

بررسی اثر حفاظتی چند گیاه دارویی از خانواده نعناعیان بر سمیت القا شده توسط پپتید بتآمیلوئید در سلول‌های PC12

چکیده

پروین بلالی^۱
ملیحه سودی^{۱*}
سودابه سعیدنیا^۲

۱- گروه سم‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۲- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱۱/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۴/۱۹

زمینه و هدف: تجمع بیش از حد پپتید بتآمیلوئید که جزو اصلی پلاک‌های پیری در بیماری آلزایمر می‌باشد از طریق القای استرس اکسیداتیو باعث مرگ سلول‌های عصبی می‌شود و به همین دلیل عوامل آنتی‌اکسیدان در درمان بیماری استفاده می‌شوند. گیاهان دارویی از خانواده نعناعیان به‌طور گسترده در طب سنتی ایران استفاده می‌شوند. این گیاهان حاوی ترکیباتی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشند و برای بعضی گیاهان این خانواده خاصیت نوروپروتکتیو گزارش شده است. در این مطالعه هفت گیاه از جنس‌های مریم گلی و مرزه انتخاب شدند و اثر حفاظتی آن‌ها بر سمیت ناشی از پپتید بتآمیلوئید در سلول‌های PC12 بررسی شد.

روش بررسی: عصاره‌گیری از سر شاخه‌های هوایی گیاهان به ترتیب با حلال‌های اتیل استات و متانول به روش پرکولاسیون در دمای اتاق انجام گرفت. سلول‌های PC12 با غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی در محیط کشت یک ساعت قبل از اضافه کردن پپتید بتآمیلوئید انکوبه شدند و سمیت سلولی ۲۴ ساعت بعد از اضافه کردن پپتید بتآمیلوئید به محیط کشت، به روش سنجش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: از بین عصاره‌های گیاهی مورد مطالعه عصاره گیاهان مرزه بختیاری (*Satureja bachtiarica*)، مریم گلی باغی (*Salvia officinalis*) و مریم گلی لوله‌ای (*Salvia macrosiphon*) اثر حفاظتی چشم‌گیری در برابر سمیت ناشی از پپتید بتآمیلوئید نشان دادند ($P < 0.001$).

نتیجه‌گیری: ترکیبات اصلی این عصاره‌ها شامل رزمارینیک اسید، نارینژنین، آپژنین و لوتولین می‌باشد که می‌توانند در اثرات نوروپروتکتیو مشاهده شده نقش داشته باشند. با توجه به اثرات حفاظتی مشاهده شده در برابر پپتید بتآمیلوئید، این گیاهان می‌توانند در درمان بیماری آلزایمر مورد توجه قرار گیرند.

کلمات کلیدی: آلزایمر، پپتید بتآمیلوئید، سمیت عصبی، خانواده نعناعیان.

* نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه سم‌شناسی
تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۴۵۴۹
E-mail: soodi@modares.ac.ir

مقدمه

پیش‌ساز خود موسوم به پروتئین پیش‌ساز بتآمیلوئید (Amyloid Precursor Protein, APP) ساخته می‌شود.^۱

مکانیسم‌های سمیت بتآمیلوئید شامل اکسیداتیو استرس، اختلال در اعمال میتوکندری، از بین رفتن سیناپس‌ها و تخریب گیرنده‌های نیکوتینی، آپوپتوز و واکنش‌های التهابی می‌باشد. اکسیداتیو استرس نقش بسیار مهمی در پیشبرد بیماری آلزایمر ایجاد می‌کند. تجمع بتآمیلوئید در خارج سلول، باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن

بیماری آلزایمر (Alzheimer's disease) شایع‌ترین شکل زوال عقل در پیری می‌باشد. دو عامل اصلی این بیماری شامل تشکیل پلاک‌های پیری متشکل از پپتید بتآمیلوئید و کلافه‌های نوروفیبریلار (Neurofibrillary tangles) متشکل از پروتئین‌های هیپرفسفریله تاو (Tau) می‌باشد. پپتید بتآمیلوئید طی فرایند پروتئولیتیک از پروتئین

روش بررسی

مطالعه حاضر یک مطالعه بنیادی- کاربردی می باشد که در سال ۱۳۸۹ در گروه سم شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. رده سلولی PC 12 از انستیتو پاستور ایران خریداری گردید. پپتید بتا آمیلوئید ($\alpha\beta$) و 2,5-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-3- diphenyltetrazolium bromide (MTT) و Poly-D-lysine (PDL) از شرکت (Sigma Co., USA) تهیه شد و محیط کشت سلول (DMEM) سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum, FBS) و تریپسین از شرکت (GIBCO Co., USA) و حلال های مورد استفاده از شرکت (MERK Co., Germany) خریداری گردید.

