

## The effect of curcumin on altered expression of BAX and BCL2 genes following cholestasis in the frontal region of male rats

Shabnam Akbari<sup>1</sup>, Mohammad Nasehi<sup>2</sup>, Mehrdad Hashemi<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MSc, Department of Genetics, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Physiology, Institute for Cognitive Science Studies (ICSS), Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Professor, Department of Genetics, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

### Abstract

**Background:** Cholestasis occurs as a result of malfunction or secretion of bile; and complications of this disease include apoptosis (planned death). Curcumin is an effective extract of turmeric rhizome that has anti-apoptosis properties. Thus in this study, we investigated the expression of BAX and BCL2 genes following cholestasis and curcumin in the frontal region of male rats.

**Materials and methods:** This study was performed on 16 male rats weighing 220-240 gram in which they were divided into 4 groups, including control group, sham-curcumin, BDL group and BDL-curcumin. Then peripheral region of rats was collected and after extraction of RNA and cDNA synthesis, expression of genes in different groups was evaluated by Real Time PCR technique.

**Results:** BCL2 gene expression decreased in the BDL group compared to the control group ( $p < 0.05$ ), and BAX gene expression increased in the BDL group compared to the control group as a result, the cell progresses to apoptosis. However, with the injection of curcumin, the expression of BCL2 gene in the BDL-Curcumin group increased compared the BDL group and BAX gene expression decreased in the BDL-Curcumin compared to the BDL group.

**Conclusion:** Curcumin can increase the expression of BCL2 gene and decrease the expression of BAX gene in the frontal region, reduce the negative effects of cholestasis including apoptosis.

**Keywords:** Cholestasis, Bax, Bcl2, Curcumin, Frontal.

**Cited as:** Akbari SH, Nasehi M, Hashemi M. The effect of curcumin on altered expression of BAX and BCL2 genes following cholestasis in the frontal region of male rats. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2021; 31(2): 156-163.

**Correspondence to:** Mohammad Nasehi

**Tel:** +98 9128224672

**E-mail:** Nasehi@iricss.org

**ORCID ID:** 0000-0002-1981-3592

**Received:** 16 Jun 2020; **Accepted:** 10 Jan 2021

## بررسی اثر کورکومین بر تغییر بیان ژن‌های BAX و BCL2 متعاقب کلستاز در ناحیه - فرونتال موش‌های صحرایی نر

شب‌نم اکبری<sup>۱</sup>، محمد ناصحی<sup>۲</sup>، مهرداد هاشمی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم نوین علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۳</sup> استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** کلستاز در اثر نقص عملکرد صفرا و یا ترشح آن رخ می‌دهد که از عوارض این بیماری می‌توان به فرآیند آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی شده) اشاره کرد. داروی کورکومین عصاره موثر ریزوم گیاه زردچوبه است که دارای خواص ضدآپوپتوزی است؛ از این رو در این پژوهش به بررسی بیان ژن‌های BAX و BCL2 متعاقب اثر کلستاز و داروی کورکومین در ناحیه پری فرونتال موش‌های صحرایی نر پرداخته شد.

**روش بررسی:** این تحقیق روی ۱۶ سر موش صحرایی نر به وزن ۲۲۰ تا ۲۴۰ گرم انجام شد که در آن موش‌ها را به ۴ گروه، شامل گروه کنترل، گروه شم-کورکومین، گروه BDL و گروه BDL-کورکومین تقسیم کردیم. در مرحله بعد ناحیه پری فرونتال موش‌ها جمع‌آوری و پس از استخراج RNA و سنتز cDNA بیان ژن‌ها در گروه‌های مختلف توسط تکنیک Real Time PCR سنجیده شد. **یافته‌ها:** بیان ژن BCL2 در گروه BDL شده نسبت به گروه کنترل کاهش یافته ( $p < 0.05$ ) و بیان ژن BAX در گروه BDL شده نسبت به گروه کنترل افزایش یافته و در نتیجه سلول به سمت آپوپتوز پیش می‌رود. اما با تزریق کورکومین بیان ژن BCL2 در گروه BDL-کورکومین نسبت به گروه BDL افزایش و بیان ژن BAX در گروه BDL-کورکومین نسبت به گروه BDL کاهش پیدا کرد. **نتیجه‌گیری:** کورکومین می‌تواند با افزایش بیان ژن BCL2 و کاهش بیان ژن BAX در ناحیه فرونتال، عوارض منفی کلستاز از جمله آپوپتوز را کاهش دهد.

