بررسی اثرات حفاظتی عصاره گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) بر استرس اکسایشی ایجاد شده توسط پپتید بتا آمیلوئید (۳۵ – ۲۵) در سلول‌های PC12

محمدرضا سپند[۱]، ملیحه سودی[۲]*، مسعود سلیمانی[۳]، هما حاجی‌مهدی‌پور[٤]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه سم‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۲- استادیار، گروه سم‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۳- استادیار، گروه خون‌شناسی و بانک خون، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
٤- استادیار، گروه داروسازی سنتی، دانشکده طب سنتی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
*آدرس مکاتبه: تهران، بلوار جلال‌آل‌احمد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه سم‌شناسی
تلفن و نمابر: ۸۲۸۸٤٥٤۹ (۰۲۱)
پست الکترونیک: soodi@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۸ **تاریخ تصویب:** ۹۰/۵/۱۸

چکیده

مقدمه: تجمع پپتید بتا آمیلوئید (Aβ) در مغز مشخصه اصلی بیماری آلزایمر (AD) است و باعث استرس اکسایشی و مرگ سلول عصبی می‌شود. گیاه بادرنجبویه به عنوان یک عامل مؤثر در پیشگیری از آسیب‌های اکسایشی شناخته شده است. این گیاه در طب سنتی به عنوان افزایش‌دهنده حافظه و در بیماری‌های ناشی از اختلالات عصبی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

هدف: این مطالعه تأثیر عصاره اتانولی گیاه بادرنجبویه بر سمیت سلولی ناشی از پپتید Aβ و مکانیسم پاد اکسایشی آن را بررسی می‌کند.

روش بررسی: سرشاخه هوایی گیاه بادرنجبویه با روش ماسراسیون و با استفاده از حلال اتانول ۸۰ درصد عصاره‌گیری شد. سلول‌های PC12 قبل از اضافه کردن Aβ به محیط کشت، با غلظت‌های مختلف عصاره انکوبه شدند. سمیت سلولی و بیومارکرهای استرس اکسایشی شامل تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، میزان پراکسیداسیون لیپید و فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز، ۲٤ ساعت بعد از اضافه کردن Aβ به محیط کشت اندازه‌گیری شدند.

نتایج: مواجهه شدن سلول‌های PC12 با Aβ به طور معنی‌داری باعث مرگ این سلول‌ها می‌شود که با افزایش (ROS)، پراکسیداسیون لیپید و کاهش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز همراه می‌باشد. مواجهه قبلی با گیاه بادرنجبویه به طور معنی‌داری باعث محافظت سلول‌های PC12 از سمیت Aβ شده و تغییرات بیومارکرهای استرس اکسایشی ناشی از Aβ را مهار می‌کند.

نتیجه‌گیری: عصاره گیاه بادرنجبویه باعث جلوگیری از سمیت عصبی القا شده به وسیله Aβ از طریق مهار مسیرهای استرس اکسایشی می‌شود و می‌تواند کاندیدی برای درمان بیماری آلزایمر باشد.

گل واژگان: آلزایمر، پپتید بتاآمیلوئید، استرس اکسایشی، بادرنجبویه

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-12]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2012.11.42.6.4]

