

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

Maliheh Soodi<sup>1\*</sup>, Homa Hajimehdipoor<sup>2</sup>, Nasim Ataei<sup>3</sup>, Shole Akbari<sup>3</sup>

- 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 (A $\beta$ ) peptide in the brain. A $\beta$  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 A $\beta$  induced toxicity in a cell culture model.

**Methods:** We cultured PC12 cells according to standard protocols. The cells were incubated with A $\beta$  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 A $\beta$ -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

# مطالعه آثار حفاظتی تعداد هفت عصاره گیاهی مختلف از گیاهان دارویی ایران در برابر سمیت ناشی از پیتید بتا آمیلوئید در کشت سلول‌های PC12

ملیحه سودی<sup>۱\*</sup>، هما حاجی مهدی پور<sup>۲</sup>، نسیم عطایی<sup>۳</sup>، شعله اکبری<sup>۳</sup>

- 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: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه سم شناسی  
 Email: Soodi@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۵/۱۱/۰۶

دریافت مقاله: ۹۵/۱۰/۰۱

## چکیده

**هدف:** بیماری آلزایمر شایع ترین شکل زوال عقل در پیری است. مهم ترین عامل آسیب‌شناختی این بیماری رسوبات خارج سلولی پیتید بتا آمیلوئید است که از طریق مکانیسم‌های مختلف باعث مرگ سلول‌های عصبی می‌شود. درمان‌های جدید روی ترکیباتی تمرکز می‌کنند 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 پیتید بتا آمیلوئید 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 پیتید بتا آمیلوئید به تنهایی و به همراه غلظت‌های مختلف عصاره‌ها به مدت ۲۴ 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*، *angulata* توانستند مرگ سلولی ناشی از پیتید بتا آمیلوئید 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:** بتا آمیلوئید، آلزایمر، گیاهان دارویی، سمیت عصبی، کشت سلول

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

## مقدمه

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

#### اثر حفاظتی هفت عصاره گیاه دارویی در برابر سمیت بتا آمیلوئید

خود را اعمال می‌کند [۷]. ترکیباتی که بتوانند از تولید یا تجمع این پپتید جلوگیری کنند یا اثر حفاظتی در برابر سمیت این پپتید داشته باشند می‌توانند در درمان بیماری آلزایمر نقش داشته باشند [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 منجر می‌شود [۱۰]. پپتید بتا آمیلوئید به صورت مستقیم یا غیر مستقیم در تولید گونه‌های فعال اکسیژن نقش دارد [۶، ۱۱]. ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌توانند سمیت سلولی پپتید بتا آمیلوئید 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) به عنوان 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 [۱۴].

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 علائم 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

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 سال ۲۰۵۰ 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 آمیلوئید (Amyloid  $\beta$  peptide) [۴، ۵] و استرس اکسیداتیو است [۶].

مهم‌ترین یافته آسیب‌شناختی در مغز بیماران آلزایمری وجود پلاک‌های پیری است که هسته اصلی تشکیل دهنده آن پپتید بتا آمیلوئید است. پپتید بتا آمیلوئید یک پپتید ۴۰-۴۲ اسید آمینه‌ای است که از شکسته شدن پروتئین پیش ساز آمیلوئید (APP) به وسیله آنزیم‌های پروتئولیتیک بتا سکریتاز ( $\beta$  secretase) و گاما سکریتاز به وجود می‌آید. این پپتید در حالت منورم محلول و فرم تجمع یافته آن نامحلول است و به صورت خارج سلولی رسوب می‌نماید. مطالعات نشان داده‌اند که فرم تجمع یافته پپتید بتا آمیلوئید سمی است و باعث مرگ سلول‌های عصبی می‌شود. بنابراین پپتید بتا آمیلوئید به عنوان عامل اصلی تخریب نورونی در مغز بیماران آلزایمری شناخته شده است [۱، ۴، ۵]. پپتید بتا آمیلوئید از طریق چندین مکانیسم مثل: استرس اکسیداتیو (Oxidative stress)، اختلال در اعمال میتوکندری، تغییر در نفوذپذیری غشاء، التهاب، اختلال سیناپتیک اثر سمیت

