

Evaluation of Antioxidant and Protective Effects of *Dracocephalum Moldavica* Extract on Beta-Amyloid Peptide-Induced Toxicity in PC12 Cells

Shokufe Emrani¹, Rahele Zhiani^{1*}, Samane Dolatabadi²

¹Department of Chemistry, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

²Department of Biology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

Article Info:

Received: 1 Jul 2015

Accepted: 6 Aug 2015

ABSTRACT

Introduction: Excessive accumulation of beta-amyloid peptide, the major component of senile plaques in Alzheimer disease (AD), causes neuronal death through induction of oxidative stress. The medicinal plants from the *Lamiaceae* family contain the antioxidant activity. Moreover, neuroprotective properties of other species of this family have been reported. **Materials and Methods:** Aerial parts of the plants were extracted with ethanol and water using maceration method. Antioxidant activity of the extract was evaluated by 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging. PC12 cells were incubated with different concentrations of the extract in culture medium 1h prior to incubation with amyloid beta peptide. Cell toxicity and biomarkers of oxidative stress were assessed 24h after addition of amyloid beta peptide by MTT assay. **Results:** Butylated hydroxytoluene (BHT) at concentrations of 0.01, 0.1, and 1 µg/ml had higher anti-radical activity than *Dracocephalum moldavica* extract. However, at higher concentrations, plant extract showed a higher anti-radical activity than BHT. The plant extract at the concentration range of 0.01-100 µg/ml did not show any toxic effect on PC12 cells. The plant extract at concentrations of 1, 10, and 100 µg/ml protected cells against beta amyloid toxicity and at concentration of 10 µg/ml was able to prevent biomarkers changes of oxidative stress induced by beta amyloid. **Conclusion:** The extract of *Dracocephalum moldavica* prevents the toxicity of amyloid beta peptide by inhibiting the oxidative stress pathways and may be useful in the treatment of AD.

Key words:

1. Alzheimer Disease
2. Amyloid beta-Peptides
3. Oxidative Stress
4. PC12 Cells

* **Corresponding Author:** Rahele Zhiani

E-mail: R_zhiani2006@yahoo.com

سنجش اثرات آنتی اکسیدانی و محافظتی گیاه بادرشبو (*Dracocephalum moldavica*) بر سمیت القاء شده توسط پتید بتا آمیلوئید در سلول های PC12

شکوفه عمرانی^۱، راحله ژبانی^{۱*}، سمانه دولت آبادی^۲

^۱گروه شیمی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران
^۲گروه زیست شناسی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

اطلاعات مقاله:

تاریخ پذیرش: ۱۵ مرداد ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۱۰ تیر ۱۳۹۴

چکیده

مقدمه: تجمع بیش از حد پتید بتا آمیلوئید، جزء اصلی پلاک های پیری در بیماری آلزایمر، از طریق القای استرس اکسیداتیو باعث مرگ نورونی می گردد. گیاهان دارویی از خانواده نعنائیان دارای فعالیت آنتی اکسیدانی می باشند. به علاوه ویژگی های حفاظت عصبی گونه های دیگر این خانواده گزارش شده است. **مواد و روش ها:** قسمت های هوایی گیاهان با اتانول و آب با استفاده از روش ماسراسیون، عصاره گیری شدند. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره توسط مهار رادیکال ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل ارزیابی گردید. سلول های PC12، با غلظت های مختلف عصاره در محیط کشت یک ساعت قبل از انکوباسیون با پتید بتا آمیلوئید انکوبه شدند. سمیت سلولی و نشانگرهای زیستی استرس اکسیداتیو ۲۴ ساعت پس از افزودن پتید بتا آمیلوئید توسط سنجش MTT مورد ارزیابی قرار گرفتند. **یافته ها:** BHT در سه غلظت ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میکروگرم بر میلی لیتر فعالیت ضد رادیکالی بالاتری نسبت به عصاره بادرشبو داشت. اگرچه در غلظت های بالاتر، عصاره گیاه یک فعالیت ضد رادیکالی بالاتری را نسبت به BHT نشان داد. عصاره گیاه در محدوده غلظت ۰/۰۱-۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر هیچ اثر سمی ای را بر روی سلول های PC12 نشان نداد. عصاره گیاه در غلظت های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سلول ها را در برابر سمیت بتا آمیلوئید محافظت نمودند و در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر توانست از تغییرات نشانگرهای زیستی استرس اکسیداتیو القاء شده توسط بتا آمیلوئید جلوگیری نماید. **نتیجه گیری:** عصاره گیاه بادرشبو از سمیت پتید بتا آمیلوئید از طریق مهار مسیرهای استرس اکسیداتیو جلوگیری می کند و شاید در درمان بیماری آلزایمر مفید باشد.

کلید واژه ها:

۱. بیماری آلزایمر
۲. پتیدهای بتا آمیلوئید
۳. استرس اکسیداتیو
۴. سلول های PC12

* نویسنده مسئول: راحله ژبانی

آدرس الکترونیکی: R_zhiani2006@yahoo.com

مقدمه

گروه تیمار شده با عصاره و پتید بتا آمیلوئید: در این گروه سلول‌های PC12 که از قبل پتید بتا آمیلوئید دریافت کرده بودند، تحت تأثیر عصاره گیاه بادرشبو با غلظت‌های مختلف قرار گرفتند.

روش عصاره‌گیری از گیاه

در این مطالعه گیاه بادرشبو از منطقه کاشمر در استان خراسان رضوی جمع‌آوری گردید و جنس و گونه آن توسط کارشناسان مرکز جهاد کشاورزی استان تأیید گردید. عصاره برگ‌های این گیاه با روش ماسراسیون^۱ با استفاده از حلال اتانول:آب به نسبت ۸۰:۲۰ و نسبت گیاه به حلال ۱:۱۰ به مدت چهار روز تهیه شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت مخلوط حلال و عصاره صاف شد و حلال جدید به تفاله گیاه اضافه گردید. سپس عصاره‌های به دست آمده با دستگاه تقطیر در خلاء (Model: RV-10, IK, Germany) در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد تا حد خشک شدن تغلیظ شدند (۱۰، ۱۱).

