Investigation of Chemical Composition of *Lippia Citriodora:* Essential Oil of *Lippia Citriodora* Promote Survival of PC12 Cells Following Treatment with H_2O_2

Sahar Babaei Abrak[1], Rahele Zhiani[2*]

[1]Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Khorasan Razavi Science and Research Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran.
[2]Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran.

Article Info:
Received: **20 Jan, 2014** ***Accepted:*** **14 Feb, 2014**

ABSTRACT

Introduction: Lemon herbena (*Lippia citriodora*) is a member of Verbenaceae family. This plant is endemic to South America and can growth in other areas, such as Iran. The aim of this study was to investigate and compare the chemical composition of the two production plants in the greenhouse and field of a lemon. ***Materials and Methods:*** Plants were cultivated in a Sarayan Ferdowsi area (south of Khorasan). Fourth kg of leaves was collected. Then, essential oil was extracted from fresh leaves using water and steam distillation. Finally, we treated PC12 cells with the essential oil that obtained from *Lippia citriodora*. The cell viability was evaluated by the MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) assay. ***Results:*** Our results from GC-MS (Gas chromatography–mass spectrometry) method showed that greenhouse and field samples contained 0.68% and 0.62% (w/w), respectively. In addition, the data showed that the essential oil decreased oxidative stress-induced PC12 cell death. ***Conclusion:*** The results suggest that *Lippia citriodora* could be a potential candidate for treatment of neurodegenerative diseases.

Key words:

1. Gas Chromatography-Mass Spectrometry
2. Verbenaceae
3. Oxidative Stress
4. PC12 Cells

**** Corresponding Author:*** Rahele Zhiani
E-mail: *R_zhiani2006@yahoo.com*

بررسی ترکیبات شیمیایی گیاه به لیمو (*Lippia Citriodora*): اسانس گیاه به لیمو بقای سلول های PC12 تیمار شده با H_2O_2 را افزایش می دهد

سحر بابایی آبراک[۱]، راحله ژیانی[۲*]

[۱]گروه شیمی، دانشکده علوم، واحد علوم و تحقیقات خراسان رضوی، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران.
[۲]گروه شیمی، دانشکده علوم، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۳۰ دی ۱۳۹۲
تاریخ پذیرش: ۲۵ بهمن ۱۳۹۲

چکیده

مقدمه: گیاه دارویی به لیمو (*Lippia Citriodora*) از خانواده ی شاه پسند (Verbenaceae) می باشد. این گیاه بومی آمریکای جنوبی است و در سایر نقاط جهان از جمله ایران نیز کاشته می شود. هدف از این مطالعه مقایسه ی ترکیبات شیمیایی موجود در دو نمونه ی گیاه به لیمو تولید شده در گلخانه و مزرعه می باشد. **مواد و روش ها:** گیاهان در منطقه ی سرایان فردوسی (خراسان جنوبی) کشت داده شدند. حدود ۴ کیلوگرم از برگ های تازه جمع آوری گردید. سپس اسانس روغنی از برگ های تازه با روش تقطیر با آب و بخار از برگ های خشک هر دو نمونه استخراج شد. در نهایت سلول های شبه نورونی PC12 را با اسانس روغنی به دست آمده از گیاه به لیمو تیمار نمودیم. میزان بقای سلول ها با استفاده از تکنیک MTT اندازه گیری شد. **یافته ها:** نتایج ما از دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی نشان داد که نمونه های گلخانه ای و مزرعه به ترتیب شامل ۰/۶۸ و ۰/۶۲ درصد (وزنی/وزنی) بودند. داده ها نشان داد که اسانس روغنی گیاه، مرگ سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو را کاهش می دهد. **نتیجه گیری:** یافته ها نشان می دهد که گیاه به لیمو می تواند کاندید مناسبی جهت درمان بیماری های تخریب نورونی باشد.

کلید واژه ها:
۱. گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی
۲. خانواده ی شاه پسند
۳. استرس اکسیداتیو
۴. سلول های PC12

* **نویسنده مسئول:** راحله ژیانی
آدرس الکترونیکی: *R_zhiani2006@yahoo.com*

مقدمه

گیاه به لیمو با نام علمی *Lippia Citriodora* از خانواده ی Verbenaceae، درختچه ای به ارتفاع ۱/۵ تا ۲ متر است، این گیاه بومی آمریکای جنوبی است و در پایان قرن هفدهم به اروپا معرفی شد (۱). امروزه این گیاه در شمال کشورمان کشت و کار می شود (۲). برگ های این گیاه به صورت کشیده و به رنگ سبز کم رنگ به صورت دسته های سه تایی بر روی ساقه قرار می گیرند. در طب گیاه درمانی ایران، برگ های این گیاه به صورت دم کردنی به منظور آرام بخشی، ضد تشنج و برطرف کننده تپش قلب و سرگیجه مصرف دارد. چای به لیمو فوق العاده آرام بخش و تسکین دهنده ی اعصاب است (۵-۳). بررسی های اخیر مواد عمده ی موجود در اسانس این گیاه را سیترال (ژرانیال، نرال)، ژرانیول، لیمونن و سینئول ذکر کرده اند (۶).

با توجه به توسعه ی کشت و کار، تولید محصولات کشاورزی خارج از فصل، با تغییرات در کیفیت ها مواجه شدند تا جایی که طعم، عطر و خاصیت بسیاری از محصولات دستخوش این دستکاری های بشر شد و انسان برای تأمین دارو و غذا برای جمعیت در پیش رو از تمام امکانات بهره جست و در مناطق کم باران و کم بازده به ایجاد تولیدات گلخانه ای روی آورد (۷). این محصولات می توانستند در این محیط ها تحت کنترل کامل بوده و حتی خارج از فصل با افزایش عملکرد چشمگیر تولید شوند. گیاهان دارویی که ارزش دارویی آن ها بسیار حائز اهمیت است نیز وارد این تولیدات شدند چرا که تولید کنندگان، عملکرد را مورد توجه قرار می دهند و کیفیت به علت مهجور بودن از دیدگاه مشتری و تولید کننده قابل بحث نیست.

گیاهانی که ارزش آن ها به دارو بودن و کیفیت و سلامت آن هاست اهمیت ویژه ای دارند. پس لازم است با توجه به افزایش عملکرد و سطوح برداشت در محصولات گلخانه ای به تفاوت های ترکیبات غذایی و دارویی گیاه نیز توجه نمود و طرح هایی برای استاندارد سازی و مقایسه ی تولید محصولات گلخانه ای و مزرعه ای نیز تدوین نمود (۸). ایجاد چنین طرح هایی نیاز به مطالعه ی علمی یک محصول تولیدی در گلخانه و مزرعه دارد که بایستی با علوم فیتوشیمی، فیزیولوژی گیاهی، مبانی کشاورزی پایدار، بیوشیمی، اکولوژی و سایر حوزه های علمی به بررسی یک فرآیند تولیدی محصول پرداخت تا سلامت محصول، مصرف کننده و در نهایت زیست کرد، تأمین گردد.