روش عصاره گیری از گیاهان: گیاهان مورد مطالعه از نقاط مختلف محل رویش جمع آوری شدند. عصاره گیری از اندام های هوایی گیاهان جمع آوری شده، پس از خشک شدن، به روش پرکولاسیون انجام گرفت. ابتدا عصاره گیری با حلال اتیل استات و بعد با حلال متانول صورت گرفت. در هر مرحله بعد از گذشت هر ۲۴ ساعت مخلوط حلال و عصاره، صاف شده و حلال جدید به تغاله گیاه اضافه می شد، سپس عصاره های به دست آمده با دستگاه تقطیر دوار در خلا تغلیظ شده و بعد با دستگاه Freeze drier به طور کامل خشک شدند.

کشت سلول و نحوه تیمار سلول ها: سلول های PC12 در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی پنی سیلین ۱۰۰ واحد بین المللی و استرپتومایسین ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر در فلاسک استریل کشت سلول کوت شده با PDL و در شرایط دمای ۳۷ °C و فشار ۵٪ CO₂ کشت داده شدند.

جهت بررسی اثر حفاظتی عصاره ها بر سمیت القا شده توسط بتا آمیلوئید، سلول ها با غلظت ۱۰^۴ سلول در هر چاهک پلیت های ۹۶ خانه کوت شده با PDL کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت پپتید بتا آمیلوئید با غلظت نهایی ۲ μmol به محیط کشت اضافه گردید. محلول استوک پپتید بتا آمیلوئید با غلظت ۱ mmol با حل کردن یک میلی گرم پودر پپتید در ۱ ml آب مقطر استریل تهیه گردید. محلول استوک قبل از اضافه شدن به محیط به مدت سه روز در دمای ۳۷ °C انکوبه گردید تا فرم تجمع یافته آن تشکیل شود. در گروه های تیمار سلول ها یک ساعت قبل از اضافه کردن پپتید بتا آمیلوئید با عصاره ها

(Reactive Oxygen Species, ROS) می شود و این رادیکال ها با لیپیدها، پروتئین ها، DNA، RNA واکنش داده و باعث آسیب جدی به سلول می شوند.^۳ یکی از راه کارها برای درمان بیماری آلزایمر به کار بردن ترکیبات آنتی اکسیدان است. این ترکیبات با پاک سازی رادیکال های آزاد می توانند از پیشرفت بیماری جلوگیری نمایند.^۴ از آنجایی که بیماری آلزایمر یک بیماری پیچیده می باشد برای درمان نیاز به ترکیباتی است که از مسیرهای مختلف باعث بهبود بیماری شوند. گیاهان دارویی حاوی ترکیبات مختلفی هستند که می توانند با چند مکانیسم مختلف بیماری های پیچیده را کنترل نمایند. به همین دلیل در سال های اخیر توجه زیادی به استفاده از گیاهان دارویی برای درمان این بیماری شده است.^۵

خانواده نعناعیان (*Lamiaceae*) در طب سنتی ایران همواره مورد استفاده بوده اند. ۸۱ گونه از این خانواده در ایران استفاده دارویی دارند که بیش تر به عنوان تقویت کننده و برای درمان نفخ و سوءهاضمه و عفونت های میکروبی و قارچی بوده است.^۶ جنس *Salvia L* با نام فارسی مریم گلی و جنس *Satureja L* با نام فارسی مرزه به خانواده لامیاسه تعلق دارند جنس مریم گلی ۵۸ گونه و جنس مرزه ۱۵ گونه در ایران دارند.

ترکیبات موجود در گیاهان این خانواده به طور عمده شامل فلاونوئیدها و ترکیبات پلی فنولی می باشند^۷ و اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و مهار کننده کولین استرازی برای گیاهان این دو جنس گزارش شده است. همچنین این گیاهان به طور سنتی در درمان اختلالات عصبی مثل افسردگی اضطراب و کم خوابی و افزایش حافظه استفاده می شوند.^۸

در این مطالعه گیاهان مریم گلی لبه دار (*Salvia limbata*) مریم گلی مرتفع یا مریم گلی بلند (*Salvia hypoleuca*) مریم گلی لوله ای (*Salvia macrosiphon*) مریم گلی باغی یا مریم گلی دارویی (*Salvia officinalis*) مریم گلی ترکه ای یا مریم گلی هرز (*Salvia virgata*) از جنس مریم گلی (*Salvia*) و مرزه بختیاری (*Saturejabachtiarica*) و مرزه جنگلی یا مرزه سفید (*Saturejamutica*) از جنس مرزه (*Satureja*) انتخاب شدند و اثر حفاظتی آن ها بر سمیت القا شده توسط پپتید بتا آمیلوئید در سلول های PC 12 مورد ارزیابی قرار گرفت. هدف این مطالعه شناسایی گیاهان دارویی موثر در درمان بیماری آلزایمر است.