غلظت‌های تهیه شده از عصاره

برای کلیه آزمایش‌ها، غلظت‌های ۰/۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره گیاه تهیه گردید.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

برای این منظور محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (۰/۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از عصاره‌ها و نیز آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT^{۱۱} در حلال متانول آماده شد. یک میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH^{۱۱} (با غلظت ۰/۱ میلی مولار) به ۳ میلی‌لیتر از عصاره افزوده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرار گرفتند. بعد از این مدت، جذب نوری محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر^{۱۲} (Model: 9900CECILL, England) خوانده شد. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH طبق فرمول زیر محاسبه گردید (۱۵-۱۲).

$$I\% = (A \text{ blank} - A \text{ sample} / A \text{ sample}) \times 100$$

در این فرمول A sample و A blank به ترتیب میزان جذب نوری کنترل منفی (فاقد عصاره) و عصاره را بیان می‌کنند و I درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH را نشان می‌دهد.

کشت سلول

سلول‌های PC12 که از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند، در محیط کشت RPMI^{۱۳} حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)^{۱۴}، ۱۰۰ واحد بین‌الملل پنی‌سیلین^{۱۵} و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین^{۱۶} در فلاسک استریل کشت سلول پوشیده شده^{۱۷} با PDL^{۱۸} که تماماً از شرکت سیگما خریداری گردیده بودند، تحت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند (۹).

بیماری آلزایمر^۱ یک بیماری تخریب‌کننده^۲ عصبی است که با پیشرفت از دست دادن حافظه و عملکردهای شناختی مشخص می‌شود (۱). این بیماری شامل تشکیل پلاک‌های پیری متشکل از پتید بتا آمیلوئید^۳ و کلاف‌های نوروفیبریلار^۴ متشکل از پروتئین‌های هیپر فسفریله تاو^۵ می‌باشد. مشخصه اصلی این بیماری تولید و متابولیسم پتید بتا آمیلوئید است (۲).

مطالعات نشان می‌دهد که اضافه کردن پتید بتا آمیلوئید به کشت سلول‌های عصبی باعث مرگ آن‌ها می‌گردد. استرس اکسیداتیو نقش بسیار مهمی در پیشبرد بیماری آلزایمر دارد. شواهد گسترده‌ای پیشنهاد می‌کنند که آسیب اکسایشی به واسطه گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)^۶ ایجاد می‌شود و این رادیکال‌ها با لیپیدها، پروتئین‌ها، DNA و RNA واکنش داده و باعث آسیب جدی به سلول می‌گردند (۴، ۳)؛ بنابراین سمیت پتید بتا آمیلوئید حداقل در قسمت‌هایی به واسطه رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌شود (۵). از این رو تلاش‌های درمانی که به حذف رادیکال‌های آزاد یا جلوگیری از تولید آن‌ها کمک می‌کند، می‌تواند در درمان بیماری آلزایمر مفید باشد (۶). لذا ترکیبات آنتی‌اکسیدان به‌عنوان یک راهکار درمانی در درمان سمیت عصبی القاء شده به وسیله پتید بتا آمیلوئید و بهبود نتایج عصبی در بیماری آلزایمر معرفی شده است (۸، ۷).

گیاه بادرشبو با نام علمی *Dracocephalum moldavica*، از تیره نعنائیان^۸ است. بادرشبو گیاهی علفی و بومی آسیای مرکزی و اهلی شده در مرکز و شرق اروپا است. جنس بادرشبو در دنیا ۴۵ گونه علفی و درختچه‌ای و در ایران ۸ گونه گیاه علفی یکساله و چندساله معطر دارد که برخی از گونه‌ها انحصاری ایران هستند (۹). هدف از این مطالعه بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و اثرات حفاظتی عصاره گیاه بادرشبو بر استرس اکسایشی ایجاد شده توسط پتید بتا آمیلوئید در سلول‌های PC12 می‌باشد.

مواد و روش‌ها

گروه‌های آزمایشی

گروه‌های مورد مطالعه در این تحقیق شامل موارد زیر می‌باشند:

گروه کنترل: در این گروه سلول‌های PC12 رشد یافته در محیط کشت تحت تأثیر عصاره گیاه بادرشبو و پتید بتا آمیلوئید قرار نگرفتند.

گروه بتا آمیلوئید: در این گروه سلول‌های PC12 رشد یافته در محیط کشت فقط تحت تأثیر پتید بتا آمیلوئید قرار گرفتند.

گروه تیمار شده با عصاره: در این گروه سلول‌های PC12 رشد یافته در محیط کشت فقط تحت تأثیر عصاره گیاه بادرشبو قرار گرفتند.

¹ Alzheimer disease

² Degenerative

³ Beta-amyloid peptide

⁴ Neurofibrillary tangles

⁵ Hyper phosphorylated tau

⁶ Oxidative stress

⁷ Reactive oxygen species (ROS)

⁸ Lamiaceae

⁹ Maceration

¹⁰ Butylated hydroxytoluene

¹¹ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

¹² Spectrophotometer

¹³ Roswell Park Memorial Institute (RPMI)

¹⁴ Fetal bovine serum (FBS)

¹⁵ Penicillin

¹⁶ Streptomycin

¹⁷ Coated

¹⁸ Poly-D-lysine (PDL)

بررسی اثر عصاره بر بقاء سلول‌های PC12

جهت بررسی اثر عصاره بر بقاء سلول‌های PC12 در محدوده غلظتی انتخابی، سلول‌ها با غلظت 10^4 cell/well در ۶ چاهک پلیت ۹۶ خانه پوشیده شده با PDL کشت داده شدند و بعد از ۲۴ ساعت، محیط کشت سلول‌ها با محیط حاوی عصاره در غلظت‌های $0/1$ ، $1/1$ ، $10/1$ و $100/1$ میکروگرم بر میلی‌لیتر (در ۵ چاهک پلیت) تعویض شدند و به مدت ۲۴ ساعت دیگر با محیط حاوی عصاره انکوبه شدند. یک چاهک پلیت فاقد عصاره بود که به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. غلظت‌های مورد نظر از استوک ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره حل شده در بافر PBS^{۱۹} تهیه شدند.