**واژگان کلیدی:** کلستاز، BCL2، BAX، کورکومین، فرونتال.

### مقدمه

کلستاز می‌تواند در نتیجه نقص عملکردی در شکل‌گیری صفرا در سطح سلول‌های کبدی و یا نقص در ترشح صفرا و جریان آن در سطح مجاری صفراوی رخ دهد (۱). کلستاز اختلال ارثی و یا اکتسابی تشکیل صفرا است که می‌تواند در اثر اختلالات ژنتیکی، عفونت، حاملگی و انسداد فیزیکی مانند سنگ صفرا و تومور باشد که منجر به محاصره جریان صفرا و تجمع اسیدهای صفراوی در خون و کبد شده که اغلب به دو دسته داخل کبدی و یا خارج کبدی براساس علت آن تقسیم شده است

(۲). کلستاز داخل کبدی در درجه اول شامل مویرگ‌های صفراوی و مجاری صفراوی است و کلستاز خارج کبدی شامل مجاری کبدی و مجاری مشترک کبدی و صفراوی است (۳). کلستاز خارج کبدی یک بیماری است که با مسدود کردن از خروج صفرا به مجرای صفراوی و ورود آن به دوازدهه جلوگیری می‌کند (۴). در حالی که کلستاز داخل کبدی در اثر آسیب‌های مکرر ناشی از مواد و یا داروهای مخدر ایجاد می‌شود (۵). در انواع بیماری‌ها از جمله آسیب‌های کبدی انواع مختلفی از مرگ سلولی از جمله آپوپتوز مشاهده می‌شود. آپوپتوز توسط

مسیرهای سلولی بسیاری کنترل شده است که برای از بین بردن سلول‌ها با DNA آسیب دیده و یا اندامک‌ها، عفونت‌های ویروسی و باکتریایی بسیار مهم است. دو مسیر عمده سیگنالینگ برای القا آپوپتوز توصیف شده است. مسیر درونی با نفوذپذیری غشای میتوکندریایی آغاز می‌شود. Bax به عنوان یک عامل پیش‌برنده آپوپتوز است و از سوی دیگر Bcl2 از غشا میتوکندری در برابر اثرات مخرب Bax محافظت می‌کند، در نتیجه رابطه و نسبت میان Bax/Bcl2 از عوامل مهم در بقاء سلول در آپوپتوز به شمار می‌رود (۶). مسیر بیرونی (مسیر گیرنده‌های مرگ)، این مسیر به دنبال اتصال لیگاند به گیرنده TNF آغاز شده و منجر به فعال سازی کاسپاز ۸ و متعاقب آن کاسپاز ۳ می‌شود (۷). مداخله‌های مختلف منجر به ایجاد آپوپتوز در ناحیه فرونتال می‌شود. قشر فرونتال مغز یکی از نواحی مغزی مطالعه شده در خارج از هیپوکامپ است که پس از بررسی‌ها مشخص شده که قابلیت پذیرش حافظه بلند مدت (LTP) را دارد. این ناحیه در سازگاری‌های رفتاری، یادگیری، توجه و شخصیت و همچنین در ارتباط با رفتارهای اجتماعی، اهمیت دادن به دیگران، شناخت تئوری‌های کاربردی، اعمال اجرایی و رفتارهای ارادی نقش دارد (۸). امروزه تلاش دارند که این ناحیه را از اثرات مختلفی که به متعاقب کلستاز ایجاد می‌شود، با استفاده از داروهایی مانند کورکومین حفاظت کنند. کورکومین عضو اصلی خانواده کورکومینوئیدها و یک رنگ‌دانه زرد پلی‌فنولیک است که ماده مؤثر ریزوم گیاه زردچوبه با فرمول شیمیایی  $C_{12}H_{20}O_6$  است (۹). درمان سنتی با زردچوبه به حدود ۵۰۰۰ سال قبل برمی‌گردد که از آن به عنوان یک آسپرین گیاهی برای غلبه بر التهاب، در بیماری‌های عفونی و خودایمنی استفاده می‌شد. از قدیم به طور سنتی در درمان بیماری‌های مختلف، از جمله رماتیسم، زردی، زخم معده، سرماخوردگی، گلو درد، تب، بیماری‌های ریوی مثل آسم و آلرژی، بیماری‌های پوستی و ترمیم زخم‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفته است (۱۰). بسیاری از مطالعات کشت سلولی، حیوانی و بالینی انجام شده در یک قرن اخیر نشان دهنده اثرات بالقوه کورکومین به عنوان یک ترکیب آنتی اکسیدان، ضد التهاب، ضد تکثیر سلولی بوده است که آن را به عنوان یک مکمل ارزشمند در پیشگیری و درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها مستعد کرده است. مکانیسم مولکولی اثرات ضد التهابی کورکومین از طریق مهار بیان ژن NF- $\kappa$ B یک مولکول مهم در التهاب، از طریق مهار فسفریلاسیون فسفولیپاز A2 و کاهش بیان ژن COX-2 است که با این یافته به نظر می‌رسد که می‌توان از کورکومین به عنوان ماده

