Original Article

Study of the Protective Effects of Seven Iranian Medicinal Plant Extracts against Beta-Amyloid Induced Cytotoxicity in PC12 Cells

Maliheh Soodi[1*], Homa Hajimehdipoor[2], Nasim Ataei[3], Shole Akbari[3]

1- Assistant Professor, Department of Toxicology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Traditional Medicine and Materia Medica Research Center and Department of Traditional Pharmacy, School of Traditional Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- M.Sc., Department of Toxicology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: Postal Code: 1411713116, Department of Toxicology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: Soodi@modares.ac.ir

Received: 21/Dec/2016, Accepted: 25/Jan/2017

Abstract

Objective: Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia in the elderly. One of the major pathological hallmarks of AD is extracellular deposition of aggregated beta-amyloid (Aβ) peptide in the brain. Aβ causes neural cell death through several mechanisms. New treatments for AD focus on compounds that can modify disease progression and reduce symptoms through several mechanisms. Medicinal plants include several compounds with heterogeneous pharmacological effects that can be effective in the treatment of AD through different mechanisms. The aim of this study is to evaluate the protective effect of a methanolic extract of seven medicinal plants from Iran on Aβ induced toxicity in a cell culture model.

Methods: We cultured PC12 cells according to standard protocols. The cells were incubated with Aβ alone or with different concentrations of extracts for 24 hours. Cell viability was measured using the MTT assay.

Results: *Sanguisorba minor, Cerasus microcarpa, Ferulago angulate,* and *Rosa canina* significantly reduced Aβ-induced cell death in the PC12 cell culture. The observed protective effects of extracts were dose-dependent. We did not observe any protective effects with the *Stachys pilifera, Amygdalus scoparia,* and *Alhagi pseudalhagi* extracts.

Conclusion: *Sanguisorba minor, Cerasus microcarpa, Ferulago angulate, and Rosa canina* extracts could be considered for treatment of AD.

Keywords: Beta amyloid, Alzheimer's disease, Medicinal plants, Neurotoxicity, Cell culture

Pathobiology Research, Vol. 19 (2016-2017), No.3, Pages: 45-58

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

مقاله اصیل

مطالعه آثار حفاظتی تعداد هفت عصاره گیاهی مختلف از گیاهان دارویی ایران در برابر سمیت ناشی از پپتید بتاآمیلویید در کشت سلول‌های PC12

ملیحه سودی[1*]، هما حاجی مهدی پور[2]، نسیم عطایی[3]، شعله اکبری[3]

۱- استادیار، گروه سم شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، مرکز تحقیقات طب سنتی و مفردات پزشکی و گروه داروسازی سنتی، دانشکده طب سنتی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد،گروه سم شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه سم شناسی
Email: Soodi@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۵/۱۰/۰۱ پذیرش مقاله: ۹۵/۱۱/۰۶

چکیده

هدف: بیماری آلزایمر شایع ترین شکل زوال عقل در پیری است. مهم‌ترین عامل آسیب‌شناختی این بیماری رسوبات خارج سلولی پپتید بتا آمیلویید است که از طریق مکانیسم‌های مختلف باعث مرگ سلول‌های عصبی می‌شود. درمان‌های جدید روی ترکیباتی تمرکز می کنند که از طریق چند مکانیسم بتوانند در بهبود این بیماری مؤثر باشند. گیاهان دارویی، به خاطر دارا بودن ترکیبات متعدد، با آثار فارماکولوژیک گوناگون، از طریق مکانیسم‌های مختلف، می‌توانند در درمان این بیماری، مؤثر باشند. هدف از این مطالعه، بررسی اثر حفاظتی عصاره متانولی هفت گیاه از گیاهان دارویی ایران بر سمیت پپتید بتا آمیلویید در مدل سلولی PC12 است.

مواد و روش‌ها: عصاره‌گیری از گیاهان با حلال متانول به روش ماسیراسیون در دمای اتاق انجام گرفت. سلول‌های PC12 طبق برنامه استاندارد کشت داده شدند. سپس سلول‌ها با پپتید بتا آمیلویید به تنهایی و به همراه غلظت‌های مختلف عصاره‌ها به‌مدت ۲٤ ساعت انکوبه شدند و میزان بقای سلولی با استفاده از روش MTT اندازه‌گیری شد.

نتایج: از بین عصاره‌های مورد مطالعه، عصاره گیاهان *Sanguisorba minor*، *Cerasus microcarpa*، *Ferulago angulata*، *Rosa canina* توانستند مرگ سلولی ناشی از پپتید بتا آمیلویید را در کشت سلول‌های PC12 کاهش دهند. اثر حفاظتی مشاهده شده برای این عصاره‌ها وابسته به دوز بود. عصاره گیاهان *Stachys pilifera*، *Amygdalus scoparia* و *Alhagi pseudalhagi* آثار حفاظتی نشان ندادند.

نتیجه‌گیری: با توجه به این نتایج عصاره گیاهان *Sanguisorba minor*، *Cerasus microcarpa*، *Ferulago angulata*، *Rosa canina* می‌توانند در درمان بیماری آلزایمر مورد توجه قرار گیرند.

کلیدواژگان: بتاآمیلویید، آلزایمر، گیاهان دارویی، سمیت عصبی، کشت سلول

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵، صفحات: ۴۵-۵۸

مقدمه

بیماری آلزایمر (Alzheimer's disease) یک اختلال تخریب کننده سیستم عصبی (Neurodegenerative)

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

پیشرونده غیر قابل برگشت است که شایع‌ترین عامل زوال عقل در پیری است. این بیماری به تدریج باعث کاهش حافظه، یادگیری و مهارت‌های درکی فرد می‌شود و در موارد پیشرفته فرد را در انجام کارهای روزانه ناتوان می‌کند [۱]. حدود ۲۶ میلیون نفر در دنیا از این بیماری رنج می‌برند که البته انتظار می‌رود به دلیل افزایش در جمعیت سالخورده تعداد بیماران آلزایمری تا سال۲۰۵۰ چهار برابر شود. بنابراین بیماری آلزایمر یکی از چالش‌های بزرگ در زمینه بهداشت و درمان سالخوردگان است و نیاز به مطالعات بیشتر برای یافتن داروهای مؤثر برای پیشگیری و درمان دارد [۲].

بیماری آلزایمر یک بیماری پیچیده است و با وجود مطالعات متعدد هنوز علت ایجاد این بیماری ناشناخته است. مهم‌ترین نظریه‌هایی که در ارتباط با علت ایجاد این بیماری وجود دارد شامل نقص عملکرد سیستم کولینرژیک (Cholinergic system) [۳]، تشکیل رسوبات خارج سلولی پپتید بتا آمیلویید (Amyloid β peptide) [٤، ٥] و استرس اکسیداتیو است [٦].