مقدمه

بیماری آلزایمر (AD) شایع‌ترین اختلال عصبی پیشرونده مرتبط با سن است که به عنوان یک عامل ایجادکننده زوال عقلی در سالخوردگی مورد توجه قرار می‌گیرد. زوال عقل با کاهش شدید توانایی‌های هوشی و شناختی، اختلال در حافظه، تفکر انتزاعی و تغییر شخصیت همراه است [۱]. مشخصه آسیب‌شناسی این بیماری پلاک‌های پیری و کلاف‌های نروفیبریلار (Neurofibrillary tangles) می‌باشد. عنصر اصلی پلاک‌های پیری پپتیدبتاآمیلوئید تجمع یافته است و بررسی میکروسکوپیک بافت مغز این بیماران بعد از مرگ نشان می‌دهد که تجمع فزاینده پپتیدبتاآمیلوئید در مغز مشخصه و ویژگی اصلی بیماری آلزایمر می‌باشد. پپتیدبتاآمیلوئید از شکسته شدن پروتئین پیش‌ساز بتاآمیلوئید (APP) به وسیله آنزیم‌های بتاسکرتاز و گاماسکرتاز ایجاد می‌شود. متابولیسم غیرطبیعی پروتئین پیش‌ساز بتاآمیلوئید و تولید غیرطبیعی پپتیدبتاآمیلوئید، تجمع و رسوب آن باعث مرگ سلول‌های عصبی در مغز این بیماران می‌شود. همچنین مطالعات نشان داده است که اضافه کردن پپتیدبتاآمیلوئید تجمع یافته به کشت سلول‌های عصبی باعث مرگ آنها می‌شود. مکانیسم‌های آسیب عصبی القا شده به وسیله پپتید بتاآمیلوئید شامل تولید گونه‌های فعال اکسیژن و ایجاد استرس اکسایشی، افزایش کلسیم داخل سلولی، آسیب میتوکندری و تخلیه انرژی سلول، تغییرات اسکلت سلولی از طریق هیپرفسفریله شدن پروتئین تاو و القای پاسخ‌های التهابی می‌باشند. این مکانیسم‌ها منجر به تخریب سیناپس و در نهایت باعث از بین رفتن نرون‌ها از طریق فعال شدن مسیرهای مرگ سلولی آپاپتوتیک یا نکروتیک می‌شوند [۲].

استرس اکسایشی نقش پراهمیتی در ایجاد و پیشرفت پاتولوژی بیماری آلزایمر ایفا می‌کند. شواهد گسترده‌ای پیشنهاد می‌کند که آسیب **اکسایشی** به واسطه گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک در بیماری آلزایمر رخ می‌دهد. به عنوان بخشی از اثرات نوروتوکسیک، سمیت پپتیدبتاآمیلوئید حداقل در قسمت‌هایی به واسطه رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌شود [۳]. از اینرو تلاش‌های درمانی که به حذف رادیکال‌های آزاد یا جلوگیری از تولید آنها کمک می‌کند می‌تواند در بیماری آلزایمر مفید باشد. در نتیجه ترکیبات پاد اکساینده به عنوان یک راه کار درمانی در درمان سمیت عصبی القا شده به وسیله پپتیدبتاآمیلوئید و بهبود نتایج عصبی در بیماری آلزایمر معرفی شده است [٤،٥].

همچنین در بیماری آلزایمر نورون‌های کولینرژیک در ناحیه Basal forebrain به تدریج از بین می‌روند که منجر به اختلال حافظه در این بیماران می‌شود [٦]. به همین علت داروهای تأیید شده که هم‌اکنون برای کنترل این بیماری استفاده می‌شوند، داروهای مهارکننده آنزیم کولین استراز هستند [۷]. این داروها باعث بهبودی علایم بیماری می‌شوند ولی از پیشرفت بیماری جلوگیری نمی‌کنند. بنابراین ترکیباتی که بتوانند از چند مسیر مانع سمیت بتاآمیلوئید شوند تأثیر بهتری در کنترل این بیماری می‌توانند داشته باشند [۸].

گیاه *Melissa officinalis* با نام فارسی بادرنجبویه از تیره نعناعیان (Lamiaceae) است، که به استفاده گسترده از آن در کتب Historia plantarum (تقریباً ۳۰۰ سال قبل از میلاد) و Materia Medica (تقریباً ۵۰ تا ۸۰ سال قبل از میلاد) استناد شده است [۹]. گیاه بادرنجبویه دارای اثر تنظیمی بر روی رفتار بوده و به عنوان آرام‌بخش خفیف، کاهش‌دهنده اختلالات خواب و تضعیف کننده علایم اختلالات عصبی که شامل استرس، هیجان و قابلیت تحریک‌پذیری می‌باشد، استفاده می‌شود [۱۰]. این گیاه همچنین اثر حفاظتی بر روی سیستم عصبی دارد و به طور سنتی برای افزایش حافظه استفاده می‌شود. همچنین عصاره تام و فراکسیون‌های مختلف گیاه دارای اثر مهارکنندگی آنزیم کولین استراز می‌باشند [۱۱]. عصاره آبی گیاه بادرنجبویه فعالیت‌های پاد اکسایشی خوبی نشان می‌دهد و به عنوان یک عامل احیاکننده پرقدرت شناخته شده است. عصاره این گیاه دارای اثر حفاظتی در برابر استرس اکسایشی ایجاد شده توسط عوامل اکسیدان، که از طریق فرآیندهای مختلف باعث ایجاد پراکسیداسیون لیپید می‌شوند،