از ابتدایی ترین گام ها می توان به بررسی ترکیبات اصلی این دو شیوه ی تولید، بررسی باقیمانده ی سموم و مواد شیمیایی با همکاری محققین پرداخت. با توجه به اهمیت گیاهان در صنایع دارویی در این مطالعه قصد داریم ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه به لیموی تولید شده در گلخانه و مزرعه را به کمک روش GC-MS[1] شناسایی و درصد آن را در اسانس دو نمونه مشخص و مقایسه کنیم تا به این وسیله راه را برای استفاده ی بهتر از این دو نمونه در ساخت دارو و سایر مصارف هموارتر کنیم. همچنین در این مطالعه به بررسی اثرات اسانس روغنی گیاه به لیمو می پردازیم.

مطالعات گذشته، خواص آنتی اکسیدان این گیاه را در سلول های خونی بررسی نموده اند (۱۰، ۹). همچنین در طب سنتی از این گیاه جهت آرامش اعصاب بسیار استفاده شده است. اما تاکنون مطالعه ای در راستای سلول های نورونی صورت نگرفته است. از آنجا که استرس اکسیداتیو به عنوان عامل اصلی در بیماری های تخریب نورونی[2] شناخته شده است (۱۲، ۱۱) در این مطالعه، سلول های PC12 را تحت تأثیر غلظت های مختلف اسانس روغنی گیاه به لیمو قرار داده و نقش آن را در محافظت از نورون های تحت استرس اکسیداتیو بررسی می نماییم.

مواد و روش ها

رتینوئیک اسید[3] (RA) و MTT از شرکت سیگما (St. Louis, MO) خریداری شد. محیط کشت RPMI 1640[4] و سرم گاوی جنینی[5] (FBS) از شرکت گیبکو (Big Cabin, Oklahoma, USA) خریداری شدند. سلول های PC12[6] از پژوهشکده پاستور (تهران-ایران) تهیه شد.

نمونه ی گیاهی

در این طرح ابتدا مزرعه و گلخانه ای در سرایان فردوسی (خراسان جنوبی) که به تولید این گیاه می پرداختند شناسایی شد. از مزرعه و گلخانه ای که این گیاه را بصورت علمی کشت می دادند و نیازهای آبی و غذایی آن ها بطور یکسان تأمین گردیده بود، پس از بررسی شرایط اکولوژی که باید یکسان باشد بطور کاملاً تصادفی برگ های این گیاه از تمام مزرعه در حدود ۴ کیلوگرم تازه جمع آوری گردید و برگ ها به خوبی مخلوط شدند (مجموع برگ های برداشت شده) و از گلخانه نیز همین مقدار با روش قبل تهیه شد. هر دو نمونه در شرایط یکسان در دمای محیط (دمایی حدود ۲۵ درجه ی سانتی گراد) با تهویه ی یکسان خشک شدند و رطوبت آن ها به حداقل در برگ ها رسید.

اسانس گیری

سپس برگ ها به آزمایشگاه برده شد و مرحله ی اسانس گیری با روش تقطیر با آب و بخار از برگ های خشک هر دو نمونه بطور مجزا انجام شد. اسانس مورد نظر جمع آوری و توسط سولفات سدیم انیدرید آبگیری شد و تا زمان انجام آنالیز در ظرف در بسته در یخچال نگهداری شد. اسانس حاصل با روش کروماتوگراف گازی متصل به طیف نگار جرمی آنالیز و اجزای مختلف موجود در آن به روش مقایسه ی طیف های جرمی تک تک اجزاء با طیف های شاهد و نیز محاسبه ی ضریب بازداری مواد متشکله و استفاده از طیف های جرمی مواد استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه ای کامپیوتری شناسایی و تعیین مقدار شدند.

شناسایی ترکیبات و تعیین درصد اجزاء متشکله ی اسانس و مشخصات دستگاه

دستگاه کروماتوگراف گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC/Mass) ساخت شرکت Gilent Technologes برای شناسایی ترکیبات

[1] Gas chromatography–mass spectrometry
[2] Neurodegenerative Disease
[3] Retinoic Acid
[4] Roswell Park Memorial Institute (RPMI)
[5] Fetal Bovine Serum
[6] Rat Pheochromocytoma

استفاده شد. برنامه ریزی دمایی آون این گونه بود که دمای اولیه، ۶۰ درجه ی سانتی گراد و مدت زمان توقف در این دما ۳ دقیقه بود. مدت افزایش دما ۵ درجه بر دقیقه بوده است. دمای نهایی ۲۸۰ درجه ی سانتی گراد و مدت زمان توقف در دمای نهایی ۵۷ دقیقه بوده است. نحوه ی تزریق (۲:۱) split بوده است و همچنین ستون استفاده شده در این دستگاه دارای طول ۳۰ متر، قطر خارجی ۲۵۰ میکرومتر و قطر داخلی ۰/۱۵ میکرومتر بوده است.

کشت سلولی

سلول های PC12 که از بانک سلولی انستیتو پاستور به صورت فلاسک آماده و نیز ویال فریز شده خریداری گردیده بود، در محیط RPMI 1640 حاوی سرم ۱۰ درصد و آنتی بیوتیک ۱٪ کشت داده شدند. همچنین این سلول ها در دمای ۳۷°C و رطوبت ۹۵٪ و میزان CO2 ۵٪ در انکوباتور نگهداری شدند.

تمایز سلول ها و درمان با اسانس گیاه به لیمو

این سلول ها به مدت ۸ روز در مجاورت RA با غلظت ۱۰ میکرومولار قرار گرفتند. RA در اتانول حل شد و در تاریکی به محیط کشت سلول ها اضافه شد (۱۴، ۱۳). محیط سلول ها یک روز در میان تعویض شد. در هنگام تمایز از محیط حاوی سرم ۱٪ استفاده شد. مورفولوژی این سلول ها از لحاظ میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت.

پس از تمایز سلول ها به تعداد 10^4 سلول در هر چاهک، در پلیت های ۹۶ خانه کاشته شده و پس از ۲۴ ساعت در معرض غلظت های مختلف ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار اسانس روغنی به لیمو قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت، ترکیب پراکسید هیدروژن[7] (۳۰۰ میکرومولار) به سلول ها افزوده شد و سلول ها به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور انکوبه شدند.