بعد از اتمام زمان انکوباسیون، به هر چاهک پلیت ۱۰ میکرولیتر از محلول استوک MTT^{۲۰} (Applchem, Germany) حل شده در محیط DMEM^{۲۱} (Sigma) اضافه گردید، به طوری که غلظت نهایی MTT در محیط کشت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. سپس پلیت به مدت ۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد (۱۶). بعد از اتمام زمان انکوباسیون، محیط رویی هر چاهک به آرامی خارج گردید و به منظور حل کردن بلورهای فورمازان^{۲۲} تولید شده، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO^{۲۳} اضافه گردید و بعد از حل شدن کامل بلورهای فورمازان، جذب نوری توسط دستگاه ELISA Reader (Model: Elx800, BioTek, USA) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. سپس با استفاده از معادله رگرسیون به دست آمده از منحنی استاندارد، درصد بقای سلول‌های تیمار شده محاسبه گردید (۱۷).

بررسی اثر حفاظتی عصاره بر سمیت القاء شده توسط پیتید بتا آمیلوئید

در این آزمایش سلول‌ها با غلظت 10^4 cell/well در ۷ چاهک پلیت ۹۶ خانه پوشیده شده با PDL کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت پیتید بتا آمیلوئید (Sigma) با غلظت ۲۰ میکرومول به محیط کشت در ۶ چاهک پلیت اضافه گردید. یک چاهک پلیت فاقد پیتید بتا آمیلوئید و عصاره بود که به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. محلول استوک پیتید بتا آمیلوئید 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 گروه تیمار شده با عصاره و پیتید بتا آمیلوئید، سلول‌ها یک ساعت قبل از اضافه کردن بتا آمیلوئید، با عصاره در غلظت‌های $0/1$ ، $1/1$ ، $10/1$ و $100/1$ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۵ چاهک پلیت انکوبه شدند. یک چاهک پلیت فاقد عصاره بود و سلول‌ها فقط در معرض پیتید بتا آمیلوئید قرار گرفتند و این چاهک به عنوان گروه بتا آمیلوئید در نظر گرفته شد. میزان بقاء سلولی ۲۴ ساعت بعد از افزودن پیتید بتا آمیلوئید به وسیله اندازه‌گیری

فورمازان تولید شده از احیای MTT مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۸).

اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدئید

مالون دی آلدئید (MDA)^{۲۴} از طریق آزمون تیوباربیتوریک اسید (TBA)^{۲۵} اندازه‌گیری شد (۱۹، ۲۰). در این آزمایش سوسپانسیون سلولی با غلظت 10^4 cell/well به ۴ چاهک پلیت ۹۶ خانه پوشیده شده به وسیله PDL انتقال داده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط کشت ذکر شده، به یکی از چاهک‌ها عصاره گیاهی با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به محیط اضافه شد.

یک ساعت بعد، بتا آمیلوئید با غلظت ۲۰ میکرومول به همان محیط اضافه گردید. علاوه بر این چاهک، در این آزمایش یک چاهک پلیت به عنوان کنترل، یک چاهک به عنوان گروه بتا آمیلوئید و یک چاهک نیز تیمار شده با عصاره تنها، با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند. برای جدا کردن سلول‌ها از پلیت، از محلول ۱۰ میکرو مولر EDTA^{۲۶} استفاده گردید. سپس سلول‌ها به مدت ۲۰ ثانیه در ۴۰ ولت سونیکه شدند. ۱۰ میکرولیتر از محلول یکنواخت^{۲۷} سلولی برای تعیین مقدار پروتئین به روش برادفورد^{۲۸} برداشته شد (۲۱).

به ۱۰ میکرولیتر از محلول یکنواخت سلولی ۲۰۰ میکرولیتر واکنشگر تیوباربیتوریک اسید (حاوی ۰/۰۹۲۵ درصد تیوباربیتوریک اسید و ۳/۷۵ درصد تری کلرواستیک اسید^{۲۹}) - (Merck) اضافه گردید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد تا پیوند بین MDA-TBA ایجاد شود. سپس نمونه‌ها روی یخ قرار داده شدند تا واکنش خاتمه یابد. بعد از سانتریفیوژ نمودن نمونه‌ها، شدت جذب محلول رویی در طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه ELISA Reader اندازه‌گیری شد (۲۲، ۲۳).

برای رسم منحنی استاندارد از ماده تترامتوکسی پروپان (TMP)^{۳۰}-(Sigma) به عنوان ماده استاندارد استفاده شد. میزان مالون دی آلدئید تولید شده بر حسب نانومول در میلی‌گرم پروتئین گزارش شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز

فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز^{۳۱}، به روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از کیت Randox Laboratories Ltd, Crumlin, UK اندازه‌گیری شد. این کیت بر اساس اندازه‌گیری میزان NADPH^{۳۲} مصرف شده توسط آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز (GR)^{۳۳} می‌باشد. سلول‌ها با غلظت 10^4 cell/well به ۴ چاهک

^{۱۹} Phosphate buffered saline

^{۲۰} 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT)

^{۲۱} Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM)

^{۲۲} Formazan

^{۲۳} Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

^{۲۴} Malondialdehyde

^{۲۵} Thiobarbituric acid

^{۲۶} Ethylenediaminetetraacetic acid

^{۲۷} Homogenate

^{۲۸} Bradford

^{۲۹} Trichloroacetic acid

^{۳۰} 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (TMP)

^{۳۱} Glutathione peroxidase

^{۳۲} Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)

^{۳۳} Glutathione reductase

یافته‌ها

قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH

نمودار ۱ میزان کاهش جذب محلول DPPH را در حضور غلظت‌های مختلف عصاره گیاه بادرشبو و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT نشان می‌دهد. در سه غلظت ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT فعالیت ضد رادیکالی بالاتری نسبت به عصاره گیاه بادرشبو داشت اما در غلظت‌های بالاتر، عصاره فعالیت ضد رادیکالی بالاتری نسبت به BHT نشان داد.