مؤثر ضد التهاب استفاده کرد. خواص دارویی کورکومین به طور عمده روی خواص ضدسرطانی آن متمرکز است. خاصیت مهارکنندگی آپوپتوز از طریق مهار TGF- $\beta$  و کاسپاز ۳ نیز از جمله خواص مؤثر کورکومین است و هم‌چنین در آسیب‌های حاد کبدی از آسیب‌های حاصل از نکرز، استرس اکسیداتیو و التهاب دارای اقدامات محافظتی است (۱۱). از فعالیت‌های مهم کورکومین می‌توان به فعالیت‌های مفید آن روی بیماری‌های کبدی از طریق کاهش آسیب‌های ناشی از اتانول، تیواستامید، آهن با دوزهای بالا، کلستاز و سیروز کبدی اشاره کرد (۱۲).

در نهایت با توجه به اینکه کورکومین دارای خاصیت ضدآپوپتوزی است و در بیماری کلستاز این نوع مرگ سولی مشاهده می‌شود، این پژوهش به منظور بررسی بیان ژن‌های BAX, BCL2 در ناحیه فرونتال موش‌های صحرایی نر مبتلا به کلستاز تحت تیمار با کورکومین پرداخته شد.

## مواد و روشها

### بخش حیوانی

در این بررسی، ۳۲ موش صحرایی نر نژاد ویستار به وزن ۲۲۰ تا ۲۴۰ گرم از دانشکده فارماکولوژی دانشگاه تهران تهیه شد. حیوان‌ها به حیوان‌خانه تحقیقاتی منتقل شده و در هر قفس چهار سر موش قرار داده شد به مدت یک هفته به موش‌ها اجازه داده شد که خود را با شرایط حیوان‌خانه قبل از جراحی وفق دهند. در طول یک هفته هر روز حیوان‌ها نوازش می‌شدند تا در موقع آزمایش استرس ناشی از گرفتن و کار با آنها وجود نداشته باشد. سپس آنها به چهار گروه زیر تقسیم شدند:

- گروه کنترل: این گروه تنها دارای رژیم آب و غذا بودند. هدف از مطالعه این گروه بررسی فرآیندهای آپوپتوز در حالت پایه بود. - گروه BDL (Bile Duct Ligation): در این گروه انسداد مجرای صفراوی در موش‌ها ایجاد شد و حیوانات هیچ دارویی دریافت نکردند.

- گروه شم-کورکومین: این گروه علاوه بر رژیم آب و غذا تداخل استرس ناشی از جراحی و دریافت کورکومین مورد بررسی قرار گرفت.

- گروه BDL-کورکومین: این گروه داروی کورکومین را دریافت کردند و مورد انسداد مجاری صفراوی قرار گرفتند.

مراحل جراحی جهت ایجاد انسداد مجرای صفراوی (BDL)

۸۰- بیرون آورده شده و یکسان سازی غلظت برای آنها صورت گرفت. حجم RNA ورودی به کیت 1500ng/μl cDNA بود.

طراحی و *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) پرایمرهای *Real Time PCR*

در این مطالعه، ژن های *BCL2*، *Bax* به عنوان ژن های هدف جهت بررسی بیان و *Gapdh* به عنوان ژن رفرنس انتخاب شدند. سکانس ژن ها از پایگاه های اطلاعاتی *NCBI* و *UCSC* به دست آمده و سپس با استفاده از این سکانس ها، دو جفت پرایمر جهت انجام واکنش های *Real time PCR* برای این دو ژن طراحی شدند. در آخر تمام پرایمرهای طراحی شده و به دست آمده از مقاله، توسط *NCBI BLAST* مورد آنالیز قرار گرفتند. آنالیزهای انجام شده نشان دهنده عدم همولوژی پرایمرها با مناطق ژنومی و رونوشت های دیگر و همچنین عدم ایجاد ساختار دوم در این پرایمرها بود (جدول ۱).

پلیت نمونه ها را در دستگاه *ABI Step One Plus Real Time PCR* برای شروع انجام واکنش قرار داده و جهت افزایش دقت هر نمونه به صورت دو تکراری استفاده شد. جداسازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه و تکثیر در ۴۰ سیکل که شامل جداسازی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و مرحله اتصال در دمای ۶۴ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه صورت گرفت. شکل ۱ تاییدی بر صحت پرایمرها و اطمینان از اختصاصیت آنها است. جهت اطمینان از تکثیر ژن ها از ژن کنترل استفاده شد.