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2012.11.42.6.4]

می‌باشد [۱۲]. مصرف عصاره این گیاه در بیماران مبتلا به آلزایمر باعث بهبودی علایم شده است [۱۳]. با توجه به اینکه اثرات نروپروتکتیو برای این گیاه ذکر شده است، مکانیسم اثر آن ناشناخته است و هدف این مطالعه بررسی اثرات نروپروتکتیو عصاره اتانولی این گیاه در برابر سمیت بتاآمیلوئید و تأثیر آن بر مارکرهای استرس اکسایشی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد

رده سلولی PC 12 از انیستیتو پاستور ایران خریداری شد. پپتید بتاآمیلوئید [۳۵–۲۵]، ´۲ ،´۷ دی‌کلروفلوروسین دی‌استات (DCFH2-DA)، 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)، تیوباربیتوریک اسید، 1,1,3,3-tetraethoxypropane، پلی -D- لیزین (PDL) و کیت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز از شرکت سیگما خریداری شد. محیط کشت RPMI، پنی‌سیلین- استرپتومایسین و سرم جنین گاوی (FBS) از شرکت (Gibco) تهیه شد.

روش عصاره‌گیری از گیاه

عصاره برگ‌های خشک شده گیاه *Melissa officinalis* با روش ماسراسیون با استفاده از حلال اتانول: آب ۸۰:۲۰ و نسبت گیاه به حلال ۱:۱۰ به مدت چهار روز تهیه شد. بعد از گذشت هر ۲٤ ساعت مخلوط حلال و عصاره صاف شده و حلال جدید به تفاله گیاه اضافه می‌شد. عصاره به دست آمده با دستگاه تقطیر در خلا در دمای کمتر از ٤۰ تا حد خشک شدن تغلیظ شد [۱٤].

کشت سلول

سلول‌های PC12 در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد بین‌المللی و استرپتومایسین ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در فلاسک استریل کشت سلول کوت شده باپلی -D- لیزین (PDL) و در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند [۱۵].

بررسی اثر عصاره تام بر روی سلول‌های PC12

سلول‌ها با غلظت 10^4 cell/well در پلیت‌های ۹٦ خانه کوت شده با PDL کشت داده شدند و ۲٤ ساعت بعد محیط کشت سلول‌ها با محیط حاوی عصاره تام در رنج غلظتی ۱۰۰ – ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌گرم تعویض شد و به مدت ۲٤ ساعت دیگر با محیط حاوی عصاره تام انکوبه شدند. غلظت‌های موردنظر، از استوک ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌گرم عصاره حل شده در بافر PBS تهیه شد. میزان بقای سلول‌ها بعد از سپری شدن زمان انکوباسیون به وسیله سنجش فورمازان تولید شده از احیای MTT مورد ارزیابی قرار گرفت [۱٦].

بررسی اثر حفاظتی عصاره تام بر سمیت القا شده توسط بتاآمیلوئید

سلول‌ها با غلظت 10^4 cell/well در پلیت‌های ۹٦ خانه کوت شده با PDL کشت داده شدند. بعد از ۲٤ ساعت پپتیدبتاآمیلوئید با غلظت نهایی ۲۰ میکرومول به محیط کشت اضافه شد. محلول استوک پپتیدبتاآمیلوئید با غلظت ۱ میکرومول در آب مقطر 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 پپتیدبتاآمیلوئید با عصاره تام در رنج غلظتی ۱۰۰ – ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر انکوبه شدند. میزان بقای سلولی ۲٤ ساعت بعد از اضافه کردن پپتیدبتاآمیلوئید مورد ارزیابی قرار گرفت [۱۷].