بتآمیلوئید در جدول- ۱ نشان داده شده است. انکوبه کردن سلول‌ها با پپتید بتآمیلوئید به مدت ۲۴ ساعت تقریباً ۵۰٪ برای سلول‌ها سمیت داشته است. اثر حفاظتی ذکر شده در این جدول برای غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ عصاره‌ها می‌باشد. پیش‌درمانی سلول‌ها با عصاره‌های *S. bachtiarica*، *S. officinallis*، *S. macrosiphon* به‌طور معنی‌داری باعث کاهش سمیت پپتید بتآمیلوئید در این سلول‌ها شده است. در حالی که پیش‌درمانی سلول‌ها با عصاره‌های *S. virgata*، *S. limbata*، *S. mutica* و *S. hypoleuca* اثر حفاظتی معنی‌داری نداشته است و این عصاره‌ها نتوانستند از سمیت ناشی از پپتید بتآمیلوئید جلوگیری نمایند. این اثر در محدوده غلظتی $200-100 \mu\text{g/ml}$ برای این عصاره‌ها مورد مطالعه قرار گرفت که در هیچ‌کدام از غلظت‌ها اثر حفاظتی مشاهده نشد. غلظت‌های بالاتر به‌علت این‌که اثر سمی بر روی سلول داشتند آزمایش نشدند.

در مورد عصاره *S. bachtiarica* غلظت‌های $200-100 \mu\text{g/ml}$ آزمایش شد. اثر حفاظتی این عصاره از غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ شروع می‌شود و به‌صورت وابسته به دوز افزایش می‌یابد و بیش‌ترین اثر حفاظتی مربوط به غلظت $200 \mu\text{g/ml}$ می‌باشد (نمودار- ۱). اثر حفاظتی عصاره گیاه *S. officinallis* از غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ شروع می‌شود و به‌صورت وابسته به دوز افزایش می‌یابد و برای این عصاره

در طیف غلظتی $200-100 \mu\text{g/ml}$ انکوبه شدند. غلظت‌های مورد نظر از عصاره‌های گیاهی از استوک $2000 \mu\text{g/ml}$ عصاره‌های حل شده در بافر PBS تهیه گردید. عصاره‌هایی که در بافر PBS حل نمی‌شدند ابتدا محلول استوک عصاره در دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) تهیه گردید و غلظت‌های مورد نظر با رقیق کردن محلول استوک با محیط کشت به‌دست آمد. غلظت نهایی DMSO در محیط ۱٪ بود. میزان بقای سلول‌ها بعد از سپری شدن زمان انکوباسیون به‌وسیله اندازه‌گیری فورمازان تولید شده از احیای MTT مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای بررسی اثر عصاره‌های مورد مطالعه میزان بقای سلول‌ها بعد از ۲۴ ساعت به روش سنجش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش به‌منظور تایید عدم سمیت عصاره‌ها در محدوده غلظتی مورد مطالعه بر روی سلول‌های PC12 انجام گرفت.^۹

اندازه‌گیری میزان بقای سلول‌ها به روش MTT: بعد از اتمام زمان انکوباسیون محیط کشت سلول‌ها با محیط تازه تهیه شده تعویض گردید و به هر خانه پلیت از محلول استوک MTT اضافه گردید به‌طوری که غلظت نهایی MTT در محیط کشت 0.5 mg/ml باشد سپس پلیت‌ها به‌مدت چهار ساعت در انکوباتور انکوبه گردیدند. در مدت زمان انکوباسیون ترکیب MTT توسط سلول‌های زنده به ماده فورمازان احیا می‌شود که در محیط مائی غیر محلول است. بنابراین بعد از اتمام زمان انکوباسیون محیط رویی هر چاهک را به آرامی خارج کرده و به منظور حل کردن بلورهای فورمازان تولید شده به هر چاهک 100 میکرولیتر DMSO اضافه گردید و بعد از حل شدن کامل بلورهای فورمازان، جذب نوری توسط دستگاه الیزا ریدر (Bio Tech, USA) در طول موج 570 نانومتر در برابر طول موج رفرانس 630 نانومتر خوانده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار آماری GraphPad Prism 4 صورت گرفت. برای مقایسه میانگین‌های گروه‌های مورد مطالعه از تست آماری One-way ANOVA و Newman-Keuls Post test استفاده گردید. تمامی آزمایش‌ها به صورت سه بار تکرار انجام شده است و نتایج به صورت درصد کنترل بیان گردیده است.