### تفسیر آماری

دو روز پس از *BDL*، علایم کلاستاز شامل زردی روی بدن حیوانات آشکار شد. بدین ترتیب پس از استخراج RNA و طراحی پرایمرهای مربوط برای هر نمونه دو بار تکرار *PCR* انجام گرفت. پس از اتمام واکنش برای هر واکنش یک منحنی تکثیر (*Amplification Curve*) رسم شد. سپس منحنی استاندارد واکنش در بازه تکثیر ۹۰-۱۱۰٪ رسم شد. در نهایت برای بررسی اختصاصیت قطعات تکثیر شده برای هر یک منحنی ذوب (*Melting Curve*) رسم شد. نتایج با استفاده از نرم افزار *SPSS* و *ANOVA* یک طرفه و تست تعقیبی توکی با

حیوان ها توسط تزریق درون صفاقی (IP) کتامین حیوانی ۱۰٪ به میزان ۲ میلی لیتر بر کیلوگرم و زایلین بی هوش می شدند. بعد از بی هوشی، حیوان به پشت خوابانیده شده و موهای سطح شکمی، حد فاصل جناغ تا دستگاه تناسلی چیده شد با استفاده از تیغ جراحی برشی در زیر جناغ به اندازه ۲ تا ۳ سانتی متر ایجاد و بدین ترتیب لایه بیرونی سطح شکمی حیوان شکافته شد. سپس لایه درونی نیز به همین روش و به کمک قیچی جراحی برش زده شد. در این مرحله کبد قابل مشاهده بود. در مرحله بعد با بهره گیری مجدد از برنیشر مجرای صفراوی مشترک بالا آورده شده و رگ خونی متصل به آن نیز جدا گشت. با استفاده از نخ بخیه استریل غیر جذبی، دو گره در دو نقطه از مجرای زده شده و حد فاصل بین این دو گره با استفاده از قیچی برش زده شد تا از صحت قطع جریان صفراوی اطمینان حاصل شود. سپس به آرامی کبد و احشای حیوان بر سر جای خود بازگردانده شدند و در نهایت با نخ بخیه استریل سطح شکمی بخیه زده شد (۱۳).

### طرز تهیه محلول های دارویی

کورکومین با مقدار ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر با استفاده از سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد استریل گردید. تمامی تزریق ها از روز بعد از جراحی آغاز و به صورت یک روز در میان تا روز ۲۸ پس از جراحی (۱۴ تزریق) ادامه یافت که در نهایت مغز موش ها به منظور ادامه پروژه استخراج شد.

### بخش ژنتیکی

#### استخراج RNA از بافت

ابتدا نمونه ها از فریزر ۸۰- خارج شده و جهت هموژنیزه شدن هر کدام از آنها به صورت جداگانه روی پلیتی قرار گرفتند. سپس بافت ها توسط تیغ اسکالپل به طور کامل کوبیده و خرد شدند. پس از هموژنیزه شدن بافت ها توسط تیغ اسکالپل، کیت ترایزول از شرکت سیناژن خریداری شده و استخراج RNA طبق پروتکل کیت انجام شد. در نهایت جهت بررسی خلوص و غلظت RNA های استخراج شده، OD آنها به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (*Nanodrop BioTek Epoch* آمریکا) در طول موج های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ اندازه گیری شد. جهت سنتز cDNA از RNA های استخراج شده RNA های استخراج شده از فریزر

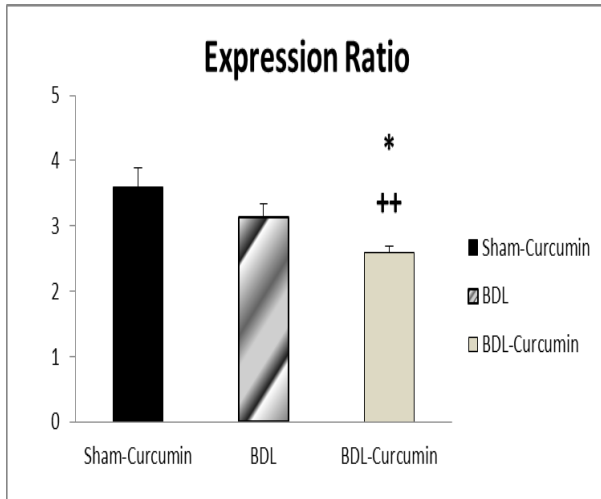
جدول ۱. پرایمرهای ژن های مورد نظر

نام ژن	سکانس پرایمر	5'→3'	طول قطعه تکثیر شونده	طول پرایمر
GAPDH	F: AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG R: CATACTCAGCACCAGCATCACC		121	F: 22 R: 22
BAX	F: AGGGTGGCTGGGAAGGC R: TGAGCGAGGCGGTGAGG		93	F: 17 R: 17
BCL2	F: ATCGCTCTGTGGATGACTGAGTAC R: AGAGACAGCCAGGAGAAATCAAAC		134	F: 24 R: 24

سطح معنی داری ( $p < 0.05$ ) تحلیل شدند و نمودار مربوط به بیان ژن ها با استفاده از نرم افزار Exel 2013 رسم شد.