مهم‌ترین یافته آسیب‌شناختی در مغز بیماران آلزایمری وجود پلاک‌های پیری است که هسته اصلی تشکیل دهنده آن پپتید بتا آمیلویید است. پپتید بتا آمیلویید یک پپتید ٤٠-٤٢ اسید آمینه‌ای است که از شکسته شدن پروتئین پیش ساز آمیلویید (APP) به‌وسیله آنزیم‌های پروتئولیتیک بتا سکرتاز (β secretase) و گاما سکرتاز به‌وجود می‌آید. این پپتید در حالت منومر محلول و فرم تجمع یافته آن نامحلول است و به‌صورت خارج سلولی رسوب می‌نماید. مطالعات نشان داده‌اند که فرم تجمع یافته پپتید بتا آمیلویید سمی است و باعث مرگ سلول‌های عصبی می‌شود. بنابراین پپتید بتا آمیلویید به‌عنوان عامل اصلی تخریب نورونی در مغز بیماران آلزایمری شناخته شده است [۱، ٤، ٥]. پپتید بتا آمیلویید از طریق چندین مکانیسم مثل: استرس اکسیداتیو (Oxidative stress)، اختلال در اعمال میتوکندری، تغییر در نفوذپذیری غشا، التهاب، اختلال سیناپتیک اثر سمیت خود را اعمال می‌کند [۷]. ترکیباتی که بتوانند از تولید یا تجمع این پپتید جلوگیری کند یا اثر حفاظتی در برابر سمیت این پپتید داشته باشد می‌توانند در درمان بیماری آلزایمر نقش داشته باشد [۸، ۹].

استرس اکسیداتیو نقش مهمی در ایجاد و پیشرفت بیماری آلزایمر دارد. شواهد زیادی از آسیب‌های اکسیداتیو ماکرومولکول‌ها در مغز بیماران آلزایمری وجود دارد. تولید گونه‌های فعال اکسیژن باعث ایجاد آسیب‌های اکسیداتیو در پروتئین‌ها و در نتیجه تغییر عملکرد آن‌ها می‌شود همچنین باعث پراکسیداسیون لیپید و تولید متابولیت‌های سمی می‌شود که در نهایت به مرگ سلولی منجرمی‌شود [۱۰]. پپتید بتا آمیلویید به‌صورت مستقیم یا غیر مستقیم در تولید گونه‌های فعال اکسیژن نقش دارد [٦، ۱۱]. ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌توانند سمیت سلولی پپتید بتا آمیلویید را کاهش دهند؛ همچنین مطالعات بالینی نشان داده است که ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌توانند پیشرفت بیماری را کند کنند [۱۲].

فرضیه نقص سیستم کولینرژیک یکی از اولین فرضیه‌هایی است که در ارتباط با بیماری آلزایمر مطرح است [۱۳] چون در این بیماری میزان ناقل شیمیایی (Neurotransmitter) استیل کولین (Acetylcholine) کاهش می‌یابد. بنابراین مهار آنزیم کولین استراز (Cholinesterase) به‌عنوان هدف دارویی برای درمان این بیماری مطالعه شد. اکثر داروهای موجود برای درمان این بیماری شامل تاکرین (Tacrine) ریواستگمین (Rivastigmine) و دونپزیل (Donepezil) در این دسته قرار می‌گیرد [١٤].

با وجود مطالعات زیادی که در زمینه درمان بیماری آلزایمر انجام شده است هنوز درمان قطعی برای این بیماری وجود ندارد و داروهای موجود برای این بیماری فقط علایم بیماری را کاهش می‌دهد. همچنین این داروها عوارض جانبی زیادی به بیمار تحمیل می‌کند. بنابراین نیاز به داروهایی که مؤثرتر باشد و عوارض کمتری داشته باشد وجود دارد [۹]. گیاهان دارویی می‌توانند منبع درمان‌های جدید برای بیماری

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

آلزایمر باشد. با توجه به ماهیت بیماری آلزایمر که یک بیماری با پاتوفیزیولوژی پیچیده است، درمان‌های جدید روی ترکیباتی تمرکز می‌کند که بتواند از طریق مکانیسم‌های مختلف در بهبود علایم و پیشرفت این بیماری مؤثر باشد. گیاهان به علت دارا بودن ترکیبات متعدد، آثار فارماکولوژیک متنوعی دارد که می‌تواند در مراحل مختلف این بیماری مؤثر باشد و به همین علت کانون توجه مطالعات در این زمینه قرار گرفته‌است. گیاهان متعدد همچنین منبع ترکیبات آنتی‌اکسیدان طبیعی هستند که می‌توانند از طریق کاهش استرس اکسیداتیو در پیشگیری و کند کردن روند پیشرفت بیماری مؤثر باشند [۱۵-۱۷].

در طب سنتی ایران گیاهان زیادی برای تقویت حافظه و همچنین در درمان بیماری نسیان یا فراموشی معرفی شده‌است. در سال‌های اخیر مطالعه روی بعضی از این گیاهان مثل بادرنجبویه (*Melissa officinalis*)، زعفران (*Crocus sativus*) و سیاه دانه (*Nigella sativa*) در مدل‌های حیوانی بیماری آلزایمر اثر بخشی آن‌ها را تأیید کرده است [۱۸-۲۰] همچنین این گیاهان حتی در مطالعات بالینی نیز در بیماران مبتلا به آلزایمر باعث بهبود بیماری شده‌اند [۲۱، ۲۲].

در این مطالعه هفت گیاه از گیاهان دارویی ایران انتخاب شد که شامل *Sanguisorba minor*، *Cerasus microcarpa*، *Ferulago angulata*، *Alhagi pseudalhagi*، *Stachys pilifera*، *Amygdalus scoparia* و *Rosa canina* هستند. نام محلی و بومی این گیاهان به ترتیب توت روباه، آلبالوی دانه ریز، چویر سه پاره، خارشتر خزری، سنبله‌ای مودار، بادام کوهی و نسترن وحشی است. در مطالعه‌های قبلی نشان داده شده است که این گیاهان نقش مهار آنزیم کولین استراز را دارند [۲۳-۲۵]. به همین دلیل برای مطالعه بیشتر این گیاهان در زمینه استفاده در درمان بیماری آلزایمر در این مطالعه اثر حفاظتی آنان در برابر سمیت سلولی ناشی از بتا آمیلویید در مدل سلولی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

مواد

رده سلولی PC12 از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. Poly-D-lysin (PDL) از شرکت Santa Cruz Biotechnology آمریکا، پپتید بتا آمیلویید (Aβ 25-35) از شرکت Enzo Life Sciences آمریکا و MTT [3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2 diphenyltetrazolium bromide] از شرکت Atocel اتریش خریداری شد محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)، تریپسین (Trypsin) و سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum: FBS) از شرکت Gibco آمریکا تهیه شد. حلال‌های مورد استفاده از شرکت Merck آلمان خریداری شد. کلیه مراحل انجام این طرح در کمیته اخلاق مرکز تحقیقات طب سنتی دانشگاه شهید بهشتی مورد تصویب قرار گرفته است و با شماره پرونده ۱۵۷/ق/۹۳ درآن مرکز ثبت شده است.