## مواد و روش‌ها

### مواد

رده سلولی PC12 از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. Poly-D-lysine (PDL) از شرکت Santa Cruz Biotechnology آمریکا، پپتید بتا آمیلوئید (A $\beta$  25-35) از شرکت Enzo Life Sciences آمریکا و MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-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) 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 ۹۳/۱۵۷/ق در آن 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 به مدت ۲۴ ساعت صورت گرفت. بعد از گذشت ۲۴ ساعت مخلوط صاف شد و با روش تقطیر در خلأ تغلیظ شد [۲۴].

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 علائم 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 گرفته است. 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 شده است. 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 *Cerasus microcarpa*، *Sanguisorba minor*، *Stachys Alhagi pseudalhagi*، *Ferulago angulata*، *Rosa canina* و *Amygdalus scoparia pilifera* 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 آمیلوئید در مدل سلولی بررسی شده است.

جدول ۱ مشخصات گیاهان مورد مطالعه

ردیف	نام گیاه		خانواده	قسمت مورد استفاده	محل جمع آوری	شماره هرابریومی
	نام علمی	نام فارسی				
۱	<i>Sanguisorba minor</i>	توت رویه	Rosaceae	قسمت‌های هوایی	همدان	TMRC 3545
۲	<i>Cerasus microcarpa</i>	آلبالوی دانه ریز	Rosaceae	سر شاخه هوایی	کهگیلویه و بویراحمد	TMRC 2870
۳	<i>Ferulago angulata</i>	چویر سه پاره	Apiaceae	قسمت‌های هوایی	کهگیلویه و بویراحمد	TMRC 2800
۴	<i>Alhagi pseudalhagi</i>	خارشتر خزری	Fabaceae	قسمت‌های هوایی	کهگیلویه و بویراحمد	TMRC 3281
۵	<i>Stachys pilifera</i>	سنبله‌ای مودار	Lamiaceae	قسمت‌های هوایی	کهگیلویه و بویراحمد	TMRC 2175
۶	<i>Amygdalus scoparia</i>	بادام کوهی	Rosaceae	قسمت‌های هوایی	کهگیلویه و بویراحمد	TMRC 1998
۷	<i>Rosa canina</i>	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.

بررسی اثر عصاره‌های مورد مطالعه روی سلول‌های PC12، سلول‌ها با غلظت  $10^4$  سلول در هر چاهک پلیت‌های ۹۶ خانه پوشش داده شده با PDL کشت داده شدند و ۲۴ ساعت بعد محیط کشت سلول‌ها با محیط حاوی عصاره‌ها با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعویض شد و به مدت ۲۴ ساعت دیگر با محیط حاوی عصاره‌ها انکوبه شدند. میزان بقای سلول‌ها بعد از ۲۴ ساعت به روش سنجش MTT ارزیابی 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 دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار  $CO_2$  ۵ درصد کشت داده شدند.

### بررسی اثر حفاظتی عصاره‌ها بر سمیت ناشی

#### از بتا آمیلوئید در سلول‌های PC12

برای بررسی اثر حفاظتی عصاره‌ها بر سمیت القا شده توسط بتا آمیلوئید، سلول‌ها با غلظت  $10^4$  سلول در هر چاهک پلیت‌های ۹۶ خانه پوشش داده شده با PDL کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت پپتید بتا آمیلوئید به محیط کشت اضافه شد. در این مطالعه اثر حفاظتی عصاره‌ها بر سمیت ناشی از دو غلظت ۰/۱ و ۰/۵ میکرومولار بتا آمیلوئید بررسی شد. محلول استوک پپتید بتا آمیلوئید با غلظت ۱ میلی‌مولار با حل کردن یک میلی‌گرم پودر پپتید در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل تهیه شد. محلول استوک قبل از اضافه شدن به محیط به مدت 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 آمیلوئید با

### 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

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 به مدت ۴ ساعت در انکوباتور CO<sub>2</sub> 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 ۶۳۰ 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 آمیلوید از آزمون آماری آنالیز واریانس دوطرفه و Benferoni post test استفاده شد. تمامی آزمایش‌ها به صورت سه بار تکرار در پلیت‌های جداگانه انجام شد و در هر پلیت برای هر گروه ۵ بار تکرار در نظر گرفته شد. نتایج

به صورت 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 میلی‌لیتر سمی نیست.