### یافته‌ها

بیان ژن Bcl2 در گروه شم-کورکومین نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرد، ولی این افزایش معنی دار نبود. در گروه BDL بیان ژن نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرد و این کاهش معنی دار بود. در گروه BDL-کورکومین بیان ژن نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرد که این کاهش نیز معنی دار بود. در بررسی بیان ژن در گروه BDL-کورکومین نسبت به گروه BDL دریافتیم که بیان ژن در گروه BDL-کورکومین نسبت به BDL افزایش پیدا کرده است که این افزایش بیان معنی دار بود و در نتیجه داروی کورکومین بر بیان ژن Bcl2 در گروه موش‌های BDL شده تاثیرگذار بود (نمودار ۱).



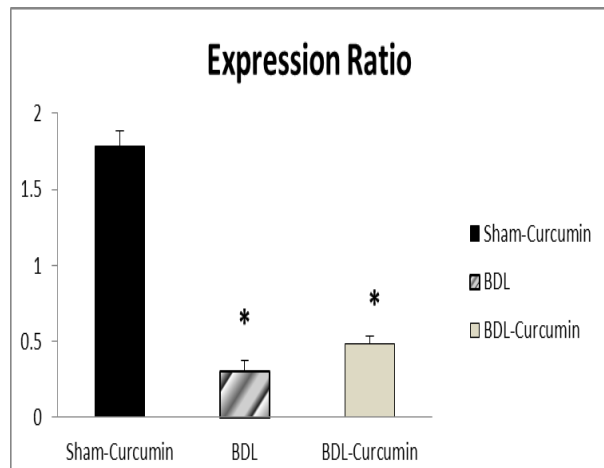
**نمودار ۲.** نمودار نسبت بیان ژن BAX در گروه‌های مختلف نسبت به گروه کنترل. (\*  $p < 0.05$  معنی داری با گروه کنترل و ++  $p < 0.01$  معنی داری با گروه BDL)

در واقع می‌توان این استدلال را داشت که تیمار با داروی کورکومین سبب افزایش بیان ژن ضد آپوپتوزی BCL2 و کاهش بیان ژن طرفدار آپوپتوز BAX در گروه BDL-کورکومین شده است که با این نتایج می‌توان به مهار آپوپتوز ناشی از کلستاز با استفاده از داروی ضد آپوپتوزی کورکومین در ناحیه فرونتال رسید.

### بحث

در این پژوهش به عوارض ناشی از کلستاز از جمله آپوپتوز و بررسی بیان ژن‌های BAX و BCL2 متعاقب آن در ناحیه فرونتال موش‌های صحرایی نر و هم چنین تاثیر داروی کورکومین در جهت مهار آپوپتوز از طریق تغییرات حاصل بر بیان ژن‌های مذکور پرداخته شد که نتایج حاکی از آن است که تیمار با داروی کورکومین بیان ژن BCL2 را در گروه BDL-کورکومین افزایش داده است که همان طور که ذکر شد این ژن نقش ضدآپوپتوزی دارد.

کلستاز با تغییرات عمیق متابولیکی از جمله تغییر در عملکرد میتوکندری، کاهش اکسیداسیون اسیدهای چرب، کاهش تشکیل اجسام کتونی، کاهش سطح انرژی و افزایش گلیکولیز همراه است. در واقع با تولید گونه‌های فعال اکسیژن در میتوکندری منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو و در اثر تجمع اسیدهای صفراوی که علت اصلی آسیب کبدی است منجر به مرگ سلولی آپوپتوز یا نکروز و در نهایت بروز سیروز و از دست دادن کبد می‌شود (۱۴). از آنجایی که آپوپتوز اختلال در نظم



**نمودار ۱.** نمودار نسبت بیان ژن BCL2 در گروه‌های مختلف نسبت به گروه کنترل. (\*  $p < 0.05$  معنی داری با گروه کنترل و +  $p < 0.05$  معنی داری با گروه BDL)

بیان ژن Bax در گروه شم-کورکومین نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرد، ولی این افزایش معنی دار نبود. در گروه BDL بیان ژن نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرد، ولی این افزایش معنی دار نبود. در گروه BDL-کورکومین بیان ژن نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرد و این افزایش معنی دار بود. در بررسی بیان ژن در گروه BDL-کورکومین نسبت به گروه BDL دریافتیم که بیان ژن در گروه BDL-کورکومین نسبت به BDL کاهش پیدا کرد و این کاهش معنی دار بود و در نتیجه داروی کورکومین بر بیان ژن Bax در گروه‌های BDL شده تاثیرگذار بود (نمودار ۲).