مشخصات گیاهان و روش عصاره‌گیری از آن‌ها

مشخصات گیاهان مورد مطالعه در این تحقیق در جدول ۱ آمده است. این گیاهان از محل رویش‌شان جمع‌آوری شدند و توسط گیاه‌شناسان مرکز تحقیقات طب سنتی و مفردات پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی شناسایی شدند. نمونه هرباریومی این گیاهان در هرباریوم این مرکز نگهداری می‌شوند.

گیاهان بعد از جمع‌آوری خشک و آسیاب شد. عصاره‌گیری از پودر گیاهان به روش خیساندن (Maceration) با استفاده از حلال متانول (۱:۱۰) و به‌مدت ۲۴ ساعت صورت گرفت. بعد از گذشت ۲۴ ساعت مخلوط صاف شد و با روش تقطیر در خلأ تغلیظ شد [۲۴].

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

جدول ۱ مشخصات گیاهان مورد مطالعه

ردیف	نام گیاه		خانواده	قسمت مورد استفاده	محل جمع‌آوری	شماره هرباریومی
	نام علمی	نام فارسی				
۱	*Sanguisorba minor*	توت روباه	Rosaceae	قسمت‌های هوایی	همدان	TMRC 3545
۲	*Cerasus microcarpa*	آلبالوی دانه ریز	Rosaceae	سر شاخه هوایی	کهگیلویه و بویراحمد	TMRC 2870
۳	*Ferulago angulata*	چویر سه پاره	Apiaceae	قسمت‌های هوایی	کهگیلویه و بویراحمد	TMRC 2800
٤	*Alhagi pseudalhagi*	خارشتر خزری	Fabaceae	قسمت‌های هوایی	کهگیلویه و بویراحمد	TMRC 3281
٥	*Stachys pilifera*	سنبله‌ای مودار	Lamiaceae	قسمت‌های هوایی	کهگیلویه و بویراحمد	TMRC 2175
٦	*Amygdalus scoparia*	بادام کوهی	Rosaceae	قسمت‌های هوایی	کهگیلویه و بویراحمد	TMRC 1998
۷	*Rosa canina*	نسترن وحشی	Rosaceae	میوه	کهگیلویه و بویراحمد	TMRC 2343

روش تهیه محلول استوک عصاره‌ها

برای تهیه محلول استوک عصاره‌ها ابتدا ۲ میلی‌گرم عصاره در ۱۰۰ میکرولیتر حلال DMSO (Dimethyl sulfoxide) حل شد تا استوک ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شود. از محلول استوک اولیه محلول ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در بافر PBS (Phosphate buffered saline) تهیه شد. رقت‌های بعدی در محیط کشت تهیه شد.

نحوه کشت سلول‌های PC12

سلول‌های PC12 در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) پنی‌سیلین (Penicillin) ۱۰۰ واحد بین‌المللی و استرپتومایسین (Streptomycin) ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در فلاسک استریل کشت سلول پوشش داده شده با PDL (Poly-D-lysine) و در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار CO_2 ۵ درصد کشت داده شدند.

بررسی تأثیر عصاره‌ها بر بقای سلول‌های PC12

این آزمایش برای تعیین دوزی از عصاره‌ها که روی سلول‌های PC12 اثر کشندگی نداشته باشد انجام گرفت تا بررسی اثر حفاظتی عصاره‌ها در محدوده غلظتی از آن‌ها که اثر سمی روی سلول‌های PC12 نداشته باشد، انجام گیرد. برای بررسی اثر عصاره‌های مورد مطالعه روی سلول‌های PC12، سلول‌ها با غلظت 10^4 سلول در هر چاهک پلیت‌های ۹٦ خانه پوشش داده شده با PDL کشت داده شدند و ۲٤ ساعت بعد محیط کشت سلول‌ها با محیط حاوی عصاره‌ها با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعویض شد و به‌مدت ۲٤ ساعت دیگر با محیط حاوی عصاره‌ها انکوبه شدند. میزان بقای سلول‌ها بعد از ۲٤ ساعت به روش سنجش MTT ارزیابی شد.

بررسی اثر حفاظتی عصاره‌ها بر سمیت ناشی از بتا آمیلویید در سلول‌های PC12

برای بررسی اثرحفاظتی عصاره‌ها بر سمیت القا شده توسط بتا آمیلویید، سلول‌ها با غلظت 10^4 سلول در هر چاهک پلیت‌های ۹٦ خانه پوشش داده شده با PDL کشت داده شدند. بعد از ۲٤ ساعت پپتید بتا آمیلویید به محیط کشت اضافه شد. در این مطالعه اثر حفاظتی عصاره‌ها بر سمیت ناشی از دو غلظت ۰/۱ و ۰/۵ میکرومولار بتا آمیلویید بررسی شد. محلول استوک پپتید بتا آمیلویید با غلظت ۱ میلی‌مولار با حل کردن یک میلی‌گرم پودر پپتید در ۱ میلی‌لیتر آب مقطراستریل تهیه شد. محلول استوک قبل از اضافه شدن به محیط به‌مدت سه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا فرم تجمع یافته آن تشکیل شود. در گروه‌های تیمار سلول‌ها یک ساعت قبل از اضافه کردن پپتید بتا آمیلویید با

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

عصاره‌ها در محدوده غلظتی مورد مطالعه انکوبه شدند. میزان بقای سلول‌ها بعد از سپری شدن زمان انکوباسیون به روش MTT ارزیابی شد.

اندازه‌گیری میزان بقای سلول‌ها به روش MTT

بعد از اتمام زمان انکوباسیون محیط کشت سلول‌ها با محیط حاوی MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعویض شد. سپس پلیت‌ها به‌مدت ٤ ساعت در انکوباتور CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در مدت زمان انکوباسیون ترکیب MTT توسط سلول‌های زنده به ماده فورمازان (Formazan) احیا می‌شود که در محیط آبی غیر محلول است. بنابراین بعد از اتمام زمان انکوباسیون محیط رویی هر چاهک به آرامی خارج شد و به منظور حل کردن بلورهای فورمازان تولید شده به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و بعد از حل شدن کامل بلورهای فورمازان، جذب نوری توسط دستگاه قرائت‌گر الایزا (ELISA Reader) در طول موج ۵۷۰ نانومتر در برابر طول موج مرجع ٦۳۰ نانومتر خوانده شد.