اثر عصاره بر بقاء سلول‌های PC12

نتایج بررسی میزان بقای سلول‌ها بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون با عصاره، در نمودار ۲ نشان داده شده است. بررسی آماری نشان داد که هیچ‌یک از غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره، اثر سمی معنی‌داری بر روی سلول‌ها نداشتند.

بررسی اثرات حفاظتی عصاره گیاه بادرشبو بر سمیت سلولی ناشی از پیتید بتا آمیلوئید در سلول‌های PC12

همان‌طور که در نمودار ۳ مشخص شده است، در گروهی که سلول‌ها تحت تأثیر پیتید بتا آمیلوئید قرار گرفته بودند (گروه بتا آمیلوئید)، بقاء سلول‌ها به میزان معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($P < 0.001$). افزودن عصاره گیاه بادرشبو (در بازه غلظتی ۰/۰۱-۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، یک ساعت قبل از اضافه کردن بتا آمیلوئید به صورت وابسته به دوز باعث کاهش سمیت این پیتید شد. در غلظت ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره، میزان بقاء سلول‌ها نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0.001$). در غلظت ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره نیز میزان بقاء سلول‌ها هم نسبت به گروه کنترل و هم گروه بتا آمیلوئید اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0.001$).

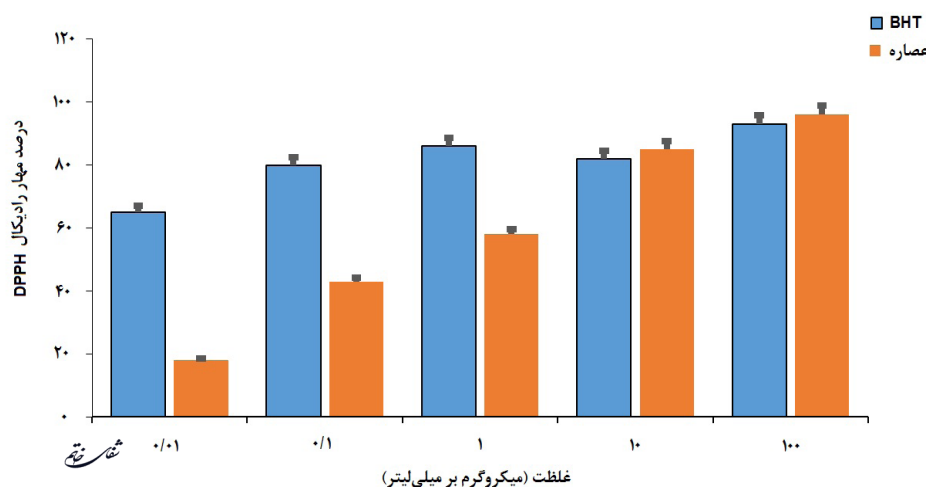
پلیت ۹۶ خانه پوشیده شده به وسیله PDL انتقال داده شدند و مشابه روش توضیح داده شده برای اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدئید، با بتا آمیلوئید و عصاره انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون، سلول‌ها توسط تریپسین^{۳۴} (Merck) از پلیت جدا شده و در ۳۰۰ میکرولیتر بافر PBS حاوی ۱ درصد تریتون X ۱۰۰ منتقل شدند و محلول یکنواخت سلولی بعد از یک دوره فریز و ذوب نمودن سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و از محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده گردید و کاهش جذب نوری در طول موج ۳۴۰ نانومتر با دستگاه ELISA Reader اندازه‌گیری شد (۲۴، ۲۵).

اندازه‌گیری مولکول‌های واکنش‌دهنده مشتق از اکسیژن

تجمع درون سلولی مولکول‌های واکنش‌دهنده مشتق از اکسیژن با استفاده از روش ۲، ۷ دی کلرو فلوروسین دی استات^{۳۵} اندازه‌گیری شد. بعد از سپری شدن زمان انکوباسیون سلول‌ها با بتا آمیلوئید و عصاره (گروه تیمار شده با عصاره و پیتید بتا آمیلوئید)، سلول‌ها توسط تریپسین از پلیت جدا شده، به بافر PBS حاوی گلوکز ۵/۶ میلی مولار و ۲، ۷ دی کلرو فلوروسین دی استات (Merck) با غلظت نهایی ۱۰ میکرو مولار منتقل شدند و به مدت ۴۵ دقیقه در این شرایط انکوبه شدند. سپس نمونه‌ها سانتریفیوژ شده و رسوب سلولی در ۱ میلی‌لیتر بافر PBS معلق شدند. شدت فلورسنت با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری^{۳۶} (BD, USA) در طول موج تحریکی ۴۸۵ نانومتر و طول موج نشری ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۲۶).

بررسی‌های آماری

تمامی آزمایش‌ها به صورت سه بار تکرار انجام و نتایج به صورت درصد کنترل بیان شده است. 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 One-way ANOVA و تست تعقیبی Newman-Keuls استفاده شد.