است و به عنوان یک مهم و کمک به پیشرفت بسیاری از بیماری‌های کبد انسان تکامل یافته است، در مطالعه‌ای به این نتیجه رسیدند که بالا رفتن اسیدهای صفراوی از قبیل Chenodeoxycholic acid (CDCA) بسته به میزان آبگریز بودن آنها، با اعمال اثرات سیتوتوکسیک روی هپاتوسیت‌ها، که بخشی از این اثرات مربوط به ورود اسیدهای صفراوی در غشا میتوکندری هپاتوسیت‌ها و کاهش محتویات فسفولیپیدی و به هم ریختگی ترکیب غشا میتوکندری است، در نهایت می‌تواند سلول‌های کبدی را به سمت آپوپتوز و نکروز هدایت کرده و سرانجام باعث ایجاد بیماری‌های مزمن کبدی شود (۱۵). ایجاد رادیکال‌های آزاد در سلول‌ها و ترکیب آنها با غشا سلولی و اسیدهای چرب غیر اشباع منجر به تولید لیپیدهای رادیکالی با مولکول اکسیژن شده و در نتیجه منجر به تجزیه فسفولیپیدهای موجود در شبکه آندوپلاسمی و آزاد شدن آنزیم‌ها شده که در نهایت به مرگ سلولی ختم می‌شود (۱۶). در مطالعات متعدد نشان داده شده است که ماکروفاژها (همان سلول‌های کوپفر در سینوزوئیدهای کبدی) در پاسخ به آسیب بافتی فعال شده و میانجی‌های سمی از جمله فاکتور نکروز دهنده تومور-آلفا (TNF $\alpha$ )، اینترلوکین-۱ (IL-1) و اکسید نیتریک آزاد می‌کنند که تجمع این سلول‌ها و ترشح میانجی‌های سمی در ایجاد سمیت کبدی نقش داشته و در واقع باعث تشدید نکروز کبدی می‌شود (۱۷). بیماری‌های مزمن کبدی، فیروز کبدی و سیروز اغلب در اثر استرس اکسیداتیو و التهاب ایجاد می‌شوند که کورکومین طی بررسی‌های انجام شده با فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد التهابی خود باعث مهار فیروز کبدی می‌شود؛ هم چنین می‌تواند با القا بیان آنزیم‌های MMPs در کبد نقشی به عنوان عامل ضد فیبروزی ایفا کند. کورکومین با افزایش سطح گلوکوتانیون احیا شده و آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بافت کبدی و نیز کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدی و هم چنین افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی و سم زدایی کبدی، در نهایت مهار تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROs) را باعث می‌شود (۱۸). کورکومین به دلیل داشتن حلقه فنولی و بخش  $\beta$ -دی کتونی بر روی یک مولکول یک ترکیب آنتی اکسیدان منحصر به فردی است که از طریق به دام اندازی و پایدارکردن انواع رادیکال‌های آزاد به ویژه رادیکال‌های پراکسیل چربی می‌تواند از گسترش اکسیداسیون جلوگیری کند و بدین طریق مانع تخریب بافتی شود (۱۹). کورکومین با کاهش سطح سرمی چربی و اسیداوریک به بهبود آسیب‌های کبدی کمک می‌کند (۲۰). در تحقیقات گسترده‌ای به نقش کورکومین و خواص ضد التهابی و ضد تکثیر سلولی آن پرداخته شده است. اخیراً نشان