بررسی‌های آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار آماری Graph Pad Prism 6 صورت گرفت. برای مقایسه میانگین‌های گروه‌های مورد مطالعه از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (one-way Analysis of Variance: ANOVA) و Newman-Keuls Post test استفاده شد. همچنین برای مقایسه آثار حفاظتی عصاره‌ها در دو غلظت بتا آمیلویید از آزمون آماری آنالیز واریانس دوطرفه و Benferoni post test استفاده شد. تمامی آزمایش‌ها به‌صورت سه بار تکرار در پلیت‌های جداگانه انجام شد و در هر پلیت برای هر گروه ۵ بار تکرار در نظر گرفته شد. نتایج به‌صورت درصد کنترل بیان شده است.

نتایج

تأثیر عصاره‌ها بر بقای سلول‌های PC12

شکل ۱ الف تأثیر عصاره‌ها را بر بقای سلول‌های PC12 نشان می‌دهد. همان‌طور که از نمودار مشخص است فقط عصاره گیاه *Stachys pilifera* در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث کاهش بقای سلولی شده است و بقیه عصاره‌ها در بالاترین غلظت‌های مورد نظر سمیتی نداشته‌اند. به همین علت تأثیر عصاره گیاه *Stachys pilifera* در غلظت‌های مختلف روی سلول‌های PC12 بررسی شد تا غلظت غیر سمی عصاره تعیین شود. شکل ۱ ب نتایج تأثیر عصاره گیاه *Stachys pilifera* در غلظت‌های مختلف بر سلول‌های PC12 را نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که این عصاره در غلظت‌های کمتر از ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیترسمی نیست.

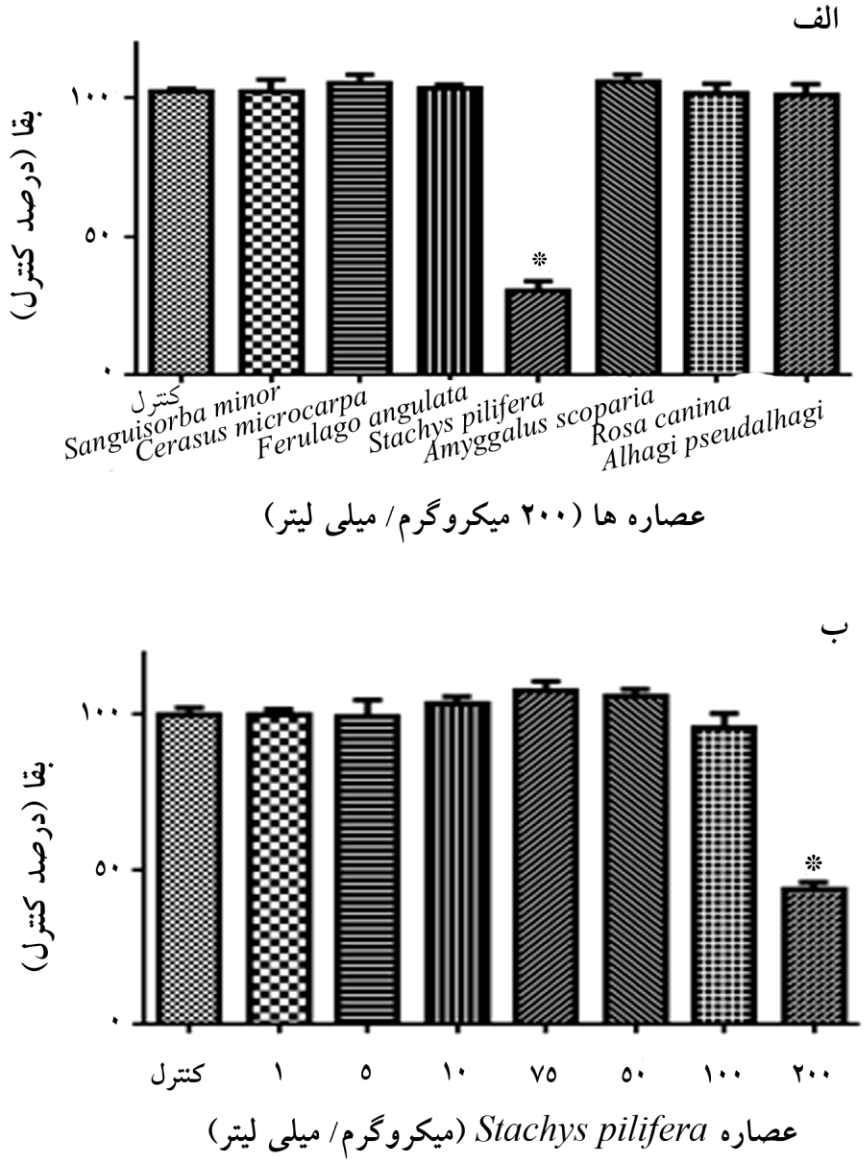
بررسی اثر حفاظتی عصاره‌ها بر سمیت ناشی از بتا آمیلویید در سلول‌های PC12

اثر حفاظتی عصاره‌های مورد مطالعه در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر سمیت ناشی از پپتید بتا آمیلویید ۰/۱ میکرومولار در شکل ۲ نشان داده شده است از بین عصاره‌های مورد آزمایش عصاره گیاهان *Sanguisorba minor*، *Cerasus microcarpa*، *Ferulago angulata*، *Rosa canina* اثر حفاظتی معنی‌داری نشان دادند. در حالی‌که پیش درمانی سلول‌ها با عصاره‌های *Alhagi pseudalhagi*، *Stachys pilifera* و *Amygdalus scoparia* اثر حفاظتی معنی‌داری نداشته است و این عصاره‌ها نتوانستند از سمیت ناشی از پپتید بتا آمیلویید جلوگیری نمایند.