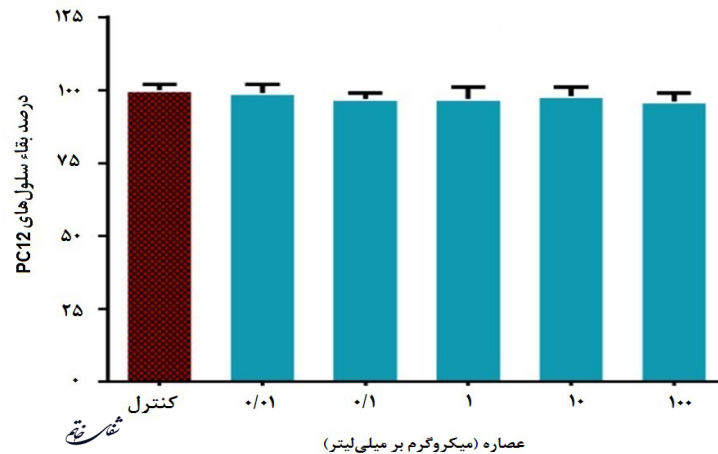


نمودار ۱- مقایسه میانگین درصد مهار DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره گیاه بادرشبو و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT.

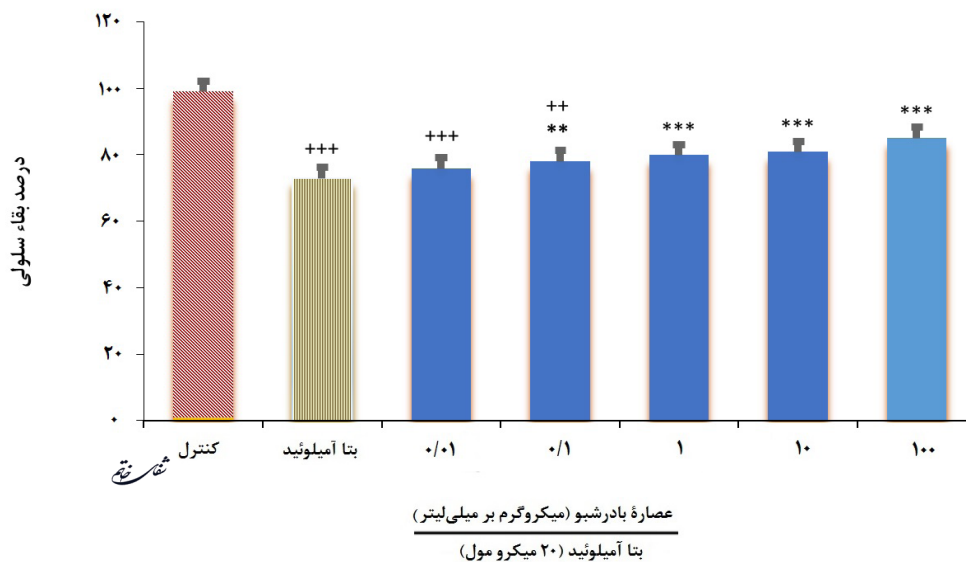
³⁴ Trypsin

³⁵ 2', 7' dichlorofluorescein diacetate

³⁶ Flow cytometry



نمودار ۲- میزان بقای سلول‌های PC12 تیمار شده با عصاره گیاه بادرشبو در غلظت‌های مختلف.



نمودار ۳- اثر عصاره گیاه بادرشبو بر سمیت پپتید بتا آمیلوئید در سلول‌های PC12. $P < 0.001^{***}$ و $P < 0.01^{**}$ اختلاف در برابر گروه بتا آمیلوئید و $P < 0.001^{***}$ و $P < 0.01^{**}$ اختلاف در برابر گروه کنترل را نشان می‌دهد.

در نتیجه خود عصاره باعث پراکسیداسیون لیپید نمی‌شود و هنگامی که این عصاره به همراه بتا آمیلوئید به کار می‌رود (گروه تیمار شده با عصاره و بتا آمیلوئید) این توانایی را دارد که از پراکسیداسیون لیپید به وسیله بتا آمیلوئید جلوگیری نماید.

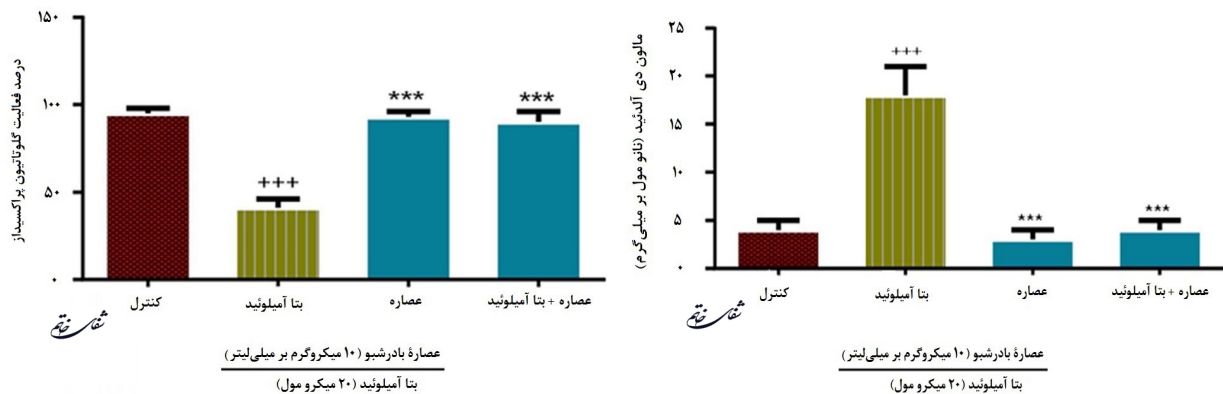
بررسی فعالیت آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز در گروه‌های مورد مطالعه

بر اساس نتایج به دست آمده، پپتید بتا آمیلوئید باعث کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز در سلول‌های PC12 نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0.001$). در حالی که در سلول‌های در معرض عصاره تنها (گروه تیمار شده با عصاره) و سلول‌های انکوبه شده با بتا آمیلوئید به همراه عصاره (گروه تیمار شده با عصاره و بتا آمیلوئید) میزان فعالیت این آنزیم با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت اما نسبت به گروه بتا آمیلوئید تفاوت معنی‌دار بود ($P < 0.001$); بنابراین عصاره گیاه

میزان بقای سلول‌ها در غلظت‌های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره، نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نشان ندادند اما نسبت به گروه بتا آمیلوئید، اختلاف معنی‌دار بود ($P < 0.001$); بنابراین این غلظت‌های عصاره کاملاً سلول‌ها را در برابر سمیت پپتید بتا آمیلوئید محافظت می‌نماید.