داده شده است که کورکومین اثر محافظتی در برابر التهاب و استرس اکسیداتیو در کربن تتراکلرید (CCI<sub>4</sub>) ناشی از آسیب حاد کبدی دارد؛ هم چنین از سیروز ناشی از TTA جلوگیری می‌کند (۲۱). در مطالعه‌ای به نقش کورکومین در ایسکمی مغزی همراه با بیان فاکتور Nrf-2 پرداختند. کورکومین با دوز بالا باعث تنظیم مثبت Nrf-2 در بافت مغز می‌شود که این نشان دهنده اثر محافظتی کورکومین از مغز است (۲۲). کورکومین در بیماری‌های عصبی از قبیل آلزایمر و صرع و چندین بیماری نورولوژیک دیگر از خود اثرات نوروپروتکتیو بروز می‌دهد (۲۳). تحقیقاتی در زمینه اثرات مفید کورکومین بر روی آلزایمر و پارکینسون با استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفته است که نتیجه این تحقیقات نشان دهنده اثرات سودمند کورکومین در کاهش پاتولوژی آمیلوئید است. در واقع کورکومین با اعمال تاثیرات سودمند در متابولیسم آمیلوئید و نیز بروز اثرات ضد التهابی و آنتی اکسیدانی می‌تواند از بروز و پیشرفت آلزایمر جلوگیری کند. تیمار موش‌های صرعی شده با کورکومین نشان دهنده خاصیت ضد تشنجی کورکومین از طریق کاهش پروتئین پیش برنده آپوپتوز (BAX) و افزایش پروتئین آنتی آپوپتوتیک BCL2 در بیماری صرع است. در مطالعات متعددی، اثر کورکومین در کمک به درمان سرطان بررسی شده است که نتایج حاکی از آن است که این ترکیب می‌تواند از تشکیل یا گسترش تومورها جلوگیری کند و یا با القای آپوپتوز و دخالت در سیکل تکثیر سلولی از میزان آنها بکاهد. کورکومین باعث مهار و سرکوب تکثیر سلولی طیف وسیعی از سلول‌های سرطانی از طریق تعدیل کاهشی ژن‌های ضد آپوپتوز فعال سازی کاسپازها و افزایش فعالیت ژن‌های سرکوب کننده سرطان از جمله P53 می‌شود. این ترکیب با فعال سازی پروتئین‌های BCL2 و BCL-XL، القا کاسپازهای ۳ و ۸ و ۹ و آزادسازی سیتوکروم C و فعال سازی PPAR- $\gamma$  توانسته است آپوپتوز را فعال کند؛ هم چنین با تعدیل متالوپروتئین‌های ماتریکس (MMPs)، مولکول‌های چسبنده سطحی سلولی مانند NF- $\kappa$ B، COX-2، TNF- $\alpha$  و LOX، کموکاین‌ها، فاکتورهای رشد EGFR و HER-2 و مهار فعالیت N-Terminal و پروتئین تیروزین کیناز باعث مهار تهاجم تومورها می‌شود (۲۴). با توجه به ارتباط میان التهاب و بروز سرطان اثرات ضد التهابی کورکومین به خوبی به اثرات ضدتوموری آن از طریق کاهش تولید میانجی‌گری‌های ایجاد التهاب از قبیل COX-2، لیپوکسیژناز ۲ و سایتوکاین‌های مربوطه کمک می‌کند (۲۵). مکانیسم دیگر بروز اثرات ضد سرطانی کورکومین دخالت در سیکل سلولی و کاهش میزان بیان CDKs و هم چنین مهار

کاهش فرایند آپوپتوز می‌شود که در نتیجه کورکومین می‌تواند از اهداف درمانی برای درمان کلستاز باشد.

### قدردانی و تشکر

از زحمات اساتید گران قدر جناب آقای دکتر محمد ناصحی و دکتر مهرداد هاشمی بسیار سپاسگزارم که با راهنماییهای ارزشمندشان مرا در انجام این پروژه یاری کردند. پایان نامه فوق در تاریخ ۱۳۹۴/۱۲/۸ با شماره ۴۶۷۷۸ در معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران ثبت پروپوزال شده است.

فسفریلاسیون STAT3 است که مسئول سیگنالینگ مسیرهای سرطان‌زایی است (۲۶). در مطالعه‌ای به اثر کورکومین در سرطان پرداختند که طبق این نتایج کاهش نسبت Bax/Bcl2 مشاهده شد که این یافته‌ها حاکی از اثر ضدآپوپتوزی کورکومین است (۲۷).

از جمع بندی پژوهش‌های انجام شده و بررسی نتایج حاصل از این پروژه می‌توان به این نتیجه رسید که کلستاز منجر به روند رو به رشد آپوپتوز و افزایش بیان ژن BAX می‌شود که با استفاده از داروی کورکومین و اثبات خاصیت ضد آپوپتوزی آن بیان ژن BCL2 تحت تاثیر این دارو افزایش یافته که منجر به