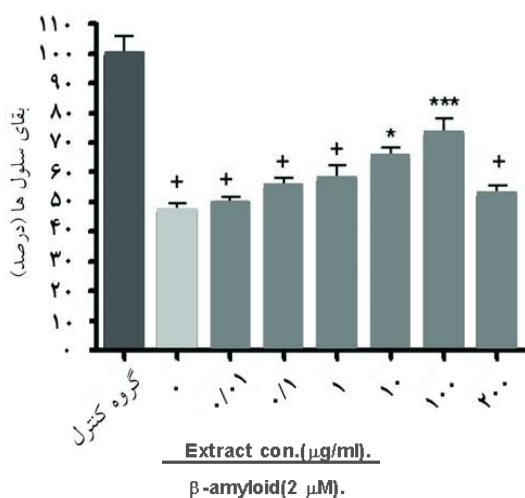
یافته‌ها

اثر حفاظتی عصاره‌های مورد مطالعه بر سمیت ناشی از پپتید

جدول- ۱: مقایسه اثر حفاظتی عصاره‌ها در غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ در برابر سمیت بتآمیلوئید

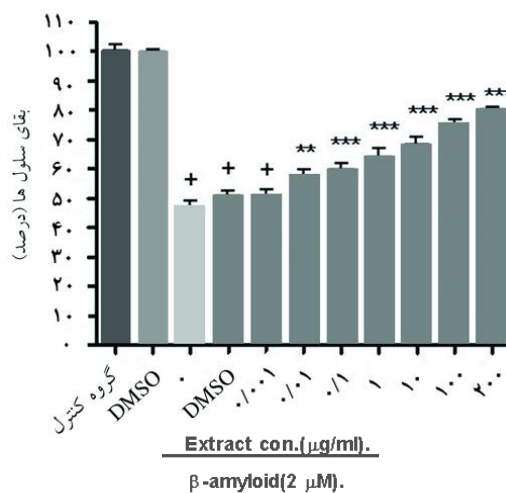
درصد بقای سلول‌ها (Viability)	بتآمیلوئید
(میانگین \pm خطای استاندارد از میانگین)	
$52/77 \pm 3/97$	بتآمیلوئید
$73/05 \pm 4/8^{***}$	<i>Salvia macrosiphon</i>
$74/9 \pm 1/72^{***}$	<i>Salvia officinallis L</i>
$75/61 \pm 1/48^{***}$	<i>Saturejabachtiarica</i>
$60/12 \pm 2/63^*$	<i>Saturejamutica</i>
$52/51 \pm 1/67$	<i>Salvia virgata</i>
$54/47 \pm 3/2$	<i>Salvia limbata</i>
$52/12 \pm 1/48$	<i>Salvia hypoleuca</i>

سلول‌های PC12 یک ساعت قبل از اضافه کردن بتآمیلوئید ($2 \mu\text{M}$) با عصاره‌ها انکوبه شدند و میزان بقای سلولی ۲۴ ساعت بعد اندازه‌گیری شده است.
* اختلاف معنی‌دار با گروه بتآمیلوئید را نشان می‌دهد (*** $P < 0.001$, * $P < 0.05$)



نمودار-۳: اثر حفاظتی *Salvia macrosiphon* در برابر سمیت بتا آمیلوئید

نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد از میانگین نشان داده شده است. + تفاوت معنی دار با گروه کنترل را نشان می دهد (P < 0/05). * تفاوت معنی دار با گروه بتا آمیلوئید را نشان می دهد (***) (P < 0/001), * (P < 0/05)



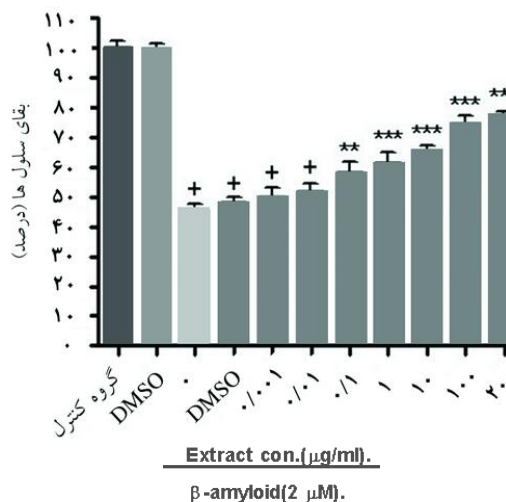
نمودار-۱: اثر حفاظتی *Satureja bachtiarica* در برابر سمیت بتا آمیلوئید

نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد از میانگین نشان داده شده است. + تفاوت معنی دار با گروه کنترل را نشان می دهد (P < 0/05). * تفاوت معنی دار با گروه بتا آمیلوئید را نشان می دهد (***) (P < 0/001), ** (P < 0/01), * (P < 0/05)

۱۰ اثر حفاظتی را نشان دادند در حالی که در غلظت بالاتر ۲۰۰ μg/ml اثر حفاظتی مشاهده نمی شود (نمودار-۳). در محدوده غلظتی که برای اثر حفاظتی عصاره ها انتخاب شده است هیچ کدام از عصاره ها اثر سمی بر روی سلول های PC12 نداشتند.