### بررسی اثر حفاظتی عصاره‌ها بر سمیت ناشی

#### از بتا آمیلوید در سلول‌های PC12

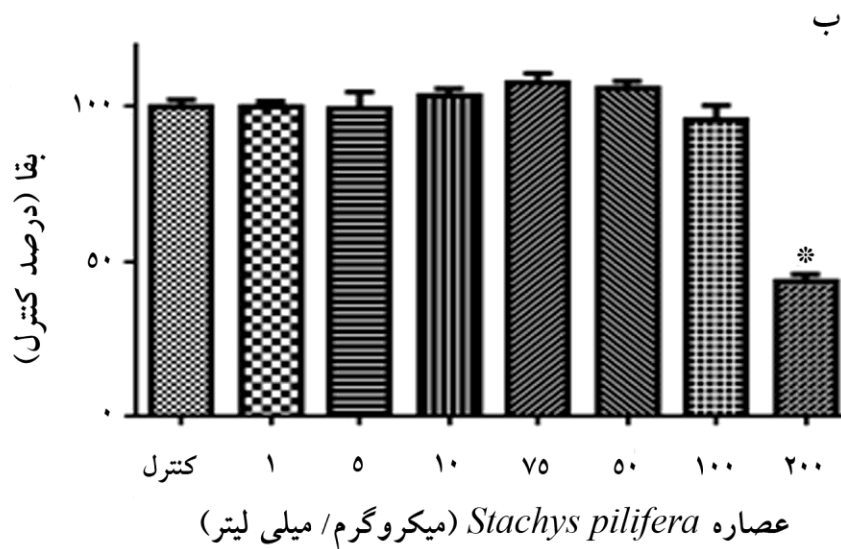
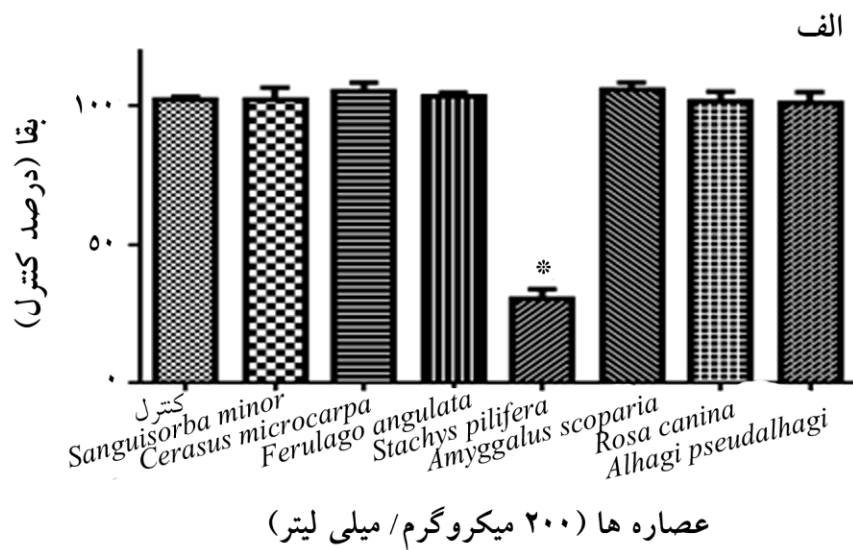
اثر حفاظتی عصاره‌های مورد مطالعه در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر سمیت ناشی از پپتید بتا آمیلوید ۰/۱ میکرومولار در شکل ۲ نشان داده شده است از بین عصاره‌های مورد آزمایش عصاره گیاهان *Sanguisorba minor*، *Rosa canina*، *Ferulago angulata*، *Cerasus microcarpa* اثر حفاظتی معنی‌داری نشان دادند. در حالی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