سنجش MTT

بعد از اتمام زمان انکوباسیون محیط کشت سلول‌ها با محیط تازه تهیه شده تعویض شد و به هر خانه پلیت ۱۰ میکرولیتر از محلول استوک MTT (۵ میلی‌گرم بر

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2012.11.42.6.4]

میلی‌لیتر) اضافه شد و به مدت ٤ ساعت در انکوباتور انکوبه شد. بلورهای فورمازان تولید شده با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) به هر چاهک حل شد. جذب نوری توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ٥٤٠ نانومتر در برابر طول موج رفرانس ٦٣٠ نانومتر خوانده شد [١٦].

اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدئید

برای بررسی میزان پراکسیداسیون لیپید جهت ارزیابی استرس اکسایشی از اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدئید (MDA) تولید شده در فرایند لیپیدپراکسیداسیون استفاده می‌شود. در این آزمایش سوسپانسیون سلولی حاوی 1×10^{6} سلول به هر چاهک از پلیت ٦ خانه‌ای کوت شده به وسیله PDL انتقال داده شد. بعد از ٢٤ ساعت انکوباسیون در شرایط کشت ذکر شده پپتیدبتاآمیلوئید اضافه شد. عصاره گیاهی با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر یک ساعت قبل از اضافه کردن پپتید بتاآمیلوئید به محیط اضافه شد.

بعد از ٢٤ ساعت سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند. برای جدا کردن سلول‌ها از پلیت از محلول EDTA ۱۰ میکرومولار استفاده شد. سپس سلول‌ها به مدت ۲۰ ثانیه در ٤٠ ولت سونیکه شدند. ۱۰ میکرولیتر از هموژنیت سلولی برای تعیین مقدار پروتئین به روش برادفورد برداشته شد [١٨]. به ۱۰۰ میکرولیتر از هموژنیت سلولی ۲۰۰ میکرولیتر واکنشگر تیوباربیتوریک اسید (حاوی ۹۲۵ ۰/۰ درصد تیوباربیتوریک اسید و ۳/۷۵ درصد تری‌کلرواستیک اسید) اضافه شد و به مدت ٦٠ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌متر حرارت داده شد تا پیوند بین MDA-TBA ایجاد شود. سپس نمونه‌ها روی یخ قرار داده شدند تا واکنش خاتمه یابد. بعد از سانتریفوژ نمودن نمونه‌ها در 1000 g شدت جذب محلول رویی در طول موج ٥٤٠ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر اندازه‌گیری شد.

برای رسم منحنی استاندارد از ماده 1,1,3,3-tetraethoxypropane به عنوان ماده استاندارد استفاده شد. رقت‌های مختلف از استاندارد موردنظر تهیه شد و در شرایط مشابه با نمونه‌ها با واکنشگر تیوباربیتوریک اسید واکنش داده شد و منحنی استاندارد رسم شد. میزان مالون دی‌آلدئید تولید شده برحسب نانومول در میلی‌گرم پروتئین گزارش شده است [١٩].

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز

گلوتاتیون پراکسیداز یکی از اعضای خانواده آنزیم‌های با فعالیت پراکسیدازی می‌باشد که نقش پراهمیتی در حفاظت موجود زنده از آسیب‌های اکسایشی ایفا می‌کند فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز به وسیله کیت اندازه‌گیری شد. این کیت بر اساس اندازه‌گیری میزان NADPH مصرف شده توسط آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (GR) می‌باشد. آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز باعث اکسید شدن گلوتاتیون احیا (GSH) به گلوتاتیون اکسید (GSSG) می‌شود. گلوتاتیون اکسید تولید شده با مصرف NADPH به وسیله آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز به حالت احیا تبدیل می‌شود. در این واکنش میزان مصرف NADPH با فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز متناسب است و میزان NADPH را می‌توان از طریق جذب در طول موج ۳٤٠ نانومتر اندازه‌گیری نمود.

