): 1346-52.
- 24-R Buettner G. *Superoxide Dismutase in Redox Biology: The Roles of Superoxide and Hydrogen Peroxide*. Anti-Cancer Agents in Medicinal

- Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents) 2011; 11(4): 341-6.
- 25-Mitchell JP, Carmody RJ. *NF-Kb and the Transcriptional Control of Inflammation*. Int Rev Cell Mol Biol 2018; 335: 41-84.
- 26-Luo L-N, Xie DQ, Zhang XG, Jiang R. *Osthole Decreases Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Suppressing JAK2/STAT3 Signaling Activation*. Exp Ther Med 2016; 12(4): 2009-14.
- 27-Mo Y, Yue E, Shi N, Liu K. *The Protective Effects of Curcumin in Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury through PKC- θ Signaling*. Cell Cycle 2021; 20(5-6): 550-60.
- 28-Huang L, Chen C, Zhang X, Li X, Chen Z, Yang C, et al. *Neuroprotective Effect of Curcumin Against Cerebral Ischemia-Reperfusion Via Mediating Autophagy and Inflammation*. J Mol Neuroscience 2018; 64(1): 129-39.
- 29-Li Q, Qu M, Wang N, Wang L, Fan G, Yang C. *Betaine Protects Rats Against Ischemia/Reperfusion Injury-Induced Brain Damage*. J Neurophysiol 2022; 127(2): 444-51.

Investigating the Effect of Curcumin and Betanin Nanoparticles on Antioxidant and Inflammatory Response in Rats Suffering from Brain Ischemia/Reperfusion

Yalda Saghari¹, Monireh Movahedi¹, Majid Tebianian², Maliheh Entezari^{*3}

Original Article

Introduction: Natural products can help in the treatment of many diseases due to their low side effects. In the present study the effect of pretreatment of nanobetatin and nanocurcumin in cerebral ischemia rats was investigated.

Methods: The present study was experimental. 40 male Wistar rats were divided into eight groups of healthy control, healthy animals receiving nanobetatin, healthy animals receiving nanocurcumin, healthy animals receiving nanobetatin+nanocurcumin, cerebral I/R, cerebral I/R receiving nanobetatin, cerebral I/R receiving nanocurcumin and cerebral I/R receiving nanobetatin + nanocurcumin. Oral administration of nanobetatin and nanocurcumin started five days before Bilateral Common Carotid Artery Occlusion induction in rats and continued three days later. Neurological disorders scores were assessed. After preparing the brain homogenate, the intensity of oxidative stress, the activity of antioxidant enzymes and the expressions of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6) and alpha tumor necrosis factor (TNF- α) cytokines were measured by relevant kits. Data analysis was done in GraphPad prism V.8 software.

Results: Nanobetatin and nanocurcumin showed strong anti-inflammatory and antioxidant effects in cerebral ischemia/reperfusion (I/R) rats. The content of reactive oxygen species (ROS) in the brain of I/R rats receiving nanobetatin and nanocurcumin decreased (P=0.00001) and the activity of antioxidant enzyme such as superoxide dismutase improved (P=0.00002), and the content of glutathione regeneration showed an increasing trend (P=0.0004). A decrease in neurological disorders scores (P=0.009) was observed in cerebral I/R rats receiving nanobetatin and nanocurcumin. Furthermore, nanobetatin and nanocurcumin administration reduced the expression levels of inflammatory cytokines IL-1 β (P=0.00003), IL-6 (P=0.00006), TNF- α (P=0.008) in the rats with cerebral I/R injury.

Conclusion: Nanobetatin and nanocurcumin has neuroprotective effects in cerebral I/R condition due to its antioxidant and anti-inflammation properties, which can be considered as a suitable treatment option in stroke conditions.

Keywords: Betanin, Curcumin, Ischemia, Rat

Citation: Saghari Y, Movahedi M, Tebianian M, Entezari M. **Investigating the Effect of Curcumin and Betanin Nanoparticles on Antioxidant and Inflammatory Response in Rats Suffering from Brain Ischemia/Reperfusion.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2023; 31(3): 6526-36.

¹Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

²Department of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Tehran, Iran.

³Department of Molecular Genetics, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Tel: 09122965861, email: Mohsen.dehghany74@gmail.com