اثر حفاظتی عصاره‌های *Ferulago angulate* و *Rosa canina* در محدوده غلظتی ۱۰-۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب در شکل‌های ۳ و ٤ و اثر حفاظتی عصاره‌های

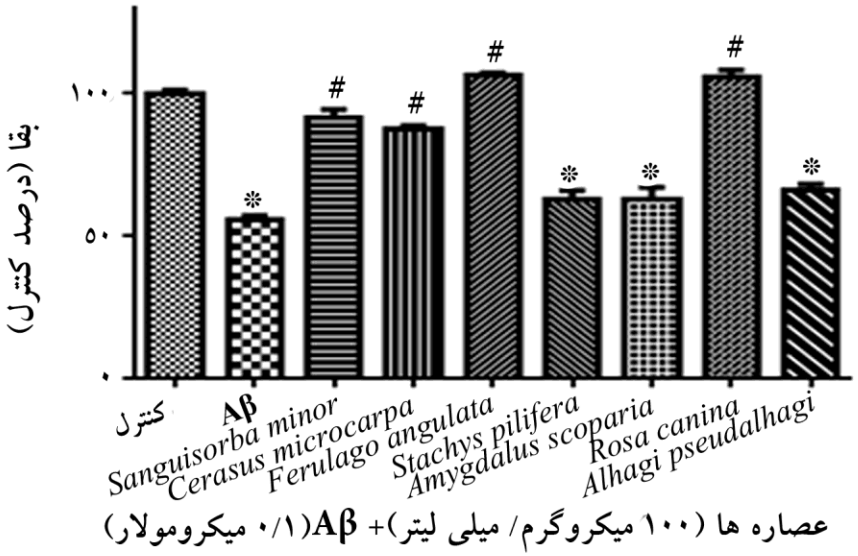
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

Sanguisorba minor و *Cerasus microcarpa* در محدوده غلظتی ۱۰-۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب در شکل‌های ۵ و ٦ نشان داده شده است. در هر چهار عصاره به‌صورت وابسته به دوز اثر حفاظتی دیده می‌شود. آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد که آثار حفاظتی عصاره‌های *Rosa canina* و *Cerasus microcarpa* در غلظت‌های متفاوت بتا آمیلویید (۰/۱ و ۰/۵ میکرومولار) تفاوت معنی‌داری ندارند ولی اثر حفاظتی عصاره‌های *Sanguisorba minor* و *Ferulago angulata* در غلظت‌های متفاوت بتاآمیلویید (۰/۱ و ۰/۵ میکرومولار) تفاوت معنی‌داری دارند.

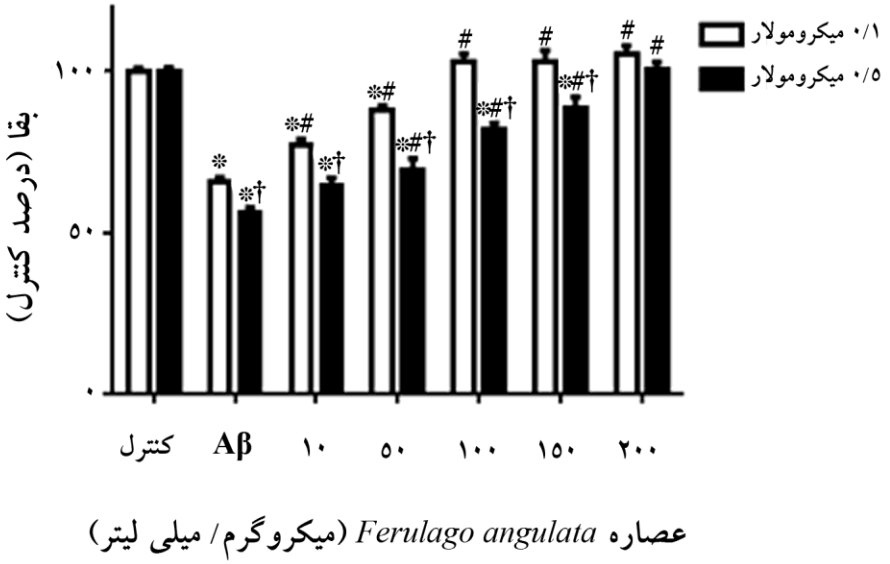


شکل ۱ بررسی تأثیر عصاره‌ها بر میزان بقای سلول‌های PC12؛ سلول‌ها با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ها به‌مدت ۲٤ ساعت مواجه شدند و میزان بقای سلولی به روش MTT ارزیابی شد (الف). بررسی عصاره گیاه *Stachys pilifera* در غلظت‌های مختلف بر میزان بقای سلول‌های PC12 (ب)، * تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل را نشان می‌دهد $p<۰/۰۰۱$

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

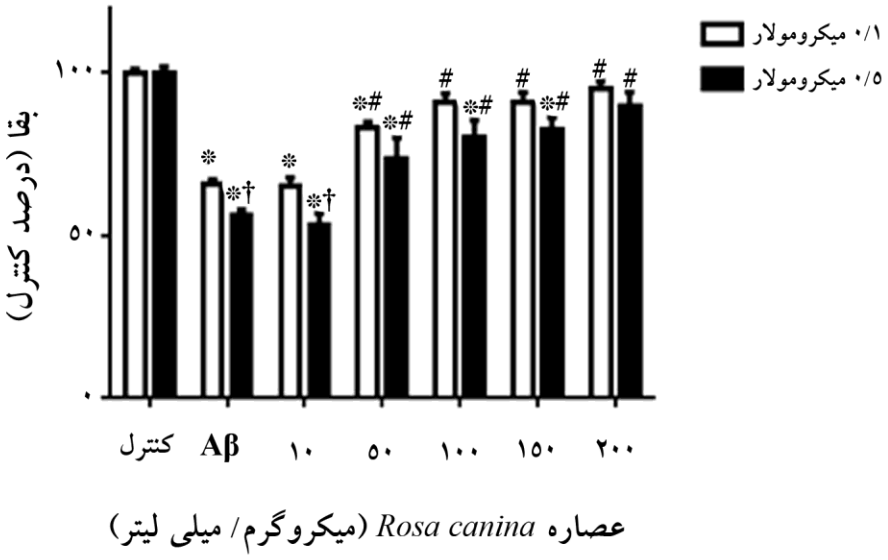


شکل ۲ بررسی اثر حفاظتی عصاره‌ها با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در برابر سمیت بتا آمیلوییـد (۰/۱ میکرومـولار) در سـلول‌هـای PC12؛ * تفـاوت معنـی‌دار با گروه کنترل را نشان می‌دهد ۰/۰۰۱ >p، # تفاوت معنی‌دار با گروه بتا آمیلوییـد را نشان می‌دهد ۰/۰۰۱>p