سلول‌ها با غلظت 1×10^{6} سلول به هر چاهک از پلیت ٦ خانه‌ای کوت شده به وسیله PDL انتقال داده شدند و مشابه روش توضیح داده شده برای اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدئید با بتاآمیلوئید و عصاره انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون سلول‌ها با تریپسین از پلیت جدا شده و در ۳۰۰ میکرولیتر بافر PBS حاوی ۱ درصد تریتون X منتقل شدند و هموژنیت سلولی بعد از یک دوره فریز کردن و ذوب نمودن سلول‌ها در دور 3000 g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و از محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده شد [٢٠].

اندازه‌گیری مولکول‌های واکنش دهنده مشتق از اکسیژن

تجمع درون سلولی مولکول‌های واکنش دهنده مشتق از اکسیژن با استفاده از روش ٢′، ٧′ دی‌کلروفلوروسین دی‌استات (DCFH2-DA) اندازه‌گیری شد. دی کلرو فلوروسین دی‌استات یک ترکیب غیرفلورسنت می‌باشد که به

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-12]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2012.11.42.6.4]

راحتی می‌تواند از غشای سلولی عبور کند. این ترکیب به وسیله استرازهای سلولی به ترکیب دی‌کلروفلوروسین (DCFH) هیدرولیز شده و سپس می‌تواند در حضور گونه‌های فعال اکسیژن به ترکیب دی‌کلروفلوروسئین (DCF) که خاصیت فلورسنت بالایی دارد تبدیل شود. ترکیب دی‌کلروفلوروسئین توانایی خروج از سلول را نداشته و می‌توان این ماده فلورسنت را با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری در طول موج تحریکی ۴۸۵ نانومتر و طول موج نشری ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری نمود [۲۱]. بعد از سپری شدن زمان انکوباسیون سلول‌ها با بتاآمیلوئید و عصاره سلول‌ها توسط تریپسین از پلیت جدا شده به بافر PBS حاوی گلوکز 5.6 mM و ۲′، ۷′ دی‌کلروفلوروسین دی‌استات با غلظت نهایی ۱۰ µM منتقل شدند و به مدت ۴۵ دقیقه در این شرایط انکوبه شدند. سپس نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند و رسوب سلولی در ۱ میلی‌لیتر بافر PBS معلق شدند. شدت فلورسنت با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (BD، ساخت کشور آمریکا) اندازه‌گیری شد.

بررسی‌های آماری

تمامی آزمایش‌ها به صورت سه بار تکرار انجام شده است و نتایج به صورت درصد کنترل بیان شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار آماری GraphPad Prism 4 صورت گرفت. برای مقایسه میانگین‌های گروه‌های مورد مطالعه از تست آماری one - way ANOVA و post test:Newman-Keuls استفاده شد.

نتایج

اثر عصاره تام بر روی سلول‌های PC12

نتایج بررسی میزان بقای سلول‌ها بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون با عصاره تام در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. بررسی آماری نشان می‌دهد که هیچ یک از غلظت‌های به کار رفته به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) اثر سمی بر روی سلول‌ها ندارند.

بررسی اثرات حفاظتی عصاره تام گیاه بادرنجبویه بر سمیت سلولی ناشی از پپتیدبتاآمیلوئید [۳۵-۲۵] در سلول‌های PC12