اندازه گیری میزان زنده بودن سلول ها

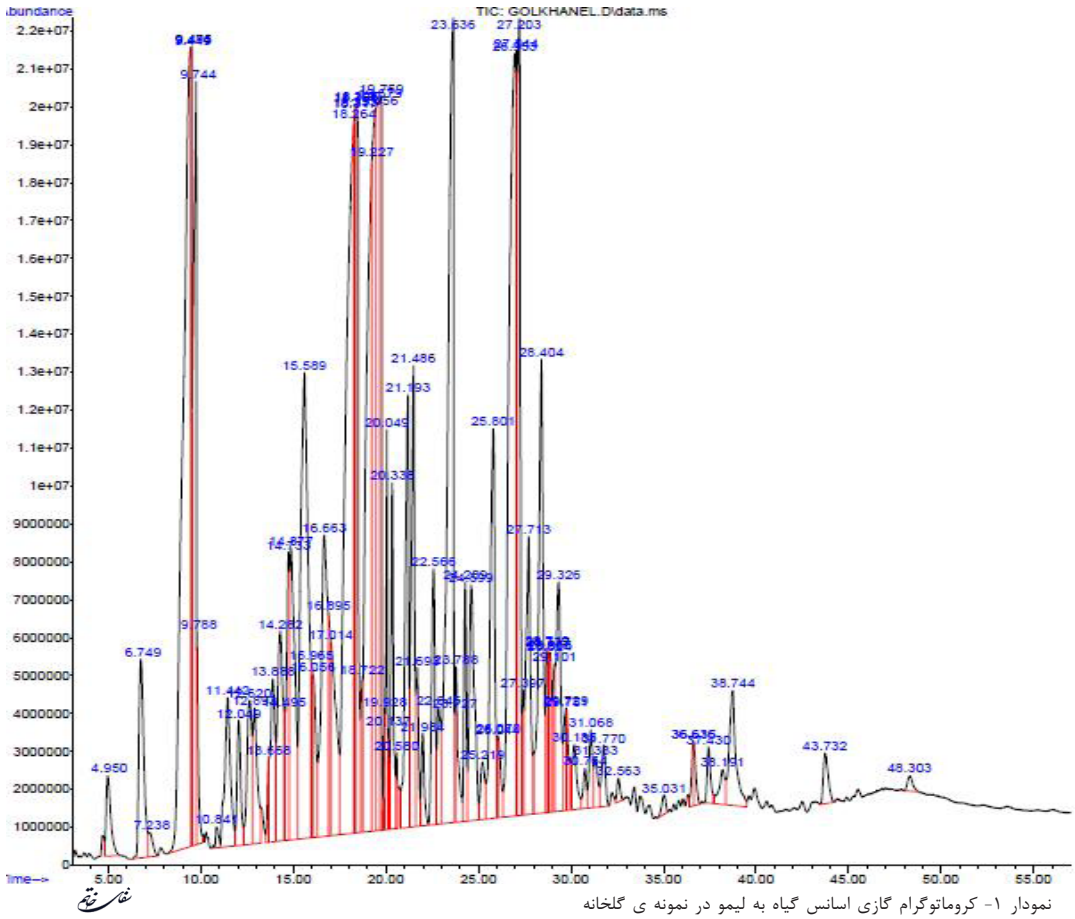
میزان زنده بودن سلول ها با روش MTT اندازه گیری شد. در این روش، بلورهای آبی فورمازان[8] در سلول های سالم تشکیل می شود. میزان نور آبی در طول موج ۶۳۰-۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده ها

داده ها به صورت Mean ± SEM گزارش شده است. آزمایشات به صورت مستقل از هم و سه بار تکرار شده است.

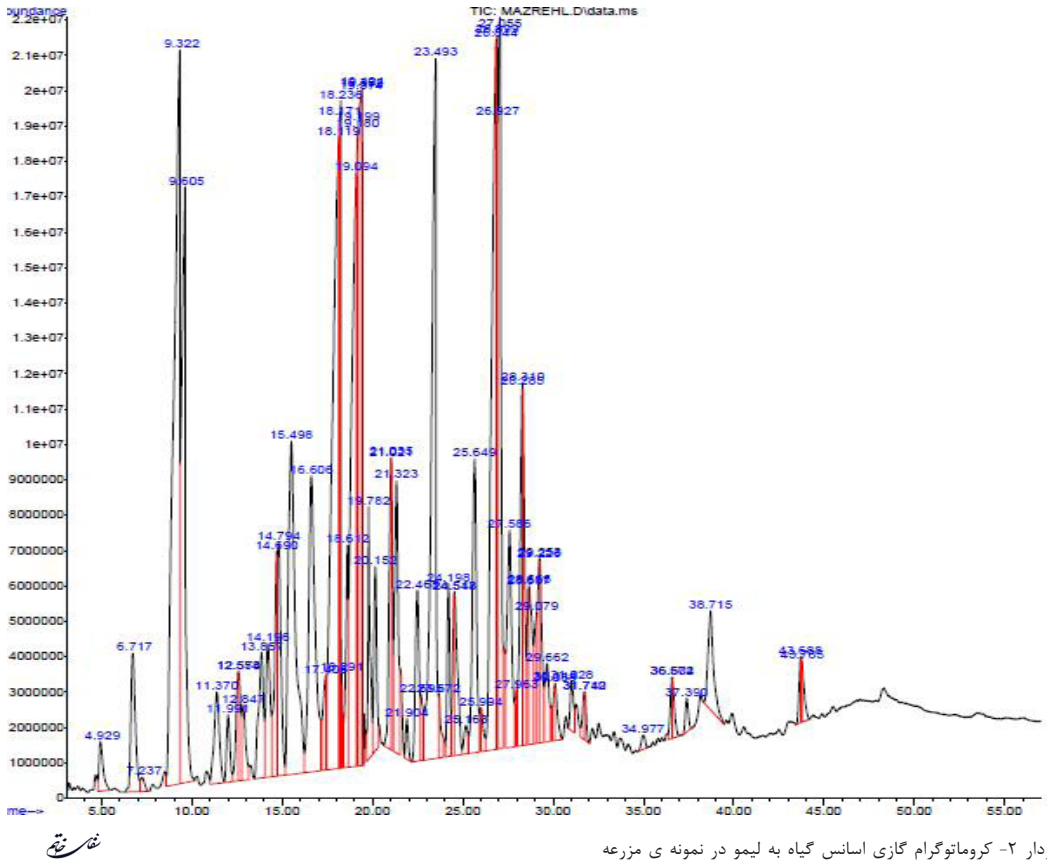
یافته ها

بیشترین مقدار اجزای اسانس نمونه ی گلخانه و مزرعه را ترکیبات تریپنوئیدی تشکیل می دادند. اسانس به دست آمده ی گیاه به لیمو دارای بوی بسیار تند و رنگ زرد پررنگ (متمایل به نارنجی- قرمز) است. میزان اسانس حاصل از نمونه ی گلخانه ۰/۶۸ و نمونه ی مزرعه ۰/۶۲ درصد (وزنی/ وزنی) بود. طیف کروماتوگرام گازی بدست آمده در نمودار ۱ و ۲ نشان داده شده است.