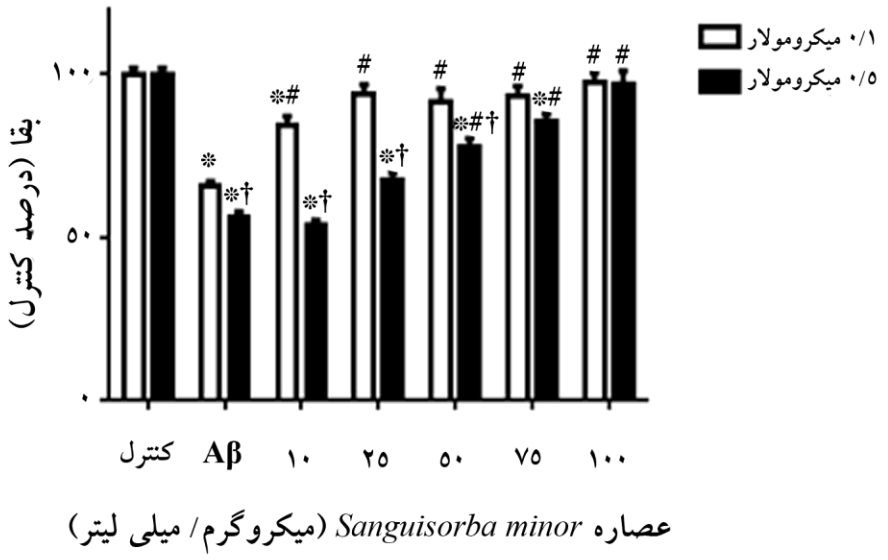


شکل ۳ بررسی اثر حفاظتی عصـاره *Ferulago angulate* در برابـر سـمیت بتـا آمیلوییـد در دو غلظـت ۰/۱ و ۰/۵ میکرومـولار در سـلول‌هـای PC12؛ * تفـاوت معنی‌دار با گروه کنترل را نشان می‌دهد، # تفاوت معنی‌دار با گروه بتا آمیلوییـد را نشان می‌دهد، † تفـاوت معنـی‌دار بـین تیمارهـا در دو غلظـت بتـا آمیلوییـد را نشـان می‌دهد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

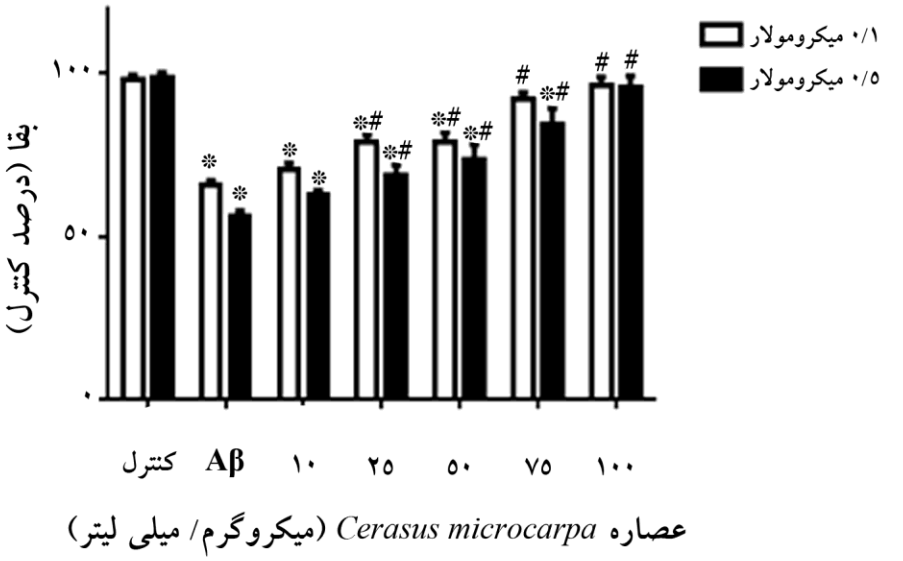


شکل ٤ بررسی اثر حفاظتی عصاره *Rosa canina* در برابر سمیت بتا آمیلویید در دو غلظت ۰/۱ و ۰/۵ میکرومولار در سلول‌های PC12؛ * تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل را نشان می‌دهد، # تفاوت معنی‌دار با گروه بتا آمیلویید را نشان می‌دهد، † تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در دو غلظت بتا آمیلویید را نشان می‌دهد.



شکل ٥ بررسی اثر حفاظتی عصاره *Sanguisorba minor* در برابر سمیت بتا آمیلویید در دو غلظت ۰/۱ و ۰/۵ میکرومولار در سلول‌های PC12؛ * تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل را نشان می‌دهد، # تفاوت معنی‌دار با گروه بتا آمیلویید را نشان می‌دهد، † تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در دو غلظت بتا آمیلویید را نشان می‌دهد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]



شکل ٦ بررسی اثر حفاظتی عصاره *Cerasus microcarpa* در برابر سمیت بتا آمیلویید در دو غلظت ۰/۱ و ۰/۵ میکرومولار در سلول‌های PC12؛ * تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل را نشان می‌دهد، # تفاوت معنی‌دار با گروه بتا آمیلویید را نشان می‌دهد، † تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در دو غلظت بتا آمیلویید را نشان می‌دهد.

بحث

در این مطالعه اثر حفاظتی هفت عصاره گیاهی شامل: *Cerasus microcarpa*، *Sanguisorba minor*، *Ferulago angulata*، *Alhagi pseudalhagi*، *Stachys pilifera*، *Amygdalus scoparia* و *Rosa canina* در برابر سمیت بتا آمیلویید در مدل سلولی برای استفاده در درمان بیماری آلزایمر بررسی شد. از بین عصاره‌های مورد مطالعه عصاره گیاهان *Sanguisorba minor*، *Cerasus microcarpa*، *Ferulago angulata*، *Rosa canina* اثر حفاظتی چشمگیری را در برابر سمیت بتا آمیلویید نشان دادند. همچنین نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که آثار حفاظتی عصاره گیاهان *Rosa canina* و *Cerasus microcarpa* وابستگی به غلظت بتا آمیلویید ندارد و در غلظت‌های متفاوت بتا آمیلویید آثار حفاظتی یکسانی مشاهده می‌شود در حالی‌که اثر حفاظتی عصاره گیاهان *Sanguisorba minor* و *Ferulago angulata* در برابر غلظت‌های متفاوت بتا آمیلویید یکسان نیست. به نظر می‌رسد این تفاوت در اثر حفاظتی مشاهده شده برای این گیاهان به علت درگیری مکانیسم‌های مختلف در اثر حفاظتی این عصاره‌ها باشد.