اثر حفاظتی عصاره‌های *Rosa canina* و *Ferulago angulate* در محدوده غلظتی ۱۰-۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب در شکل‌های ۳ و ۴ و اثر حفاظتی عصاره‌های

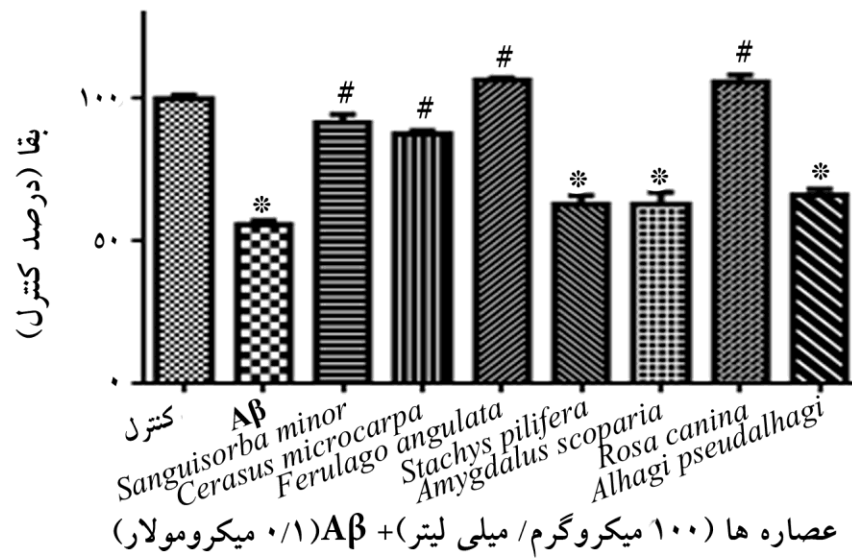
اثر حفاظتی هفت عصاره گیاه دارویی در برابر سمیت بتاآمیلوئید

متفاوت بتا آمیلویید (۰/۱ و ۰/۵ میکرومولار) تفاوت معنی داری ندارند ولی اثر حفاظتی عصاره های *Sanguisorba minor* و *Ferulago angulata* در غلظت های متفاوت بتاآمیلوئید (۰/۱ و ۰/۵ میکرومولار) تفاوت معنی داری دارند.

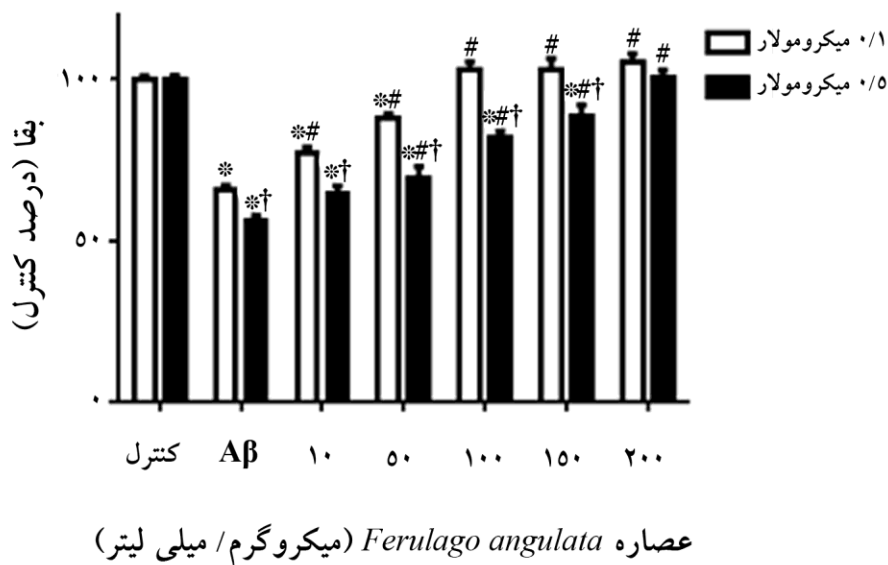
محدوده غلظتی ۱۰-۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب در شکل های ۵ و ۶ نشان داده شده است. در هر چهار عصاره به صورت وابسته به دوز اثر حفاظتی دیده می شود. آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد که آثار حفاظتی عصاره های