نمودار ۱- کروماتوگرام گازی اسانس گیاه به لیمو در نمونه ی گلخانه

[7] Hydrogen Peroxide (H_2O_2)
[8] Formazan



نمودار ۲- کروماتوگرام گازی اسانس گیاه به لیمو در نمونه ی مزرعه

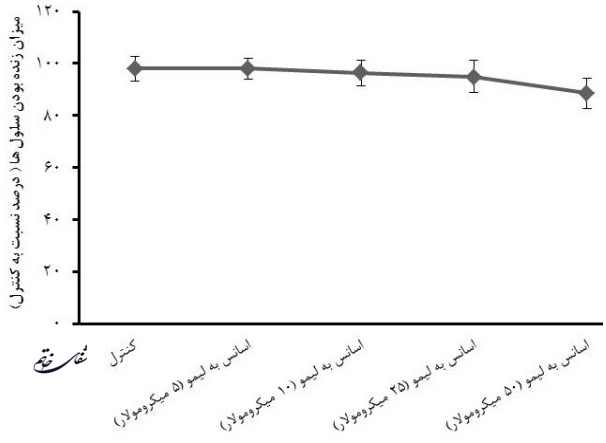
نتایج آنالیز دستگاهی نشان داد که در بین ترکیبات شناسایی شده در اسانس نمونه ی گلخانه ۴۳ ماده یافت شد که شامل ۹۷/۸۸٪ کل ترکیبات بوده و در نمونه ی مزرعه ۳۸ ماده شناسایی شد که ۹۶/۲۸٪ کل ترکیبات را شامل می شوند. همچنین با مطالعه و بررسی دقیق زمان های بازداری ترکیب‌ها، شاخص های بازداری[9] کواتس، طیف‌های جرمی و مقایسه ی کلیه ی این پارامترها با ترکیب‌های استاندارد صورت گرفته شده، مشخص شد که این دو نوع نمونه ی مزرعه و گلخانه از لحاظ مقادیر و حتی در برخی مواد با یکدیگر تفاوت خیلی اندکی دارند. اجزاء عمده ی نمونه ی گلخانه، E-سیترال (۱۲/۸۰ درصد)، Z-سیترال (۱۱/۲۵ درصد)، لیمونن (۸/۵۶ درصد) و کرایوفیلن اکسید به میزان ۶/۴۸ درصد بودند. نمونه ی مزرعه حاوی E-سیترال (۱۲/۰۴ درصد)، Z-سیترال (۱۰/۶۳ درصد)، لیمونن (۸/۵۳ درصد) و کرایوفیلن اکسید به میزان ۶/۷۲ درصد بودند (جدول شماره ۱ و ۲).

اسانس گیاه به لیمو در سلول های شبه نورونی PC12 هیچگونه اثر سمی ندارد.

به منظور بررسی اثر سمیت اسانس روغنی به لیمو، از تست MTT استفاده شد. مبنای تست MTT احیای ماده تترازولیم، با رنگ مشخص زرد، به ماده فورمازان بنفش رنگ توسط آنزیم های سلول زنده است.

فورمازان تشکیل شده در حلالی همانند DMSO[10] (۰/۱ درصد) حل شده و از روی جذب نمونه ها، میزان سلول های زنده به طور نسبی تعیین می شود. هر چقدر تعداد سلول های زنده بیشتر باشد، این تبدیل بیشتر صورت گرفته و فورمازان بیشتری تولید می شود که در نهایت ما شاهد افزایش جذب خوانده شده خواهیم بود.

بدین منظور سلول ها را با RA تمایز داده و سپس در پلیت های ۹۶ خانه کاشته شدند. پس از ۲۴ ساعت، این سلول ها با غلظت های مختلف ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار اسانس روغنی به لیمو انکوبه شدند. پس از ۲۴ ساعت، با استفاده از تست MTT میزان زنده بودن سلول ها اندازه گیری شد. نتایج حاصل (نمودار ۳) نشان می دهد در هیچ کدام از سلول های تیمار شده با اسانس روغنی به لیمو با غلظت های ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار پس از ۲۴ ساعت مرگ قابل ملاحظه و معنا داری نسبت به سلول های کنترل دیده نشد.



نمودار ۳- اثر اسانس روغنی به لیمو بر سلول های تمایز یافته ی PC12. سلول های تمایز یافته ی PC12 با غلظت های ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار اسانس روغنی به لیمو انکوبه شدند. پس از ۲۴ ساعت میزان زنده بودن سلول ها به روش MTT تعیین شده و نتایج به صورت درصد نسبت به کنترل محاسبه شده است.

[9] Retention Index (RI)
[10] Dimethyl sulfoxide (DMSO)

جدول شماره۱- شناسایی اجزای اسانس به لیمو (*Lippia citriodora*) در نمونه ی گلخانه به وسیله ی GC-MS