گیاه *Sanguisorba minor* از خانواده گل سرخیان یا روزاسه (*Rosaceae*) است. این گیاه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد التهابی و ضد سرطان است و می‌تواند در درمان آترواسکلروز (Atherosclerosis) و بیماری‌های عروقی به‌کار رود [٢٦] و همچنین می‌تواند فعالیت آنزیم استیل کولین استراز را مهار کند [٢٥]. همچنین عصاره این گیاه مهار کننده گیلیکوژن سنتاز کیناز 3β (Glycogen synthase kinase 3 beta: GSK 3β) است که نقش مهمی در بیماری‌زایی بیماری آلزایمر دارد [٢٧]. عصاره این گیاه حاوی مقادیر زیادی ترکیبات فنلی است [٢٦] و مهم‌ترین ترکیبات فنلی در این گیاه شامل گالیک اسید (Gallic acid)، الاجیک اسید

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

(Ellagic acid) و کوئرسیتین (Quercetin) است که آثار حفاظت کننده عصبی (Neuroprotective) این ترکیبات در مطالعات قبلی گزارش شده است [۲۸-۳۱].

Ferulago angulata گیاهی از خانواده چتریان (*Apiaceae*) با نام محلی چویر یا چویل است. عصاره این گیاه خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارد و همچنین حاوی ترکیبات کومارینی (Coumarin) است که اثر مهار کنندگی آنزیم کولین استراز و منوآمینواکسیداز (Monoamine oxidase: MAO) را دارد [۲۳، ۳۲]. مطالعات نشان داده که مهار کننده‌های آنزیم MAO-B و آگونیست‌های گیرنده دوپامین (Dopamine) خاصیت حفاظتی در برابر سمیت پپتید بتا آمیلویید دارد [۳۳].

گیاهان *Cerasus microcarpa* و *Rosa canina* نیز جزو خانواده گل سرخیان یا روزاسه (*Rosaceae*) است. مطالعات زیادی در مورد عصاره سرشاخه هوایی گیاه *Cerasus microcarpa* وجود ندارد. در یک مطالعه گزارش شده که عصاره این گیاه خاصیت مهار آنزیم کولین استراز را دارد [۲٤]. برای گیاه *Rosa canina* آثار حفاظت کننده عصبی گزارش شده است [۳٤].

مکانیسم‌های مختلفی برای سمیت سلولی بتا آمیلویید ذکر شده است و مطالعات روی گیاهان نشان داده است که عصاره‌های گیاهی از طریق مکانیسم‌های مختلف می‌تواند سمیت سلولی بتا آمیلویید را کاهش دهد. یکی از مکانیسم‌های درگیر در سمیت بتا آمیلویید 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 مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) یا نکروز (Necrosis) می‌شود [٦]. مطالعات نشان می‌دهد که ترکیبات گیاهی به خاطر اثر آنتی‌اکسیدانی می‌تواند با کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از پپتید بتا آمیلویید از مرگ سلول عصبی جلوگیری نماید [١٦]. گیاهان مؤثر در این مطالعه از خانواده چتریان و روزاسه است که از لحاظ ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدها غنی است. مطالعات نشان داده است که این ترکیبات یا به طورمستقیم از طریق پاکسازی رادیکال‌های آزاد یا به‌طور غیر مستقیم از طریق تقویت دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول و القای مسیرهای بقای سلولی از آسیب‌های ناشی از اکسیداتیو استرس جلوگیری می‌کند [۳۵]. بنابراین می‌توان بخشی از آثار حفاظتی این گیاهان را به ترکیبات فنلی و آثار آنتی‌اکسیدانی آن‌ها نسبت داد.

یکی دیگر از مکانیسم‌های درگیر در اثر حفاظتی عصاره‌های گیاهی مهار آنزیم کولین استراز است. مشخص شده است که استیل کولین استراز باعث تسریع روند تشکیل فیبریل‌های بتا آمیلویید می‌شود. آنزیم استیل کولین استراز از طریق اتصال به گونه غیر آمیلوییدوژنیک (non-amyloidogenic) پپتید بتا آمیلویید از ناحیه آنیونی جانبی سرعت تشکیل فیبریل‌های رسوبی این پپتید را به شیوه غیر آنزیمی افزایش می‌دهد و باعث تشدید سمیت آن می‌شود. به همین دلیل مهار کننده‌های آنزیم استیل کولین استراز که در سطح جایگاه آنیونی جانبی با آن تداخل دارد در بهبود روند درمانی آلزایمر نقش دارد [۳٦] مطالعات نشان داده‌است که ترکیبات مهار کننده آنزیم کولین استراز در مدل‌های in vitro باعث کاهش سمیت بتا آمیلویید می‌شود [۳۷]. برای گیاهان مؤثر مورد مطالعه در این تحقیق اثر مهارکنندگی آنزیم کولین استراز گزارش شده است و این اثر می‌تواند در اثر حفاظتی مشاهده شده در برابر سمیت بتا آمیلویید نقش داشته باشد که البته نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

از دیگر مکانیسم‌های درگیر در اثر حفاظتی در برابر سمیت سلولی بتا آمیلویید در کشت سلول که در مطالعات به آن اشاره شده است می‌توان به مهار گیرنده NMD (N-methyl-D-aspartate)، تحریک گیرنده‌های نیکوتینی، مهار آنزیم MAO و تحریک گیرنده‌های دوپامین اشاره کرد [۳۸]. در مورد گیاهان مورد مطالعه اطلاعاتی در مورد نقش این

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

مکانیسم‌ها در اثر حفاظتی آن‌ها در دسترس نیست و نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

در مجموع مطالعه حاضر نشان داد که عصاره گیاهان *Sanguisorba minor*، *Cerasus microcarpa*، *Ferulago angulata* و *Rosa canina* می‌تواند از سمیت سلولی بتا آمیلویید جلوگیری نماید. بنابراین توصیه می‌شود این گیاهان برای استفاده در درمان بیماری آلزایمر مورد توجه و مطالعه بیشتر قرار بگیرند. همچنین مکانیسم‌های مختلفی می‌تواند در اثر حفاظتی این گیاهان نقش داشته باشد که نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات طب سنتی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با شماره ۱۵۷/ق/۹۳ است و با حمایت‌های مالی آن مرکز انجام شده است.

منابع

[1] De-Paula VJ1, Radanovic M, Diniz BS, Forlenza OV. Alzheimer's disease. Subcell Biochem 2012; 65: 329-52.

[2] Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. Alzheimers Dement 2007; 3(3): 186-91.

[3] Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, Quirion R. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. Prog Neurobiol 2002; 68(3): 209-45.

[4] Prasansuklab A, Tencomnao T. Amyloidosis in Alzheimer's Disease: The Toxicity of Amyloid Beta (A β), Mechanisms of Its Accumulation and Implications of Medicinal Plants for Therapy. Evid Based Complement Alternat Med 2013; 2013: 413808.