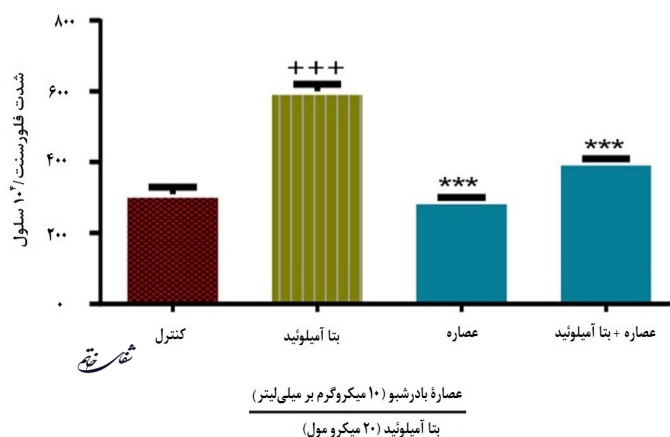
بررسی تأثیر عصاره گیاه بادرشبو بر لیپید پراکسیداسیون ناشی از پپتید بتا آمیلوئید

با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که میزان مالون دی آلدئید در گروهی که در معرض بتا آمیلوئید بود (گروه بتا آمیلوئید) نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری دارد ($P < 0.001$) - (نمودار ۴). به علاوه گروهی که فقط در معرض عصاره قرار گرفته بود (گروه تیمار شده با عصاره) از نظر میزان مالون دی آلدئید با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت اما نسبت به گروه بتا آمیلوئید اختلاف معنی‌دار بود ($P < 0.001$)



نمودار ۵- میزان فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز در گروه‌های مورد مطالعه. *** $P < 0.001$ اختلاف در برابر گروه کنترل را نشان می‌دهد. **** $P < 0.0001$ اختلاف در برابر گروه بتا آمیلونید.

نمودار ۴- اثر عصاره گیاه بادرشبو بر پراکسیداسیون لیپید ناشی از پپتید بتا آمیلونید. *** $P < 0.001$ اختلاف در برابر گروه بتا آمیلونید، **** $P < 0.0001$ اختلاف در برابر گروه کنترل را نشان می‌دهد.



نمودار ۶- مقدار گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) اندازه‌گیری شده در گروه‌های مورد مطالعه. *** $P < 0.001$ اختلاف در برابر گروه بتا آمیلونید و **** $P < 0.0001$ اختلاف در برابر گروه کنترل را نشان می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر ابتدا فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه *Dracocephalum moldavica* ارزیابی شد و نشان داده شد که فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره گیاه بادرشبو، وابسته به دوز می‌باشد و با افزایش غلظت، اثر مهارکنندگی افزایش می‌یابد. از این جهت نتایج این تحقیق با نتایج لیو^{۳۷} و همکاران (۲۷)، آلتمن^{۳۸} و همکاران (۲۸)، شوکلا^{۳۹} و همکاران (۲۹) و سان^{۴۰} و همکاران (۳۰) همخوانی داشت. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که عصاره این گیاه دارای ترکیبات قطبی مانند هیدروکسی سینامیک اسید^{۴۱} و فلاونوئیدها^{۴۲} با اسیدهای فرولیک^{۴۳} و کافئیک^{۴۴}، اسید رزمارینیک^{۴۵}، لوتئولین^{۴۶} و ۱-۷ گلوکوزید^{۴۷} می‌باشد (۹۰، ۳۱).

همچنین پژوهش‌ها نشان می‌دهند که فنل‌های گیاهی از قبیل فلاونوئیدها، فلاونولیگنان‌ها^{۴۸} و اسیدهای فنولیک^{۴۹} می‌توانند همچون آنتی‌اکسیدان مؤثر عمل کنند (۳۲)؛ بنابراین بالا بودن

بادرشبو به تنهایی تأثیری در فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز ندارد درحالی‌که می‌تواند از کاهش فعالیت گلوکوتاتیون پراکسیداز القاء شده به وسیله بتا آمیلونید جلوگیری نماید (نمودار ۵).

نتایج آزمایش اندازه‌گیری گونه‌های فعال اکسیژن

همان‌طور که در نمودار ۶ مشاهده می‌گردد، پس از ۲۴ ساعت مجاورت سلول‌ها با پپتید بتا آمیلونید با غلظت ۲۰ میکرومول، سطح فلورسنت به میزان قابل توجهی نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ($P < 0.001$). مواجهه قبلی سلول‌ها با عصاره با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر یک ساعت قبل از اضافه کردن پپتید بتا آمیلونید، تولید گونه‌های فعال اکسیژن القاء شده به وسیله این پپتید نسبت به گروه بتا آمیلونید کاهش چشمگیری داشت ($P < 0.001$). در سلول‌های در معرض عصاره تنها، میزان گونه‌های فعال اکسیژن با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشتند ($P = 0.89$) اما با گروه بتا آمیلونید تفاوت معنی‌دار بود ($P < 0.001$).