ردیف	ترکیبات شیمیایی	ناحیه (٪)	شاخص بازداری
۱	α-Pinene	٪ ۰/۴۸	۹۵۶
۲	Sabinene	٪ ۱/۲۸	۱۰۲۱
۳	β-Pinene	٪ ۰/۱۴	۱۰۳۷
۴	Limonene	٪ ۵۶/۸	۱۱۲۴
۵	p-Cymene	٪ ۳/۱۴	۱۱۴۶
۶	(E)-β-Ocimene	٪ ۰/۴۲	۱۱۵۰
۷	cis-sabinene hydrate	٪ ۱/۱۱	۱۲۲۱
۸	Rosefuran	٪ ۰/۶۰	۱۲۳۴
۹	Linalool	٪ ۱/۷۰	۱۲۴۶
۱۰	cis-Limonene oxide	٪ ۰/۱۶	۱۲۶۹
۱۱	Nicotinyl alcohol	٪ ۰/۹۵	۱۲۷۴
۱۲	۳ -Ethyl-۱,۵-octadiene	٪ ۱/۴۶	۱۲۸۲
۱۳	Camphor	٪ ۳/۱۱	۱۲۹۵
۱۴	Rose furan epoxide	٪ ۴/۵۷	۱۳۱۴
۱۵	Borneol	٪ ۰/۹۴	۱۳۲۸
۱۶	α-Terpineol	٪ ۴/۳۷	۱۳۴۶
۱۷	Z-Citral	٪ ۱۱/۲۵	۱۳۹۴
۱۸	Carvone	٪ ۰/۳۳	۱۴۰۹
۱۹	E-Citral	٪ ۱۲/۸۰	۱۴۴۵
۲۰	α-Copaene	٪ ۰/۸۸	۱۴۵۵
۲۱	β-Bourbonene	٪ ۱/۲۳	۱۴۶۵
۲۲	Geranyl acetate	٪ ۱/۹۳	۱۴۹۴
۲۳	trans-Caryophyllene	٪ ۲/۰۱	۱۵۰۵
۲۴	α-Amorphene	٪ ۰/۴۹	۱۵۱۴
۲۵	Isoeugenol	٪ ۰/۳۶	۱۵۲۷
۲۶	Aromadendrene	٪ ۱/۱۳	۱۵۵۱
۲۷	β-Acoradiene	٪ ۰/۵۲	۱۵۶۳
۲۸	α-Curcumene	٪ ۵/۸۷	۱۶۹۶
۲۹	γ-curcumene	٪ ۰/۵۳	۱۶۰۱
۳۰	γ-Cadinene	٪ ۰/۷۴	۱۶۱۲
۳۱	Calarene	٪ ۱/۶۰	۱۶۱۸
۳۲	Z-Nerolidol	٪ ۰/۳۲	۱۶۳۱
۳۳	E-Nerolidol	٪ ۲/۷۲	۱۶۴۴
۳۴	Caryophyllene oxide	٪ ۶/۴۸	۱۶۶۸
۳۵	Spathulenol	٪ ۰/۶۰	۱۶۷۰
۳۶	۱ -Methyl-۴-isopropylbenzene	٪ ۳/۲۹	۱۶۷۳
۳۷	Campherenone	٪ ۱/۶۰	۱۶۸۴
۳۸	δ-Cadinene	٪۲/۶۳	۱۶۹۹
۳۹	Dillapiole	٪ ۰/۵۰	۱۷۲۴
۴۰	VulgarolB	٪ ۳/۳۷	۱۷۸۰
۴۱	Hexahydrofarnesyl acetone	٪ ۰/۳۵	۱۸۵۳
۴۲	Phytol	٪ ۰/۳۵	۱۹۹۷
۴۳	Z,E-2,13-Octadecadien-1-ol	٪ ۱/۰۱	۲۰۵۹
مجموع		٪ ۹۷/۸۸	

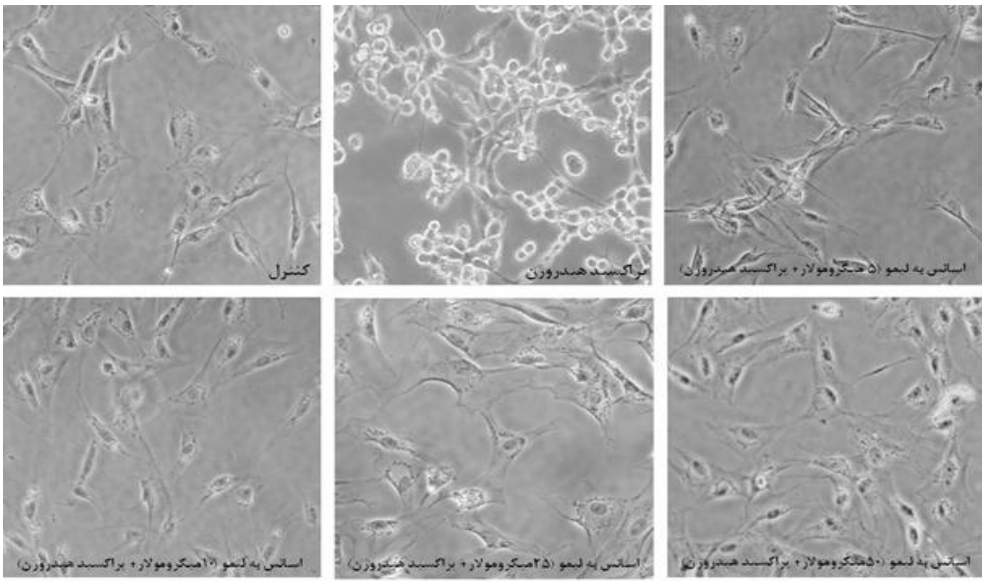
جدول شماره۲- شناسایی اجزای اسانس به لیمو (*Lippia citriodora*) در نمونه ی مزرعه به وسیله ی GC-MS

ردیف	ترکیبات شیمیایی	ناحیه (٪)	شاخص بازداری
۱	α-Pinene	٪ ۰/۴۰	۹۵۵
۲	Sabinene	٪ ۱/۲۳	۱۰۲۰
۳	β-Pinene	٪ ۰/۱۲	۱۰۳۷
۴	Limonene	٪ ۸/۵۳	۱۱۱۵
۵	p-Cymene	٪ ۴/۷۵	۱۱۳۶
۶	cis-Sabinene hydrate	٪ ۰/۹۵	۱۲۲۰
۷	Rosefuran	٪ ۰/۴۵	۱۲۳۳
۸	Linalool	٪ ۱/۵۸	۱۲۴۶
۹	Nicotinyl alcohol	٪ ۱/۲۰	۱۲۷۳
۱۰	۳ -Ethyl-۱,۵-octadiene	٪ ۱/۱۲	۱۲۸۰
۱۱	Camphor	٪ ۲/۹۴	۱۲۹۳
۱۲	Borneol	٪ ۴/۷۴	۱۳۱۲
۱۳	α-Terpineol	٪ ۳/۸۱	۱۳۴۵
۱۴	Z-Citral	٪ ۱۰/۶۳	۱۳۹۴
۱۵	Cumaldehyde	٪ ۱/۰۸	۱۴۰۶
۱۶	E-Citral	٪ ۱۲/۰۴	۱۴۳۴
۱۷	α-Copaene	٪ ۱/۰۱	۱۴۴۶
۱۸	β-Bourbonene	٪ ۱/۰۴	۱۴۵۹
۱۹	Geranyl acetate	٪ ۱/۸۴	۱۴۸۹
۲۰	trans-Caryophyllene	٪ ۱/۹۴	۱۴۹۹
۲۱	IsoEugenol	٪ ۰/۲۰	۱۵۲۳
۲۲	Aromadendrene	٪ ۱/۲۵	۱۵۴۷
۲۳	β-Acoradiene	٪ ۰/۲۸	۱۵۵۷
۲۴	α-Curcumene	٪ ۶/۲۶	۱۵۹۰
۲۵	γ-Curcumene	٪ ۰/۳۰	۱۵۹۸
۲۶	γ-Cadinene	٪ ۰/۹۱	۱۶۱۰
۲۷	Calarene	٪ ۱/۵۵	۱۶۱۷
۲۸	Z-Nerolidol	٪ ۰/۲۱	۱۶۳۱
۲۹	E-Nerolidol	٪ ۲/۴۱	۱۶۴۱
۳۰	Caryophyllene oxide	٪ ۶/۷۲	۱۶۶۶
۳۱	Spathulenol	٪ ۱/۳۸	۱۶۶۷
۳۲	۱ -Methyl-۴-isopropylbenzene	٪ ۴/۳۲	۱۶۷۱
۳۳	δ-Cadinene	٪ ۳/۰۱	۱۷۹۷
۳۴	Dillapiole	٪ ۱/۵۲	۱۷۲۰
۳۵	VulgarolB	٪ ۲/۶۷	۱۸۷۴
۳۶	Hexahydrofarnesyl acetone	٪ ۰/۳۲	۱۸۵۱
۳۷	Phytol	٪ ۰/۵۰	۲۰۹۷
۳۸	۹ -Octadecenoic acid	٪ ۱/۰۷	۲۰۵۸
مجموع		٪ ۹۶/۲۸	