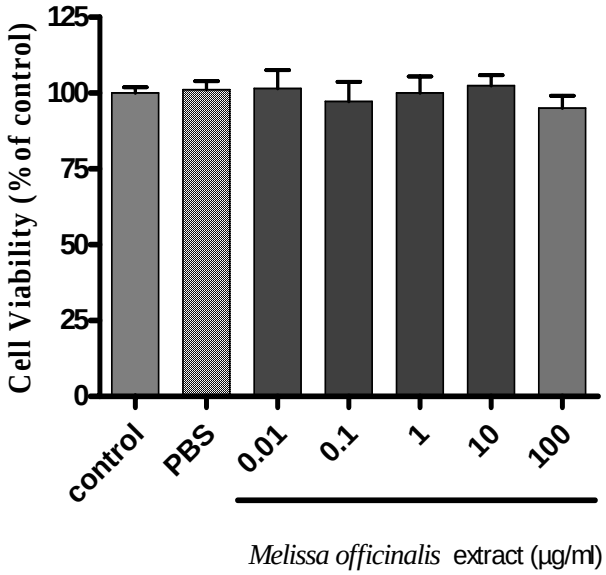
نتایج حاصل از این آزمایش نشان می‌دهند که ۲۴ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با پپتیدبتاآمیلوئید باعث سمیت چشمگیری در این سلول‌ها می‌شود (نمودار شماره ۲) و این کاهش در میزان بقای سلولی در این گروه نسبت به گروه کنترل از نظر آماری معنی‌دار ($p<۰/۰۰۱$) است. اضافه کردن عصاره گیاهی قبل از پپتید بتاآمیلوئید به صورت وابسته به دوز باعث کاهش سمیت این پپتید می‌شود که از نظر آماری معنی‌دار است. به طوری که عصاره تام گیاهی با غلظت‌های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل هم اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌دهند و این غلظت‌های عصاره کاملاً سلول‌ها را در برابر سمیت پپتیدبتاآمیلوئید محافظت می‌نماید. EC_{50} محاسبه شده با استفاده از نرم‌افزار Graph Pad Prism4 برای این اثر حفاظتی عصاره معادل ۰/۳۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

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

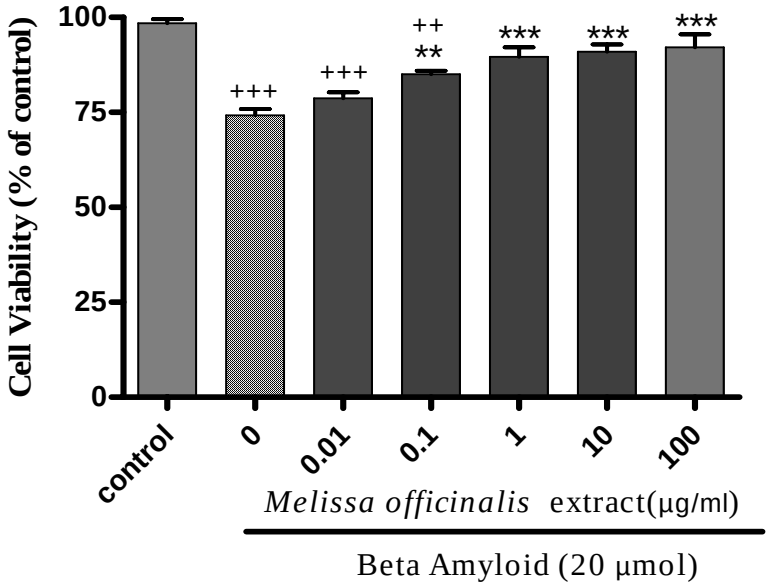
میزان مالون دی‌آلدئید موجود در نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد مالون دی‌آلدئید تعیین مقدار شد و نتایج بر حسب میزان پروتئین موجود در نمونه‌ها بیان شد (نمودار شماره ۳). با توجه به نتایج به دست آمده و آنالیز آماری مشخص شد که میزان مالون‌دی‌آلدئید در گروهی که در معرض بتاآمیلوئید بودند نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) دارد که این نکته بیانگر این است که مقدار مالون‌دی‌آلدئید در این گروه نسبت به گروه کنترل افزایش چشمگیری داشته است. به علاوه گروهی که فقط در معرض عصاره تام بودند از نظر میزان مالون‌دی‌آلدئید با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری ندارد به این معنی که خود عصاره باعث پراکسیداسیون لیپید نمی‌شود و هنگامی که این عصاره به همراه بتاآمیلوئید به کار می‌رود این توانایی را دارد که از پراکسیداسیون لیپید تولید شده به وسیله بتاآمیلوئید جلوگیری نماید.