شکل ۱ بررسی تأثیر عصاره ها بر میزان بقای سلول های PC12؛ سلول ها با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره ها به مدت ۲۴ ساعت مواجه شدند و میزان بقای سلولی به روش MTT ارزیابی شد (الف). بررسی عصاره گیاه *Stachys pilifera* در غلظت های مختلف بر میزان بقای سلول های PC12 (ب). \* تفاوت معنی دار با گروه کنترل را نشان می دهد  $p < 0.001$



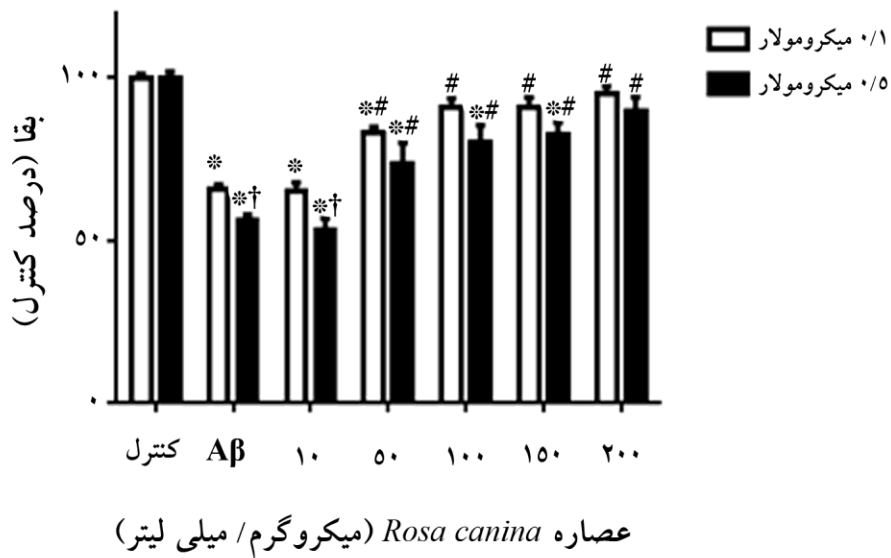
شکل ۲ بررسی اثر حفاظتی عصاره‌ها با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در برابر سمیت بتا آمیلوئید (۰/۱ میکرومولار) در سلول‌های PC12؛ \* تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل را نشان می‌دهد  $p < 0.001$ , # تفاوت معنی‌دار با گروه بتا آمیلوئید را نشان می‌دهد  $p < 0.001$



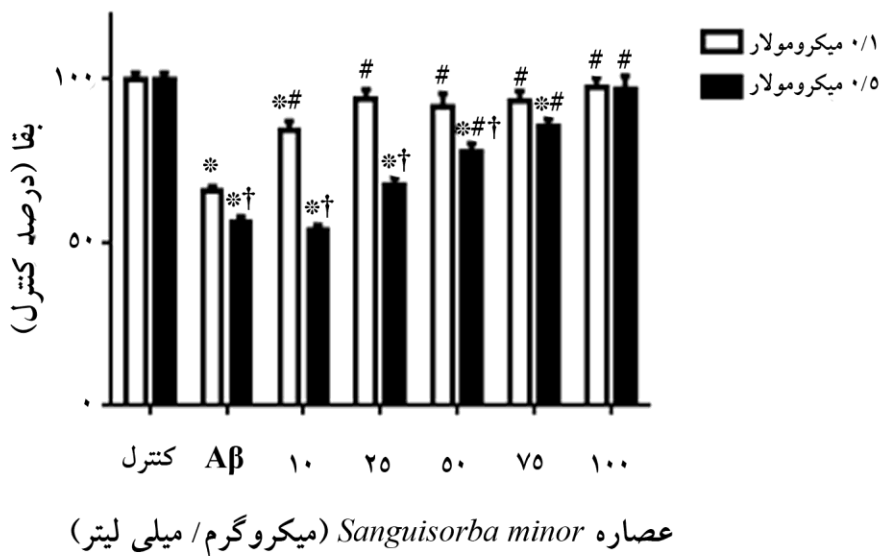
شکل ۳ بررسی اثر حفاظتی عصاره *Ferulago angulata* در برابر سمیت بتا آمیلوئید در دو غلظت ۰/۱ و ۰/۵ میکرومولار در سلول‌های PC12؛ \* تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل را نشان می‌دهد، # تفاوت معنی‌دار با گروه بتا آمیلوئید را نشان می‌دهد، † تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در دو غلظت بتا آمیلوئید را نشان می‌دهد.