[5] Barage SH, Sonawane KD. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. Neuropeptides 2015; 52: 1-18.

[6] Ferreira ME, de Vasconcelos AS, da Costa Vilhena T, da Silva TL, da Silva Barbosa A, Gomes AR, Dolabela MF, Percário S. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Should We Keep Trying Antioxidant Therapies? Cell Mol Neurobiol 2015; 35(5): 595-614.

[7] Cavallucci V, D'Amelio M, Cecconi F. Aβ toxicity in Alzheimer's disease. Mol Neurobiol 2012; 45(2): 366-78.

[8] Crews L, Masliah E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. Hum Mol Genet 2010; 19(R1): R12-20.

[9] Kulshreshtha A, Piplani P. Current pharmacotherapy and putative disease-modifying therapy for Alzheimer's disease. Neurol Sci 2016; 37(9): 1403-35.

[10] Praticò D, Sung S. Lipid peroxidation and oxidative imbalance: early functional events in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis 2004; 6(2): 171-5.

[11] Cai Z, Zhao B, Ratka A. Oxidative stress and β-amyloid protein in Alzheimer's disease. Neuromolecular Med 2011; 13(4): 223-50.

[12] Feng Y, Wang X. Antioxidant therapies for Alzheimer's disease. Oxid Med Cell Longev 2012; 2012: 472932.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

[13] Contestabile A. The history of the cholinergic hypothesis. Behav Brain Res 2011; 221(2): 334-40.

[14] Deardorff WJ, Feen E, Grossberg GT. The Use of Cholinesterase Inhibitors Across All Stages of Alzheimer's Disease. Drugs Aging 2015; 32(7): 537-47.

[15] Howes MJ, Houghton PJ. Ethnobotanical treatment strategies against Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res 2012; 9(1): 67-85.

[16] Howes MJ, Perry E. The role of phytochemicals in the treatment and prevention of dementia. Drugs Aging 2011; 28(6): 439-68.

[17] Perry E, Howes MJ. Medicinal plants and dementia therapy: herbal hopes for brain aging? CNS Neurosci Ther 2011; 17(6): 683-98.

[18] Soodi M, Naghdi N, Hajimehdipoor H, Choopani S, Sahraei E. Memory-improving activity of Melissa officinalis extract in naïve and scopolamine-treated rats. Res Pharm Sci 2014; 9(2): 107-14.

[19] Papandreou MA, Tsachaki M, Efthimiopoulos S, Cordopatis P, Lamari FN, Margarity M. Memory enhancing effects of saffron in aged mice are correlated with antioxidant protection. Behav Brain Res 2011; 219(2): 197-204.

[20] Azali Sahak MK, Mohamed AM, Hashim NH, Hasan Adli DS. Nigella sativa oil enhances the spatial working memory performance of rats on a radial arm maze. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013 (2013), Article ID 180598, 5 pages.

[21] Akhondzadeh S, Noroozian M, Mohammadi M, Ohadinia S, Jamshidi A, Khani M. Melissa officinalis extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomised, placebo controlled trial. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2003; 74(7): 863-6.

[22] Akhondzadeh S, Sabet MS, Harirchian MH, Togha M, Cheraghmakani H, Razeghi S, Hejazi SSh, Yousefi MH, Alimardani R, Jamshidi A, Zare F, Moradi A. Saffron in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a 16-week, randomized and placebo-controlled trial. J Clin Pharm Ther 2010; 35(5): 581-8.

[23] Hajimehdipoor H, Shekarchi M, Aghighi A, Hamzeloo-Moghadam M. Evaluating the acetylcholinesterase inhibitory activity of Ferulago angulata and Ferulago subvelutina. RJP 2014; 1(2): 39-43

[24] Esmaeili S, Ara L, Hajimehdipoor H, Kolivand H, Mohammadi Motamed S. Acetylcholinesterase inhibitory effects of some plants from Rosaceae. RJP 2015; 2(4): 33-7.

[25] Ferreira A, Proença C, Serralheiro ML, Araújo ME. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. J Ethnopharmacol 2006; 108(1): 31-7.

[26] Karkanis A, Vellios E, Thomaidis T, Bilalis D, Efthimiadou A, Travlos I. Phytochemistry and Biological Properties of Burnet Weed (*Sanguisorba* spp.): A Review. Not Sci Biol 2014; 6(4): 395-8.

[27] Anand P, Singh B. Flavonoids as lead compounds modulating the enzyme targets in Alzheimer's disease. Med Chem Res 2013; 22(7): 3061-75.

[28] Albarracin SL, Stab B, Casas Z, Sutachan JJ, Samudio I, Gonzalez J, Gonzalo L, Capani F,

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

Morales L, Barreto GE. Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease. Nutr Neurosci 2012; 15(1): 1-9.

[29] Mansouri MT, Naghizadeh B, Ghorbanzadeh B, Farbood Y, Sarkaki A, Bavarsad K. Gallic acid prevents memory deficits and oxidative stress induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. Pharmacol Biochem Behav 2013; 111: 90-6.

[30] Dhingra D, Chhillar R. Antidepressant-like activity of ellagic acid in unstressed and acute immobilization-induced stressed mice. Pharmacol Rep 2012; 64(4): 796-807.

[31] Ansari MA, Abdul HM, Joshi G, Opii WO, Butterfield DA. Protective effect of quercetin in primary neurons against Abeta(1-42): relevance to Alzheimer's disease. J Nutr Biochem 2009; 20(4): 269-75.

[32] Jiménez B, Grande MC, Anaya J, Torres P, Grande M. Coumarins from Ferulago capillaris and F. brachyloba. Phytochemistry 2000; 53(8): 1025-31.

[33] Cai Z. Monoamine oxidase inhibitors: promising therapeutic agents for Alzheimer's disease (Review). Mol Med Rep 2014; 9(5): 1533-41.

[34] Daneshmand P, Saliminejad K, Dehghan Shasaltaneh M, Kamali K, Riazi GH, Nazari R, Azimzadeh P, Khorram Khorshid HR. Neuroprotective Effects of Herbal Extract (Rosa canina, Tanacetum vulgare and Urtica dioica) on Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. Avicenna J Med Biotechnol 2016; 8(3): 120-5.

[35] Ebrahimi A, Schluesener H. Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: potentials and pitfalls. Ageing Res Rev 2012; 11(2): 329-45.

[36] Inestrosa NC, Urra S, Colombres M. Acetylcholinesterase (AChE)--amyloid-beta-peptide complexes in Alzheimer's disease. the Wnt signaling pathway. Curr Alzheimer Res 2004; 1(4): 249-54.

[37] 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.

[38] 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.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]