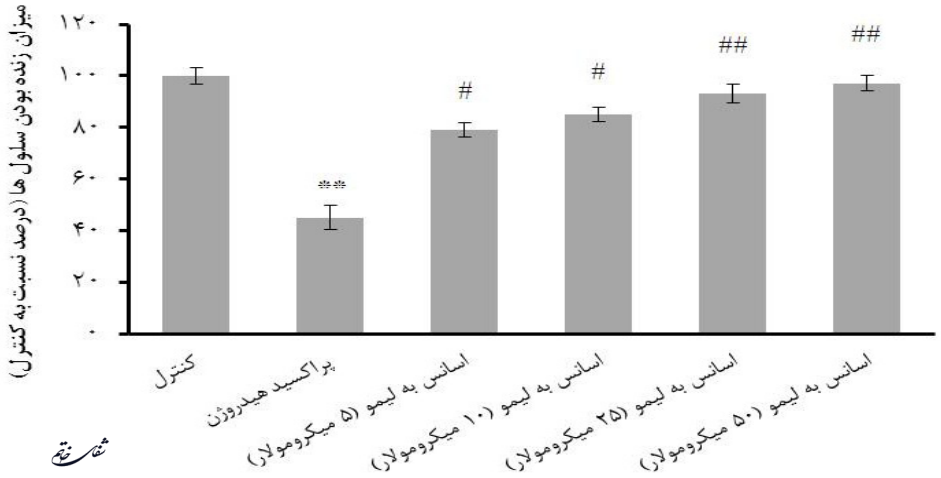
اسانس گیاه به لیمو، سلول های شبه نورونی PC12 را از مرگ سلولی ناشی از H_2O_2 حفظ می کند.

بررسی مورفولوژیکی سلول ها در جهت تأیید اثر حفاظتی اسانس به لیمو انجام شد. بدین منظور، سلول ها به تعداد 10^4 سلول در هر چاهک، در پلیت های ۹۶ خانه کاشته شدند. پس از ۲۴ ساعت، این سلول ها با غلظت های مختلف ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار اسانس روغنی به لیمو انکوبه شدند. سلول ها به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت اسانس روغنی به لیمو قرار گرفتند. سپس ترکیب H_2O_2 (۳۰۰ میکرومولار) به سلول ها افزوده شد و سلول ها به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور انکوبه شدند. همانطور که در تصویر ۱-الف نشان داده شده است، در سلول هایی که در معرض H_2O_2 قرار گرفتند، شبکه های عصبی که پس از تمایز سلولی با RA تشکیل شده بودند، از بین رفته اند. این در حالیست که حضور اسانس روغنی به لیمو توانسته است به طور قابل توجهی شکل منظم سلول ها را حفظ کند. بر اساس نتایج این بررسی، می توان بیان کرد که اسانس روغنی به لیمو به طور مؤثر و وابسته به غلظت، از سلول های عصبی PC12 در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از H_2O_2 محافظت می کند به منظور تعیین درصد سلول های زنده نسبت به کنترل، تست MTT انجام شد. همانطور که در تصویر ۱-ب مشاهده می شود، در سلول هایی که در معرض H_2O_2 قرار گرفته بودند، بقاء سلول ها به میزان معناداری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($P<0/001$). در حالی که در گروه هایی که با اسانس به لیمو تیمار شده بودند، بقاء سلولی بطور قابل توجهی به صورت وابسته به دوز افزایش یافت ($P<0/05$، $P<0/001$).

الف



ب



تصویر ۱- اثر اسانس روغنی به لیمو بر مرگ سلولی ناشی از پراکسید هیدروژن و مورفولوژی سلول های تمایز یافته ی PC12. سلول های PC12 با رتینوئیک اسید تمایز داده شد و با غلظت های ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار اسانس روغنی به لیمو تیمار شدند. پس از ۲۴ ساعت برای ایجاد استرس اکسیداتیو میزان ۳۰۰ میکرومولار از پراکسید هیدروژن به سلول ها افزوده شد. الف) مورفولوژی سلول ها ۱۲ساعت پس از افزودن پراکسید هیدروژن: در سلول هایی که در معرض پراکسید هیدروژن قرار گرفتند شبکه های عصبی که پس از تمایز سلولی با رتینوئیک اسید تشکیل شده بودند از بین رفته اند. این در حالیست که حضور اسانس روغنی به لیمو توانسته است به طور قابل توجهی شکل منظم سلول ها را حفظ کند.

ب) تست MTT، ۱۲ ساعت پس از افزودن پراکسید هیدروژن، میزان بقاء سلول ها به صورت درصد نسبت به کنترل محاسبه گردید. نتایج به صورت Mean ± SEM گزارش شده است (۳ بار تکرار مستقل از هم، هر بار ۳ بار آزمایش). در سلول هایی که در معرض پراکسید هیدروژن قرار گرفته بودند، بقاء سلول ها به میزان معناداری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($P<0/001$). در گروه هایی که با اسانس به لیمو تیمار شده بودند، بقاء سلولی به طور قابل توجهی به صورت وابسته به غلظت افزایش یافت ($P<0/05$، $P<0/001$). * تفاوت معنی دار نسبت به سلول کنترل. # تفاوت معنی دار نسبت به سلولی که در معرض پراکسید هیدروژن قرار گرفته است.