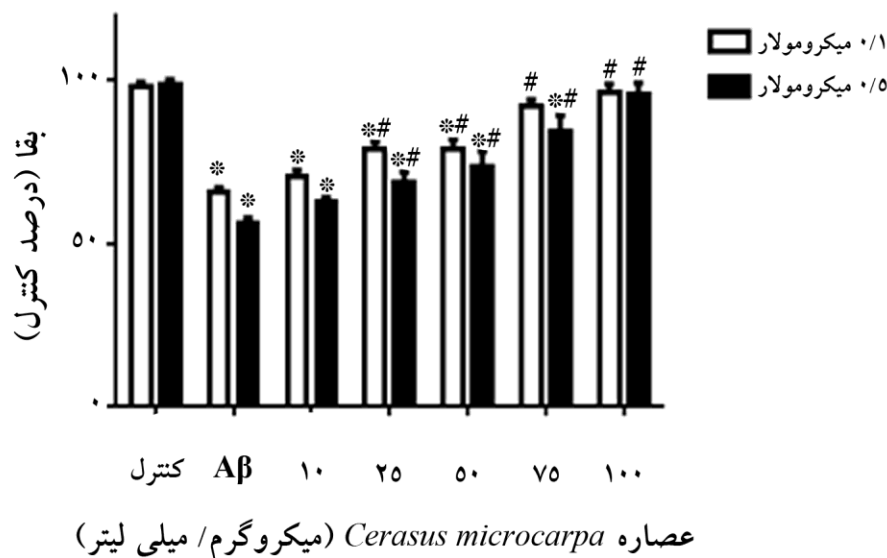
اثر حفاظتی هفت عصاره گیاه دارویی در برابر سمیت بتا آمیلوئید



شکل ۴ بررسی اثر حفاظتی عصاره *Rosa canina* در برابر سمیت بتا آمیلوئید 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 آمیلوئید را نشان می‌دهد، † تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در دو غلظت بتا آمیلوئید را نشان می‌دهد.



شکل ۵ بررسی اثر حفاظتی عصاره *Sangisorba minor* در برابر سمیت بتا آمیلوئید 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 آمیلوئید را نشان می‌دهد، † تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در دو غلظت بتا آمیلوئید را نشان می‌دهد.



شکل ۶ بررسی اثر حفاظتی عصاره *Cerasus microcarpa* در برابر سمیت بتا آمیلوئید 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 آمیلوئید را نشان می‌دهد، † تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در دو غلظت بتا آمیلوئید را نشان می‌دهد.