³⁷ Liu

³⁸ Alothman

³⁹ Shukla

⁴⁰ Sun

⁴¹ Hydroxycinnamic acid

⁴² Flavonoids

⁴³ Ferulic acid

⁴⁴ Caffeic acid

⁴⁵ Rosmarinic acid

⁴⁶ Luteolin

⁴⁷ 7-1-glucoside

⁴⁸ Flavonolignans

⁴⁹ Phenolic acids

را کاهش می‌دهد که نشان‌دهنده آسیب آنزیم‌های پاد اکسایشی می‌باشد و در نتیجه رادیکال‌های آزاد تولید شده باعث پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود که در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌گردد. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که می‌توان از چندین تغییر آسیب‌زای القاء شده به وسیله پیتید بتا آمیلوئید از طریق مواجهه با عصاره گیاه بادرشبو جلوگیری نمود. در تحقیقی نشان داده شد که کمپلکس سیلیمارین^{۵۱} موجود در عصاره گیاه با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی و تعدیل میزان گلوکوتایون، توانایی حفاظت نورون‌ها در برابر استرس اکسیداتیو را دارد (۴۰).

اگر چنانچه قبل از افزودن پیتید بتا آمیلوئید سلول‌های PC12، یک ساعت با عصاره گیاه مواجهه شده باشند؛ میزان بقا سلولی آن‌ها در مقایسه با گروه مواجهه شده با پیتید بتا آمیلوئید افزایش خواهد یافت. همچنین تولید افزایش یافته گونه‌های فعال اکسیژن ایجاد شده به وسیله پیتید بتا آمیلوئید در پاسخ به مواجهه با عصاره گیاهی کاهش می‌یابد. همچنین کاهش فعالیت آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز ایجاد شده به وسیله پیتید بتا آمیلوئید با مواجهه سلول‌ها با عصاره گیاهی قابل جبران است. در نتیجه عصاره گیاه بادرشبو می‌تواند از طریق جبران توان دفاع پاد اکسایشی سلول و پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن ایجاد شده از آسیب‌های اکسایشی، سلول را حفظ نماید که این مسئله با کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدها در گروهی که با پیتید بتا آمیلوئید و عصاره مواجه بودند، نمایان است.

این یافته بیانگر این می‌باشد که توانایی حفاظت سلولی مشاهده شده را می‌توان به خصوصیت پاد اکسایشی این گیاه نسبت داد. این نتایج نشان می‌دهند که عصاره گیاه می‌تواند به‌طور مؤثر از استرس اکسایشی ایجاد شده به وسیله پیتید بتا آمیلوئید جلوگیری کرده و نقش مهمی در مسیرهای دفاع سلولی بر علیه استرس اکسایشی در طول فرایندهای تحلیل برنده عصبی در بیماری آلزایمر داشته باشد.

تشکر و قدردانی

در پایان، برخورد لازم می‌دانیم مراتب قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور و کلیه عزیزانی که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند، اعلام نماییم.

فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH را می‌توان به محتوای فنلی و فلاونوئیدی عصاره نسبت داد. در کل افزایش غلظت ترکیبات فنلی به‌طور مستقیم میزان توانایی عصاره را در مهار رادیکال آزاد افزایش می‌دهد. در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنلی، به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل^{۵۰} موجود در محیط واکنش، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد. فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد توسط فلاونوئیدها نیز به حضور گروه‌های هیدروکسیل آزاد وابسته است (۳۳).

نتایج به دست آمده توسط عربشاهی و عروج (۳۴)، ساحرین و همکاران (۳۵) و سان و همکاران (۳۰) از نظر وجود ارتباط بین مقدار ترکیبات فنلی عصاره‌ها و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها، با نتایج حاصل شده در این پژوهش مطابقت داشت. این محققین فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی عصاره‌های گیاهی را با میزان بالای فنل‌ها و فلاونوئیدهای موجود در عصاره مرتبط دانستند. در تحقیقی گزارش شده است که فراوان‌ترین ترکیب عصاره آبی گیاه بادرشبو، رزمارینیک اسید می‌باشد و خواص آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌آلزایمری این گیاه نیز به اسید رزمارینیک نسبت داده شده است (۹).

اثر حفاظتی عصاره گیاه بادرشبو در برابر سمیت سلولی القاء شده به وسیله پیتید بتا آمیلوئید نیز در مرحله بعد مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد عصاره این گیاه با غلظت‌های بالاتر از ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر حفاظتی کاملی ایجاد می‌کند. مطالعات نیز نشان می‌دهند عوامل آنتی‌اکسیدانی می‌توانند با کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از پیتید بتا آمیلوئید از مرگ سلول عصبی جلوگیری نمایند (۳۶، ۳۷). پیتید بتا آمیلوئید هسته اصلی پلاک‌های پیری در مغز بیماران آلزایمری می‌باشد و نشان داده شده است که این پیتید در حیوانات آزمایشگاهی و در کشت سلول عصبی سمی است (۳۸). یکی از مکانیسم‌های سمیت سلولی پیتید بتا آمیلوئید از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو می‌باشد که در این آزمایش به‌خوبی نشان داده شده است و با مطالعات قبلی که در این زمینه انجام شده است، مطابقت دارد (۳۸، ۳۹).

پیتید بتا آمیلوئید باعث افزایش گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های PC12 می‌شود و فعالیت آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز

منابع

1. Zampagin M, Wright D, Cascella R, D'Adamio G, Casamenti F, Evangelisti E, et al. Novel S-acyl glutathione derivatives prevent amyloid oxidative stress and cholinergic dysfunction in Alzheimer disease models. *Free Radic Biol Med*. 2012; 52(8): 1362-71.
2. Steel M, Stuchbury G, Mvnc G. Molecular basis of the prevention Alzheimer's disease through healthy nutrition. *Exp Gerontol*. 2007; 42(1): 28-36.
3. Butterfield DA, Reed T, Newman SF, Sultana R. Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and mild cognitive impairment. *Free Radic Biol Med*. 2007; 43(5): 658-77.
4. Miranda S, Opazo C, Larrondo LF, Munoz 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.