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که عصاره متانولی گیاهان *S.bachtiarica*, *S.officinalis*, *S.macrosiphon* از خانواده نعنائیان اثر چشمگیری در برابر سمیت ناشی از پپتید بتا آمیلوئید دارند. این اثر در مورد عصاره گیاهان *S.officinalis*, *S.bachtiarica* وابسته به غلظت می باشد و با افزایش غلظت اثرات حفاظتی نیز افزایش می یابد. متاسفانه به علت عدم حلالیت غلظت های بالاتر از ۲۰۰ μg/ml در محیط کشت این غلظت ها مورد آزمایش قرار نگرفت. در مورد عصاره گیاه *S.macrosiphon* حداکثر اثر حفاظتی در غلظت ۱۰۰ μg/ml مشاهده شد و در غلظت های بالاتر اثر حفاظتی کم شده است. این عصاره در غلظت ۲۰۰ μg/ml اثر سمی بر روی سلول های PC12 ندارد و اثر مشاهده شده به خاطر اثر سمی عصاره نمی باشد و موید این مطلب



نمودار-۲: اثر حفاظتی *Salvia officinalis* در برابر سمیت بتا آمیلوئید

نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد از میانگین نشان داده شده است. + تفاوت معنی دار با گروه کنترل را نشان می دهد (P < 0/05). * تفاوت معنی دار با گروه بتا آمیلوئید را نشان می دهد (***) (P < 0/001), ** (P < 0/01), * (P < 0/05)

هم بیشترین اثر حفاظتی مربوط به غلظت ۲۰۰ μg/ml می باشد (نمودار-۲). در *Salvia macrosiphon* غلظت های ۱۰۰ μg/ml و

بتآمیلوئید از طریق کاهش کلسیم داخل سلولی و کاهش تشکیل پروتئین‌های تاو محافظت می‌کند.^{۱۸} رزمارینیک اسید یک ترکیب فنلی ساده است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد. این ترکیب خاصیت پاک‌سازی (Scavenger) رادیکال‌های اکسیژن و رادیکال بسیار فعال پروکسی نیتريت را دارد^{۱۹} و در مطالعه صورت گرفته مشخص شده است که رزمارینیک اسید اثر محافظتی در برابر سمیت سلولی ناشی از پپتید بتآمیلوئید ایجاد می‌کند. رزمارینیک اسید از شکل‌گیری گونه‌های فعال اکسیژن فرایند لیپید پراکسیداسیون شکسته شدن DNA و فعال شدن کاسپاز-۳ که به وسیله پپتید بتآمیلوئید در سلول‌های PC12 ایجاد می‌گردد جلوگیری می‌نماید هم‌چنین مانع هیپرفسفوریلاسیون پروتئین تاو می‌گردد.^{۲۰} رزمارینیک اسید هم‌چنین قادر است آنزیم کولین استراز را مهار کند^{۱۹} و از این طریق هم می‌تواند اثرات حفاظتی خود را اعمال کند و اثرات حفاظتی مهار کننده‌های آنزیم کولین استراز در سمیت ناشی از پپتید بتآمیلوئید شناخته شده است.^۱

ترکیب اصلی در عصاره متانولی گیاه *S. bachtiarica* لوتئولین (Luteolin) نارینژین (Naringenin) و رزمارینیک اسید می‌باشد.^{۲۱} در مطالعات فارماکولوژیکی لوتئولین اثرات حفاظتی برای DNA در برابر H_2O_2 را داشته و اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی و پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد برای آن گزارش شده است.^{۲۲} نتایجی که از کشت سلول‌های SH-SY5Y به دست آمده نشان داده است که لوتئولین باعث کاهش تولید و ترشح پپتید بتآمیلوئید، تصحیح عمل میتوکندری و کاهش عوامل پیش‌برنده آپوپتوزیس می‌شود. لوتئولین باعث کاهش تولید ROS در داخل سلول‌ها و افزایش فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) می‌شود.^{۲۳} نارینژین نیز اثرات نوروپروتکتیو قابل توجهی دارد و از طریق مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش کلسیم داخل سلولی از مرگ سلول‌های عصبی جلوگیری می‌کند.^{۲۴} تجویز نارینژین در مدل حیوانی پارکینسون باعث بهبود علائم می‌شود و از تخریب نورون‌های دوپامینرژیک جلوگیری می‌کند.^{۲۵}

یکی دیگر از مکانیسم‌های سمیت بتآمیلوئید از طریق ایجاد التهاب می‌باشد. تزریق پپتید بتآمیلوئید در مغز حیوانات آزمایشگاهی باعث ایجاد پاسخ‌های التهابی شدیدی می‌شود که با افزایش بیان آنزیم سیکلواکسیژناز ۲، نیتریک اکساید سنتاز و تولید اینترلوکین-۱ همراه بوده است.^{۲۶} گزارشاتمی وجود دارد که بعضی عصاره‌های گیاهی و