بحث و نتیجه گیری

امروزه در طب سنتی ایران از گیاهان زیادی برای درمان بیماری ها استفاده می شود. تعداد بسیاری از این گیاهان مربوط به خود کشور ما بوده و تعدادی نیز از سایر کشورها به ایران وارد شده اند. یکی از گیاهانی که در سال های اخیر به ایران وارد شده است گیاه به لیمو می باشد. از آنجا که برگ های این گیاه بویی شبیه لیمو دارند، به آن به لیمو گفته اند (۱). در طب سنتی از این گیاه در درمان سوء هاضمه، نفخ، سردردهای یک طرفه، دردهای عصبی، سرگیجه و علائم سرماخوردگی استفاده می شود. به علاوه در تقویت حافظه و ایجاد آرامش نیز مفید است (۵-۳). اخیراً متابولیت های ثانویه گیاهان دارویی مانند اسانس ها و عصاره های گیاهی از نظر اثرات ضد میکروبی شان مورد بررسی قرار گرفته اند (۱۵) و مشخص شده است که اغلب اسانس های گیاهی استخراج شده از گیاهان دارویی دارای خواص ضد قارچی، ضد انگل، ضد باکتری و ضد ویروس می باشند (۱۶).

مطالعات بسیاری در رابطه با اثرات و خواص آنتی اکسیدان این گیاه صورت گرفته است (۱۰ ،۹). همچنین در مطالعه ای به اثر حفاظتی گیاه به لیمو در سلول های خونی پرداخته شده است. در این بررسی میزان فعالیت آنزیم های کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در سلول های خونی اندازه گیری شده است. افزایش میزان این آنزیم ها در سلول هایی که در معرض آسیب سلولی قرار گرفته اند نشان داد که گیاه به لیمو دارای خواص آنتی اکسیدان می باشد و قادر است سلول های خونی را از مرگ سلولی محافظت نماید (۹). بنابراین لازم است با توجه به افزایش عملکرد و سطوح برداشت در محصولات گلخانه ای به تفاوت های ترکیبات غذایی و دارویی گیاه نیز توجه نمود و طرح هایی برای استاندارد سازی و مقایسه تولید محصولات گلخانه ای و مزرعه ای نیز تدوین نمود. بر این اساس در مطالعه ی حاضر به بررسی میزان ترکیبات موجود در گیاه به لیمو پرداخته ایم. همچنین با مقایسه ی دو روش کشت این گیاه تلاش نمودیم تا روش مناسب تر را در راستای رسیدن به محصولی بیشتر انتخاب نماییم.

ترکیبات شیمیایی اسانس بدست آمده از برگ این گیاه قبلاً گزارش شده است (۱۸-۱۷ ،۶). از جمله ی این ترکیبات می توان به اسانس میرسنون، آلفا- توجون، لیمونن و لیپیفولنن اشاره نمود (۱۹). محققین اسپانیولی نیز در سال ۱۹۷۶ توانسته اند اثبات کنند که گیاه به لیمو حاوی موسیلاژ، اسانس، تانن هیدرولیز شونده، فنل های اسیدی، فلاونوئید و آلکالوئید می باشد (۲۰). نتایج بدست آمده از این پروژه نشان داد که بیشترین مقدار اجزای اسانس نمونه ی گلخانه را ترکیبات تریپنوئیدی (شامل مونو و سزکوئی تریپنوئیدها) مجموعاً ۹۱/۳۶٪ تشکیل می دادند که مونوتریپنوئیدها ۶۲٪ و سزکوئی ترپنوئیدها ۲۹/۳۶٪ می باشند. در نمونه ی مزرعه نیز بیشترین مقدار اجزاء اسانس را ترکیبات تریپنوئیدی (شامل مونو و سزکوئی تریپنوئیدها)، مجموعاً ۹۰/۵۲٪ تشکیل می دادند که مونوتریپنوئیدها ۶۰/۷۳٪ و سزکوئی ترپنوئیدها ۲۹/۷۹٪ می باشند. پس در هر دو نمونه مونوتریپنوئیدها بخش غالب اسانس بودند. مونوتریپنوئیدهای سیترال ۲۴/۵٪ و لیمونن ۸/۵۶ ٪ در نمونه ی گلخانه و در نمونه ی مزرعه مونوتریپنوئیدهای سیترال ۲۲/۶۷٪ و لیمونن ۸/۵۳٪ بودند که مقادیر قابل توجهی از کل اجزاء را به خود اختصاص دادند. سزکوئی ترپنوئیدهای کاریوفیلین اکسید در نمونه ی گلخانه ۶/۴۸٪ و در نمونه ی مزرعه ۶/۷۲٪ بودند. مهمترین ترکیبات مورد استفاده از اسانس گیاه به لیمو در صنایع مختلف به خصوص، صنایع دارویی سیترال و لیمونن می باشد و میزان این ترکیبات در اسانس به دست آمده از مطالعه ی ما در هر دو نمونه قابل توجه بود ولی درصد جزء اصلی یعنی سیترال در نمونه ی گلخانه بیشتر از نمونه ی مزرعه شد. نتایج حاصل از مقایسه ی مواد عمده ی اسانس هر دو نمونه ی ما بیشترین شباهت از نظر مواد عمده را به نمونه های کار شده در ایران، مصر و فرانسه دارند (۲۰ ،۱۹). گیاه به لیموی مورد بررسی، نمونه ی کشت شده در دو محیط گلخانه و مزرعه و در یک ارتفاع می باشد. ترکیبات موجود در اسانس با استفاده از دستگاه GC-MS شناسایی شد. در اسانس حاصل از نمونه ی گلخانه ۴۳ ماده از ۹۷/۸۸٪ و در اسانس نمونه ی مزرعه ۳۸ ماده از ۹۶/۲۸٪ درصد کل ترکیبات شناسایی شدند. مواد عمده ی موجود در هر دو نمونه ی گلخانه و مزرعه، سیترال، لیمونن و کاریوفیلین اکسید بودند. با توجه به اینکه در محیط گلخانه عملکرد و در محیط مزرعه کیفیت مدنظر است، انتظار داشتیم که در نمونه ی مزرعه درصد سیترال بالاتر از نمونه ی مزرعه شود ولی این اتفاق عکس شد. بنابراین اگر ارزشیابی بر اساس ماده مؤثره باشد احتمال می رود گیاهانی که ارزش دارویی دارند در محیط گلخانه کیفیت ماده ی مؤثره آن ها بهتر باشد.