### REFERENCES

- Piechota J, Jelski W. Intrahepatic Cholestasis in Pregnancy: Review of the Literature. J Clin Med 2020;9.
- Wang Y, Aoki H, Yang J, Peng K, Liu R, Li X, et al. The role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in bile-acid-induced cholangiocyte proliferation and cholestasis-induced liver injury in mice. Hepatology 2017; 65:2005-18.
- Alkhayyat M, Saleh MA, Zmaili M, Sanghi V, Singh T, Rouphael C, et al. Successful liver transplantation for acute sickle cell intrahepatic cholestasis: A case report and review of the literature. World J Hepatol 2020; 12:108-15.
- Liu Y, Sun LY, Zhu ZJ, Wei L, Qu W, Zeng ZG. Liver Transplantation for Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis. Ann Transplant 2018; 666:23-7.
- Lin SY, Wang YY, Chen WY, Liao SL, Chou ST, Yang CP, et al. Hepatoprotective activities of rosmarinic acid against extrahepatic cholestasis in rats. Food Chem Toxicol 2017; 108:214-23.
- D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. Cell Biol Int 2019; 43:582-92.
- Sauler M, Bazan IS, Lee PJ. Cell Death in the Lung: The Apoptosis-Necroptosis Axis. Annu Rev Physiol 2019; 81:375-402.
- Tavoni G, Cocco S, Monasson R. Neural assemblies revealed by inferred connectivity-based models of prefrontal cortex recordings. J Comput Neurosci 2016; 41:269-93.
- Salehi B, Stojanovic-Radic Z, Matejic J, Sharifi-Rad M, Anil Kumar NV, Martins N, et al. The therapeutic potential of curcumin: A review of clinical trials. Eur J Med Chem 2019; 163:527-45.
- Zendedel E, Butler AE, Atkin SL, Sahebkar A. Impact of curcumin on sirtuins: A review. J Cell Biochem 2018; 119:10291-300.
- Hu S, Xu Y, Meng L, Huang L, Sun H. Curcumin inhibits proliferation and promotes apoptosis of breast cancer cells. Exp Ther Med 2018; 16:1266-72.
- Wu C, Qiu YB, Sun XQ, Chen D, Wu YX, Pang QF. Effects of curcumin on liver fibrosis induced by cholestasis in mice. Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi 2019; 35:468-72.
- Nasehi M, Torabinejad S, Hashemi M, Vaseghi S, Zarrindast MR. Effect of cholestasis and NeuroAid treatment on the expression of Bax, Bcl-2, Pgc-1alpha and Tfam genes involved in apoptosis and mitochondrial biogenesis in the striatum of male rats. Metab Brain Dis 2020; 35:183-92.
- Azad AI, Krishnan A, Troop L, Li Y, Katsumi T, Pavelko K, et al. Targeted Apoptosis Of Ductular Reactive Cells Reduces Hepatic Fibrosis In A Mouse Model of Cholestasis. Hepatology 2020.
- Woolbright BL, Jaeschke H. Measuring Apoptosis and Necrosis in Cholestatic Liver Injury. Methods Mol Biol 2019; 1981:133-47.
- Almeida CP, Ferreira MCF, Silveira CO, Campos JR, Borges IT, Baeta PG, et al. Clinical correlation of apoptosis in human granulosa cells-A review. Cell Biol Int 2018; 42:1276-81.
- Delvecchio VS, Sana I, Mantione ME, Vilia MG, Raghetti P, Rovida A, et al. Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 inhibitor interrupts toll-like receptor signalling and sensitizes chronic lymphocytic leukaemia cells to apoptosis. Br J Haematol 2020; 189:475-88.

18. Wang K, Zhang C, Bao J, Jia X, Liang Y, Wang X, et al. Synergistic chemopreventive effects of curcumin and berberine on human breast cancer cells through induction of apoptosis and autophagic cell death. *Sci Rep* 2016; 6:26064.
19. Hewlings SJ, Kalman DS. Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. *Foods* 2017;6.
20. Ganjali S, Blesso CN, Banach M, Pirro M, Majeed M, Sahebkar A. Effects of curcumin on HDL functionality. *Pharmacol Res* 2017; 119:208-18.
21. Abo-Zaid MA, Shaheen ES, Ismail AH. Immunomodulatory effect of curcumin on hepatic cirrhosis in experimental rats. *J Food Biochem* 2020; 44:13219.
22. Bavarsad K, Barreto GE, Hadjzadeh MA, Sahebkar A. Protective Effects of Curcumin Against Ischemia-Reperfusion Injury in the Nervous System. *Mol Neurobiol* 2019; 56:1391-404.
23. Voulgaropoulou SD, van Amelsvoort T, Prickaerts J, Vingerhoets C. The effect of curcumin on cognition in Alzheimer's disease and healthy aging: A systematic review of pre-clinical and clinical studies. *Brain Res* 2019; 1725:146476.
24. Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C, Ramirez-Tortosa M. Curcumin and Health. *Molecules* 2016; 21:264.
25. Yuan J, Liu R, Ma Y, Zhang Z, Xie Z. Curcumin Attenuates Airway Inflammation and Airway Remolding by Inhibiting NF-kappaB Signaling and COX-2 in Cigarette Smoke-Induced COPD Mice. *Inflammation* 2018; 41:1804-1.
26. Jose A, Labala S, Ninave KM, Gade SK, Venuganti VVK. Effective Skin Cancer Treatment by Topical Co-delivery of Curcumin and STAT3 siRNA Using Cationic Liposomes. *AAPS PharmSciTech* 2018; 19:166-75.
27. Kheiri A, Amid R, Kheiri L, Namdari M, Mojahedi M, Kadkhodazadeh M. Effect of Low- Level Laser Therapy on Bone Regeneration of Critical-Size Bone Defects: A Systematic Review of In Vivo Studies and Meta-Analysis. *Arch Oral Biol* 2020;117:104782.