غلظت‌های متفاوت بتا آمیلوئید 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 به کار رود [۲۶] و همچنین می‌تواند فعالیت آنزیم استیل کولین استراز را مهار کند [۲۵]. همچنین عصاره این گیاه مهارکننده گلیکوزن سستاز کیناز 3β (Glycogen synthase kinase 3 beta) است که نقش مهمی در بیماری‌زایی بیماری آلزایمر دارد [۲۷]. عصاره این گیاه حاوی مقادیر زیادی ترکیبات فنلی است [۲۶] و مهم‌ترین ترکیبات فنلی در این گیاه شامل گالیک اسید (*Gallic acid*)، الاجیک اسید

## بحث

در این مطالعه اثر حفاظتی هفت عصاره گیاهی شامل: *Cerasus microcarpa*, *Sanguisorba minor*, *Stachys Alhagi pseudalhagi*, *Ferulago angulata*، *Rosa canina* و *Amygdalus scoparia pilifera* در برابر سمیت بتا آمیلوئید در مدل سلولی برای استفاده در درمان بیماری آلزایمر بررسی شد. از بین عصاره‌های مورد مطالعه عصاره گیاهان *Cerasus*, *Sanguisorba minor*، *Rosa canina*، *Ferulago angulata* اثر حفاظتی چشمگیری را در برابر سمیت بتا آمیلوئید نشان دادند. همچنین نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که آثار حفاظتی عصاره گیاهان *Rosa canina* و *Cerasus microcarpa* وابستگی به غلظت بتا آمیلوئید ندارد و در غلظت‌های متفاوت بتا آمیلوئید آثار حفاظتی یکسانی مشاهده می‌شود در حالی که اثر حفاظتی عصاره گیاهان *Sanguisorba minor* و *Ferulago angulata* در برابر

#### اثر حفاظتی هفت عصاره گیاه دارویی در برابر سمیت بتا آمیلوئید

عصبی جلوگیری نماید [۱۶]. 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 طور مستقیم از طریق پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد یا به طور 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 آمیلوئید می‌شود. آنزیم استیل کولین استراز از طریق اتصال به گونه غیر آمیلوئیدوژنیک (non-amyloidogenic) پپتید بتا آمیلوئید 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 مهارکننده‌های آنزیم استیل کولین استراز که در سطح جایگاه آنیونی جانبی با آن تداخل دارد در بهبود روند درمانی آلزایمر نقش دارد [۳۶]. مطالعات نشان داده‌است که ترکیبات مهارکننده آنزیم کولین استراز در مدل‌های *in vitro* باعث کاهش سمیت بتا آمیلوئید 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 آمیلوئید نقش داشته باشد که البته نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

از دیگر مکانیسم‌های درگیر در اثر حفاظتی در برابر سمیت سلولی بتا آمیلوئید 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

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

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

گیاهان *Rosa canina* و *Cerasus microcarpa* 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 [۲۴]. برای گیاه *Rosa canina* آثار حفاظت‌کننده عصبی گزارش شده است [۳۴].

مکانیسم‌های مختلفی برای سمیت سلولی بتا آمیلوئید ذکر شده است و مطالعات روی گیاهان نشان داده است که عصاره‌های گیاهی از طریق مکانیسم‌های مختلف می‌تواند سمیت سلولی بتا آمیلوئید را کاهش دهد. یکی از مکانیسم‌های درگیر در سمیت بتا آمیلوئید 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 [۶]. مطالعات نشان می‌دهد که ترکیبات گیاهی به خاطر اثر آنتی‌اکسیدانی می‌تواند با کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از پپتید بتا آمیلوئید از مرگ سلول

اثر حفاظتی این گیاهان نقش داشته باشد که نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

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

در مجموع مطالعه حاضر نشان داد که عصاره گیاهان *Ferulago*, *Cerasus microcarpa*, *Sanguisorba minor* و *angulata* و *Rosa canina* می‌تواند از سمیت سلولی بتا آمیلوید 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

## تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات طب سنتی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با شماره ۹۳/ق/۱۵۷ 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  $\beta$  ), 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. A $\beta$  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  $\beta$ -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.

- [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, Hamzelo-Moghadam M. Evaluating the acetylcholinesterase inhibitory activity of *Ferulago angulata* and *Ferulago subvelutina*. *RJP* 2014; 1(2): 39-43
- [24] Esmacili 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,

- 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 A $\beta$ (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, Urrea 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.