است که اثر حفاظتی این عصاره وابسته به غلظت نمی‌باشد و در غلظت‌های بالاتر کاهش می‌یابد. چنین اثری در مورد اثر حفاظتی ترکیبات مهارکننده کولین استراز مثل دونپزیل و تاکرین در برابر سمیت پپتید بتآمیلوئید در کشت سلول گزارش شده است.^{۱۱} گیاهان خانواده نعناعیان به‌خصوص دو جنس مریم گلی و مرزه استفاده دارویی متعددی دارند. ترکیبات اصلی این گیاهان ترکیبات پلی‌فنلی، فلاونوئیدی و تریپنوییدی است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی دارند.^۶ یکی از مسیرهای سمیت پپتید بتآمیلوئید در سلول‌های PC12 استرس اکسیداتیو است. این پپتید باعث افزایش گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که در نهایت منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، اکسیداسیون پروتئین‌ها و آسیب‌های اکسیداتیو به DNA سلول می‌شود و از این طریق باعث القای مرگ سلول عصبی از طریق آپوپتوزیس یا نکروز می‌شود.^{۳،۱۱}

مطالعات نشان می‌دهند که عوامل آنتی‌اکسیدان می‌توانند با کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از پپتید بتآمیلوئید از مرگ سلول عصبی جلوگیری نمایند.^{۳،۱۲} بنابراین بخشی از اثرات حفاظتی مشاهده شده در این مطالعه را می‌توان به اثرات آنتی‌اکسیدانی این گیاهان نسبت داد. مطالعه‌ای که توسط Gohari انجام شده، نشان می‌دهد که عصاره متانولی گیاه *S. macrosiphon* اثر آنتی‌اکسیدانی زیادی دارد.^{۱۳} ترکیبات اصلی موجود در عصاره متانولی این گیاه شامل اپیزین-۷-O-گلوکوزید (apigenin-7-O-glucoside) و لوتئولین-۷-O-گلوکوزید (luteolin-7-O-glucoiside) می‌باشند.^{۱۴} اپیزین جزو ترکیبات فلاونوئیدی است که اثر آنتی‌اکسیدانی آن گزارش شده است. در سلول‌های نوروبلاستوما انسان (SH-SY5Y)، اپیزین، کاسپاز-۳ را غیر فعال کرده و باعث کاهش آپوپتوزیس ناشی از پراکسید هیدروژن می‌شود.^{۱۵}

ترکیبات اصلی موجود در عصاره *S. officinalis* عبارتند از رزمارینیک اسید، کافیک اسید، فرولیک اسید که جزو ترکیبات فنلی می‌باشند و لوتئولین-۷-گلوکوزید و آپیزین-۷-گلوکوزید که جزو ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشند. ترکیب عمده در عصاره متانولی رزمارینیک اسید است.^{۱۶} ترکیب اتیل استری فرولیک اسید اثر حفاظتی در برابر سمیت پپتید بتآمیلوئید در سلول‌های کشت داده شده هیپوکامپ داشته است که اثر آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی خود را اعمال می‌کند.^{۱۷} کافیک اسید سلول‌های PC12 را از اثرات سمی پپتید

از مرگ سلولی ناشی از پپتید بتا آمیلوئید جلوگیری می کنند و اثر حفاظتی مشاهده شده برای این گیاهان را می توان به این ترکیبات نسبت داد. البته از نقش سایر ترکیبات موجود در این گیاهان که مطالعه ای بر روی آن ها انجام نشده و نقش مکانیسم های دیگر مانند مهار مسیرهای التهابی و همچنین از احتمال اثر تجمعی این ترکیبات نمی توان چشم پوشی کرد که نیاز به مطالعات بیش تر دارد. نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که گیاهان *S. bachtiarica*, *S. officinalis* می توانند در درمان بیماری آلزایمر مورد توجه قرار گیرند.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل پایان نامه تحت عنوان "اثر حفاظتی عصاره متانولی استخراج شده از چند گونه *Salvia* و *Satureja* بر سمیت القا شده توسط پپتید β -آمیلوئید بر سلول های PC12" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۰ با کد ۶۸۰۸۵/۵۲ می باشد که با حمایت دانشگاه تربیت مدرس اجرا شده است، هم چنین این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "مطالعه اثر تعداد بیست عصاره گیاهی مختلف از گیاهان دارویی در بهبود بیماری آلزایمر" به کد ۹۱۰۸ می باشد که با حمایت مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران اجرا شده است.