در این بررسی همچنین پس از بدست آوردن اسانس روغنی این گیاه، به بررسی اثر آن بر سلول های تحت استرس PC12 پرداختیم. سلول های PC12 از مدولای غده ی فوق کلیه بدست آمده اند و قادر به ترشح مقادیر زیادی از کاتکول آمین ها، نوراپی نفرین و به میزان کمی اپی نفرین می باشند (۲۱). همچنین همان طور که در تصویر ۱-الف می بینیم به بررسی اثر این گیاه در سلول های تحت استرس اکسیداتیو پرداختیم. نتایج حاصل نشان دادند که این گیاه قادر است در غلظت های بهینه (۲۵ و ۵۰ میکرومولار) سلول های شبه نورونی PC12 را از مرگ سلولی حفاظت نماید. استرس اکسیداتیو عامل اصلی تخریب نورونی در بسیاری از اختلالات عصبی می باشد (۱۲ ،۱۱). استرس اکسیداتیو شامل آسیب به DNA، افزایش اکسیداسیون لیپید و پروتئین می باشد و عامل اصلی در بیماری های تخریب نورونی می باشد (۱۲). سالانه میلیون ها نفر دچار بیماری های تخریب نورونی می شوند (۲۲). بنابراین استفاده از داروهای گیاهی با خاصیت آنتی اکسیدانی در جهت کاهش استرس اکسیداتیو و در نتیجه کاهش تخریب نورونی می تواند یکی از راهکارهای درمان این اختلالات عصبی باشد (۲۴ ،۲۳). مطالعه ی حاضر شواهدی را فراهم می نماید که بیان کننده ی خاصیت دارویی گیاه به لیمو در اختلالات عصبی می باشد و افق جدیدی را برای آزمایشات بیشتر در این زمینه به روی محققان علوم اعصاب می گشاید.

تقدیر و تشکر

این تحقیق به هزینه ی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور و در دانشکده ی شیمی این دانشگاه انجام گرفته است. نویسندگان مراتب قدردانی خود را از معاونت پژوهشی این دانشگاه برای حمایت مالی اعلام می دارند.

منابع

1. Mozaffarian V. A dictionary of Iranian plant names. Tehran: Farhange-e moaser press. 1996; p. 325.

2. Zargari A. Medicinal Plants. 6th ed. Iran: Tehran University Press. 1996; p. 711 - 3.

3. Argyropoulou CC, Daferera D, TarantilisPA. Chemical composition of the essential oilfrom leaves of Lippia citriodora H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages. Plant Geno. Evol. 2007; 35: 831–7.

4. Valentão P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, de Lourdes Basto M. Studies on the antioxidant activity of Lippia citriodora infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. Biol Pharm Bull. 2002; 10: 1324–7.

5. Spector Platt E. Lemon Herbs: How to grow and use 18 great plants, Stackpol Books. USA. 2002: p. 35.

6. Chavallier A. The Encyclopedia of Medicinal Plants, Dorling Kindersley. London. 1996: p. 227.

7. Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke Ch. PDR for Herbal Medicines. 4th ed. Thomson Medical Economics. 2004: p. 525-26.

8. Omid beigi R. Approaches in Production and Processing of Medicinal Plants. Iran: Tarrahane- Nashr publishing Co. 1997: p. 270.

9. Quirantes-Piné R, Herranz-López M, Funes L, Borrás-Linares I, Micol V, Segura-Carretero A, et al. Phenylpropanoids and their metabolites are the major compounds responsible for blood-cell protection against oxidative stress after administration of Lippia citriodora in rats. Phytomedicine. 2013; 12: 1112-8.

10. Portmann E, Nigro MM, Reides CG, Llesuy S, Ricco RA, Wagner ML, et al. Aqueous extracts of Lippia turbinata and Aloysia citriodora (Verbenaceae): assessment of antioxidant capacity and DNA damage. Int J Toxicol. 2012; 2: 192-202.

11. Sims NR. Energy metabolism, oxidative stress and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. Neurodegeneration. 1996; 5: 435−40.

12. Behl C. Alzheimer›s disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. Prog Neurobiol. 1999; 3: 301-23.

13. Matsuoka I, Mizuno N, Kurihara K. Cholinergic differentiation of clonal rat pheochromocytoma cells (PC12) induced by retinoic acid increase of choline acetyltransferase activity and decrease of tyrosine hydroxylase activity. Brain Res. 1989; 1: 53-60.

14. Scheibe RJ, Ginty DD, Wagner JA. Retinoic acid stimulates the differentiation of PC12 cells that are deficient in cAMP-dependent protein kinase. J Cell Biol. 1991; 5: 1173-82.

15. Tepe B, Donmez E, Unlu M, Candan F, Daferera D, Vardar-Unlu G. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of Salvia cryptantha (montbret et aucher ex benth.) and Salvia multicaulis (vahl). Food Chemistry. 2004; 84: 519–25.

16. Kordali S, Kotan R, Mavi A, Cakir A, Ala A, Yildirim A. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of Artemisia dracunculus and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish Artemisia absinthium, A. dracunculus, Artemisia santonicum, and Artemisia spicigera essential oils. J Agri and Food Chemistry. 2005; 53: 9452–8.

17. Catalan CAN, De Lampasona MEP. The Chemistry of the Genus Lippia (Verbenaceae). Kintzios SE. Oregano: The genera Origanum and Lippia. 1st ed. London: Taylor and Francis. 2002; p. 127–49.

18. Carnat A, Carnat AP, Fraisse D, Ricoux L, Lamaison JL. The aromatic and polyphenolic composition of Roman camomile tea. Fitoterapia. 2004; 1: 32-8.

19. Gleiser RM, Zygadlo JA. Insecticidal properties of essential oils from Lippia turbinata and Lippia polystachya (Verbenaceae) against Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae). Parasitol Res. 2007; 5: 1349-54.

20. Kim NS, Lee DS. Headspace solid-phase microextraction for characterization of fragrances of lemon verbena (Aloysia triphylla) by gas chromatography-mass spectrometry. J Sep Sci. 2004; 1-2: 96-100.

21. Greene LA, Tischler AS. PC12 pheochromocytoma cells in neurobiological research. Adv. Cell Neurobiol. 1982; 3: 373−414.

22. Dorsey ER, George BP, Leff B, Willis AW. The coming crisis: obtaining care for the growing burden of neurodegenerative conditions. Neurology. 2013; 21: 1989-96.

23. Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. Life Sci. 2005; 78: 431−41.

24. Behl C. Vitamin E and other antioxidants in neuroprotection. Int J Vitam Nutr Res. 1999; 3: 213-9.