^{۵۰} Hydroxyl

^{۵۱} Silymarin complex

5. Butterfield AD, Drake J, Pocernich C, Castegna A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid β -peptide. *Trends Mol Med*. 2001; 7(12): 548-54.
6. Kamata H, Oka S, Shibukawa Y, Kakuta J, Hirata H. Redox regulation of nerve growth factor-induced neuronal differentiation of PC12 cells through modulation of the nerve growth factor receptor, TrkA. *Arch Biochem Biophys*. 2005; 434: 16-25.
7. Fujita T, Maturana AD, Ikuta J, Hamada J, Walchli S, Suzuki T, et al. Axonal guidance protein FEZ1 associates with tubulin and kinas in motor protein to transport mitochondria in neuritis of NGF-stimulated PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 36: 605-10.
8. Das KP, Freudenrich TM, Mundy WR. Assessment of PC12 cell differentiation and nitrite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures. *Neurotoxicol Teratol*. 2004; 26: 397-406.
9. Dastmalchi K, Dorman HG, Kosar M, Hiltunen R. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water soluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L. (extract. *Food Sci Technol*. 2007; 40(2): 239-48.
10. Hosseinzadeh H, Ramazani M, Danaei R. Antihyperglycemic effect and acute toxicity of S.S L Seedextracts in mice. *Phytother Res*. 2002; 16: 745-7.
11. Mollaei A, Rezaei K, Khodayian F, Razavi S. Extraction and identification functional compound from barberry's fruit extracts. *Iranian National Functional Food Conference*. 2010; 3: 341-50.
12. Akowuah GA, Ismail Z, Norhayati I, Sadikun A. The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food Chem*. 2005; 93: 311-7.
13. Villano D, Fernandez-Pachon MS, Moya ML, Troncoso AM, GarciaParrilla MC. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*. 2007; 71(1): 230-5.
14. Prevc T, Segatin N, Ulrih NP, Cigić B. DPPH assay of vegetable oils&model antioxidants in protic and aprotic solvents. *Talanta*. 2013; 109: 13-9.
15. Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. Anti-oxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J Agr Food Chem*. 1992; 40: 945-8.
16. Dan Q, Frederic J, Seidle R, Theodore A. Oxidative mechanisms contributing to the developmental neurotoxicity of nicotine and chlorpyrifos. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005; 206: 17-26.
17. Hua Shi D, Hua Wu J, Ming Ge H, Ren Xiang T. Protective effect of hopeahainol A, a novel acetyl cholinesterase inhibitor, on hydrogen peroxide-induced injury in PC12 cells. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2009; 28: 30-6.
18. Javidnia K, Miri R, Amirghofran Z, Jafari A, Amoozegar Z. Cytotoxicity and antimicrobial assessment of *Euphoria hebecarpa*. *Iran j Pharm Res*. 2004; 3(2): 75-82.
19. Qiu Xiao X, Wang R, Fan Han Y, Tang XC. Protective effects of huperzine A on beta-amyloid (25-35) induced oxidative injury in rat pheochromocytoma cells. *Neurosci Lett*. 2005; 286(3): 155-8.
20. Roghani M, Baluchnejadmojarad T. Chronic epigallocatechin-gallate improves aortic reactivity of diabetic rats: underlying mechanisms. *Vascul Pharmacol*. 2009; 51(2-3): 84-9.
21. Meagher EA, FitzGerald GA. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28: 1745-50.
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *anal. Biochem*. 1976; 72: 248-54.
23. Hardy J, Dennis J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002; 297(5580): 353-6.
24. Lucio G, Hodgson E, Lawrenc DA, Ozolins TR, Reed DJ, Greenlee WF. Assessment of cell toxicity, measurement of lipid peroxidation, current protocols in toxicol. *John Wiley & Sons Inc*. 2008; p. 3-5.
25. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 2009; 70(1):158-69.
26. Liang LP, Patel M. Seizure-induced changes in mitochondrial redox status. *Free Radical Biol Med*. 2006; 15; 40(2): 316-22.
27. Liu P, Yang B, Kallio H. Characterization of phenolic compounds in Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge. var. major) fruit by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass

spectrometry. Food Chem. 2010; 121: 1188-97.

28. Alothman M, Bhat R, Karim AA. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. Food Chem. 2009; 115: 785-8.

29. Shukla Sh, Mehta A, Bajpai VK, Shukla S. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. Food Chem Toxicol. 2009; 47: 2338-43.

30. Sun L, Zhang J, Lu X, Zhang L, Zhang Y. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. Food Chem Toxicol. 2011; 49: 2689-96.

31. Saeidnia S, Gohari AR, Ito M, Kiuchi F, Honda G. Bioactive constituents from *Dracocephalum subcapitatum* (O. Kuntze) Lipsky. Z Naturforsch C. 2005; 60(1-2): 22-4.

32. Craig WJ. Health-promoting properties of common herbs. Am J Clin Nutr. 1999; 70: 491-9.

33. Sharififar F, Dehghn-Nudeh G, Mirtajaldini M. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium Polium* L. Food Chem. 2009; 112: 885-8.

34. Arabshahi DS, Urooj A. Antioxidant properties of

various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. Food Chem. 2007; 102: 1233-40.

35. Sahreen S, Rashid Khan M, Ali Khan R. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. Food Chem. 2010; 122: 1205-11.

36. Fraschini F, Demartini G, Exposit D. Pharmacology of Silymarin. Cline Drug Invest. 2002; 22(1): 51-65.

37. Vinik AI, Porte D Jr, Sherwin RS, Baron A. Diabetic autonomic neuropathy. In Ellenberg and Rifkin diabetes mellitus. 6th ed. New York: McGraw Hill. 2002; 789-804.

38. 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: 716-24.

39. Butterfield DA. Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. Free Radic Res. 2002; 36(12): 1307-13.

40. Zhang DL, Zhang YT, Yin JJ, Zhao BL. Oral administration of crataegus flavonoids protects against ischemia/reperfusion brain damage in gerbils. J Neurochem. 2004; 90(1): 211-9.