ترکیبات موثره آن ها از طریق مهار مکانیسم های التهابی القا شده توسط پپتید بتا آمیلوئید از سمیت آن جلوگیری می کنند.^۵ به طور مثال تزریق فرولیک اسید به مدت چهار هفته قبل از تزریق پپتید بتا آمیلوئید در ناحیه هیپوکامپ موش سوری پاسخ های التهابی ناشی از آن را مهار می کند.^{۲۷} ترکیب Xylocozide G که ماده موثره یک گیاه دارویی مورد استفاده در طب سنتی چینی است از طریق کاهش بیان آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ و کاهش آزادسازی واسطه های التهابی شامل فاکتور نکروز دهنده توموری (TNF α) و ایترلوکین - ۱ و پروستاگلاندین E2 از سمیت پپتید بتا آمیلوئید جلوگیری می کند.^{۲۸} اثرات ضد التهابی برای گیاهان خانواده نعنائیان و ترکیبات موثره آن ها مثل رزمارینیک اسید گزارش شده است.^{۶،۹}

بنابراین، این احتمال دور از ذهن نیست که گیاهان مورد مطالعه از طریق مهار مکانیسم های التهابی از سمیت پپتید بتا آمیلوئید جلوگیری می نمایند که نیاز به مطالعه بیش تر دارد. به طور کلی نتیجه مطالعه حاضر نشان می دهد که عصاره متانولی گیاهان *S. bachtiarica*, *S. officinalis* اثرات حفاظتی چشمگیری در سمیت عصبی ناشی از پپتید بتا آمیلوئید دارند.

این گیاهان حاوی ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی می باشند که با مکانیسم های مختلف از جمله کاهش استرس اکسیداتیو و آپوپتوزیس

References

- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet* 2006;29:368(9533):387-403.
- Butterfield DA, Reed T, Newman SF, Sultana R. Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radic Biol Med* 2007;43(5):658-77.
- Miranda S, Opazo C, Larrondo LF, Muñoz FJ, Ruiz F, Leighton F, et al. The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 2000;62(6):633-48.
- Ono K, Hamaguchi T, Naiki H, Yamada M. Anti-amyloidogenic effects of antioxidants: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2006;1762(6):575-86.
- Anekonda TS, Reddy PH. Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease? *Brain Res Brain Res Rev* 2005;50(2):361-76.
- Naghbi F., Mosaddegh M., Mohammadi Motamed M., Ghorbani A. Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology. *Iran J Pharm Res (IJPR)* 2005;2:63-79.
- Zargari A. Medicinal Plants. Tehran: Tehran University Press; 1994. [Persian]
- Adams M, Gmünder F, Hamburger M. Plants traditionally used in age related brain disorders: a survey of ethnobotanical literature. *J Ethnopharmacol* 2007;113(3):363-81.
- Ge YS, Teng WY, Zhang CD. Protective effect of cyclophilin A against Alzheimer's amyloid beta-peptide (25-35)-induced oxidative stress in PC12 cells. *Chin Med J (Engl)* 2009;122(6):716-24.
- Svensson AL, Nordberg A. Tacrine and donepezil attenuate the neurotoxic effect of A beta(25-35) in rat PC12 cells. *Neuroreport* 1998;9(7):1519-22.
- Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol Med* 2001;7(12):548-54.
- Aliev G, Obrenovich ME, Reddy VP, Shenk JC, Moreira PI, Nunomura A, et al. Antioxidant therapy in Alzheimer's disease: theory and practice. *Mini Rev Med Chem* 2008;8(13):1395-406.
- Gohari AR, Hajimehdipoor H, Saeidnia S, Ajani Y, Hadjiakhoondi A. Antioxidant activity of some medicinal species using FRAP Assay. *J Med Plants* 2011;10(37):54-60.
- Gohari AR, Ebrahimi H, Saeidnia S, Foruzani M, Ebrahimi P, Ajani Y. Flavones and flavone glycosides from *Salvia macrosiphon* Boiss. *Iran J Pharm Res (IJPR)* 2011;10(2):247-51.
- Kang SS, Lee JY, Choi YK, Kim GS, Han BH. Neuroprotective effects of flavones on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Bioorg Med Chem Lett* 2004;14(9):2261-

- 4.
16. Shekarchi M, Hajimehdipoor H, Saeidnia S, Gohari AR, Hamedani MP. Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family. *Pharmacogn Mag* 2012;8(29):37-41.
17. Sultana R, Ravagna A, Mohammad-Abdul H, Calabrese V, Butterfield DA. Ferulic acid ethyl ester protects neurons against amyloid beta-peptide(1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: relationship to antioxidant activity. *J Neurochem* 2005;92(4):749-58.
18. Sul D, Kim HS, Lee D, Joo SS, Hwang KW, Park SY. Protective effect of caffeic acid against beta-amyloid-induced neurotoxicity by the inhibition of calcium influx and tau phosphorylation. *Life Sci* 2009;84(9-10):257-62.
19. Petersen M, Simmonds MSJ. Molecules of interest rosmarinic acid. *Phytochem* 2003;62:121-5.
20. Iuvone T, De Filippis D, Esposito G, D'Amico A, Izzo AA. The spice sage and its active ingredient rosmarinic acid protect PC12 cells from amyloid-beta peptide-induced neurotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;317(3):1143-9.
21. Gohari A, Davood A, Saeidnia S, Khodabakhsh A. Phytochemical Investigation of Satureja Bachtiarica. [Thesis] Tehran: Islamic Azad University of Tehran, 1388-1389. [Persian].
22. Cheng HY, Hsieh MT, Tsai FS, Wu CR, Chiu CS, Lee MM, et al. Neuroprotective effect of luteolin on amyloid beta protein (25-35)-induced toxicity in cultured rat cortical neurons. *Phytother Res* 2010;24 Suppl 1:S102-8.
23. Liu R, Meng F, Zhang L, Liu A, Qin H, Lan X, et al. Luteolin isolated from the medicinal plant *Elsholtzia rugulosa* (Labiatae) prevents copper-mediated toxicity in β -amyloid precursor protein Swedish mutation overexpressing SH-SY5Y cells. *Molecules* 2011;16(3):2084-96.
24. Braidy N, Grant R, Adams S, Guillemin GJ. Neuroprotective effects of naturally occurring polyphenols on quinolinic acid-induced excitotoxicity in human neurons. *FEBS J* 2010;277(2):368-82.
25. Zbarsky V, Datla KP, Parkar S, Rai DK, Aruoma OI, Dexter DT. Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and naringenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Free Radic Res* 2005;39(10):1119-25.
26. Giovannini MG, Scali C, Prosperi C, Bellucci A, Vannucchi MG, Rosi S, et al. Beta-amyloid-induced inflammation and cholinergic hypofunction in the rat brain in vivo: involvement of the p38MAPK pathway. *Neurobiol Dis* 2002;11(2):257-74.
27. Cho JY, Kim HS, Kim DH, Yan JJ, Suh HW, Song DK. Inhibitory effects of long-term administration of ferulic acid on astrocyte activation induced by intracerebroventricular injection of beta-amyloid peptide (1-42) in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;29(6):901-7.
28. Yu Y, Zhou L, Sun M, Zhou T, Zhong K, Wang H, et al. Xylocoside G reduces amyloid- β induced neurotoxicity by inhibiting NF- κ B signaling pathway in neuronal cells. *J Alzheimers Dis* 2012;30(2):263-75.

Protective effects of some medicinal plants from Lamiaceae family against beta-amyloid induced toxicity in PC12 cell

Parvine Balali M.Sc.¹
Maliheh Soodi Ph.D.^{1*}
Soodabeh Saeidnia Ph.D.²

1- Department of Toxicology,
School of Medical Sciences, Tarbiat
Modares University, Tehran, Iran.
2- Medicinal Plants Research
Center, Faculty of Pharmacy,
Tehran University of Medical
Sciences, Tehran, Iran.

* Corresponding author: Dept. of
Toxicology, School of Medical Sciences,
Tarbiat Modares University, Al-Ahmad
High way, Tehran, Iran.
Tel: +98-21-82884549
E-mail: soodi@modares.ac.ir

Abstract

Received: January 29, 2012 Accepted: July 09, 2012

Background: Excessive accumulation of beta-amyloid peptide (A β), the major component of senile plaques in Alzheimer's disease (AD), causes neuronal cell death through induction of oxidative stress. Therefore, antioxidants may be of use in the treatment of AD. The medicinal plants from the *Lamiaceae* family have been widely used in Iranian traditional medicine. These plants contain compounds with antioxidant activity and some species in this family have been reported to have neuroprotective properties. In the present study, methanolic extract of seven plants from *salvia* and *satureja* species were evaluated for their protective effects against beta-amyloid induced neurotoxicity.

Methods: Aerial parts of the plants were extracted with ethyl acetate and methanol, respectively, by percolation at room temperature and subsequently, methanolic extracts of the plants were prepared. PC12 cells were incubated with different concentrations of the extracts in culture medium 1h prior to incubation with A β . Cell toxicity was assessed 24h after addition of A β by MTT assay.

Results: *Satureja bachtiarica*, *Salvia officinalis* and *Salvia macrosiphon* methanolic extracts exhibited high protective effects against A β induced toxicity (P<0.001). Protective effects of *Satureja bachtiarica* and *Salvia officinalis* were dose-dependent.

Conclusion: The main constituents of these extracts are polyphenolic and flavonoid compounds such as rosmarinic acid, naringenin, apigenin and luteolin which have antioxidant properties and may have a role in neuroprotection. Based on neuroprotective effect of these plants against A β induced toxicity, we recommend greater attention to their use in the treatment of Alzheimer disease.

Keywords: alzheimer, β -amyloid, *Lamiaceae* family, neurotoxicity.