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2012.11.42.6.4]

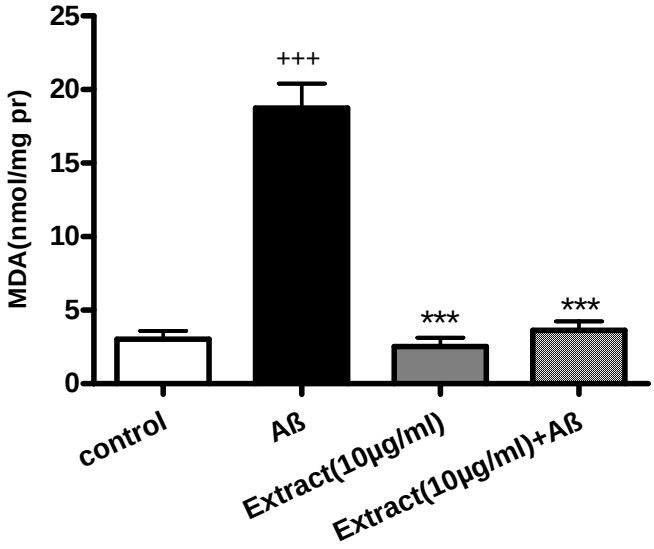


نمودار شماره ۱- میزان سمیت عصاره تام گیاه بادرنجبویه در سلول‌های PC12



نمودار شماره ۲- اثر عصاره تام گیاه بادرنجبویه بر سمیت پپتید بتا آمیلوئید در سلول‌های PC12 $p<۰/۰۰۱$*، $p<۰/۰۱$** اختلاف در برابر گروه بتاآمیلوئید، $p<۰/۰۰۱$$^{+++}$، $p<۰/۰۱$$^{++}$ اختلاف در برابر گروه کنترل را نشان می‌دهد.**

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-12]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2012.11.42.6.4]



نمودار شماره ۳- اثر عصاره تام گیاه بادرنجبویه بر پراکسیداسیون لیپید ناشی از پپتید بتا آمیلوئید ۰/۰۰۱> p******* اختلاف در برابر گروه بتاآمیلوئید، ۰/۰۰۱> p +++ اختلاف در برابر گروه کنترل را نشان می‌دهد.

بررسی فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در گروه‌های مورد مطالعه

براساس نتایج به دست آمده پپتیدبتاآمیلوئید باعث کاهش چشمگیری در فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در سلول‌های PC12 نسبت به گروه کنترل می‌شود. در حالی که در سلول‌های در معرض عصاره تنها و سلول‌های انکوبه شده با بتاآمیلوئید به همراه عصاره میزان فعالیت این آنزیم با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری ندارد. بنابراین عصاره تام گیاه بادرنجبویه به تنهایی تأثیری در فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز ندارد در حالی‌که می‌تواند از کاهش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز القا شده به وسیله بتاآمیلوئید جلوگیری نمایند (نمودار شماره ٤).

نتایج آزمایش اندازه‌گیری گونه‌های فعال اکسیژن

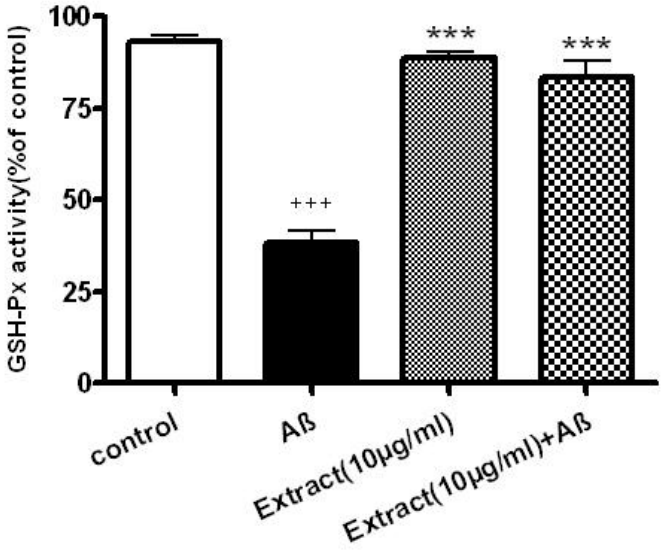
نمودار شماره ۵ میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن را در گروه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد. همان طور که از نمودار مشخص است پپتید بتا آمیلوئید باعث افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که مواجهه قبلی با عصاره تام قبل از اضافه کردن پپتیدبتاآمیلوئید می‌تواند از افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن القا شده به وسیله این پپتید جلوگیری نماید.

بحث و نتیجه‌گیری

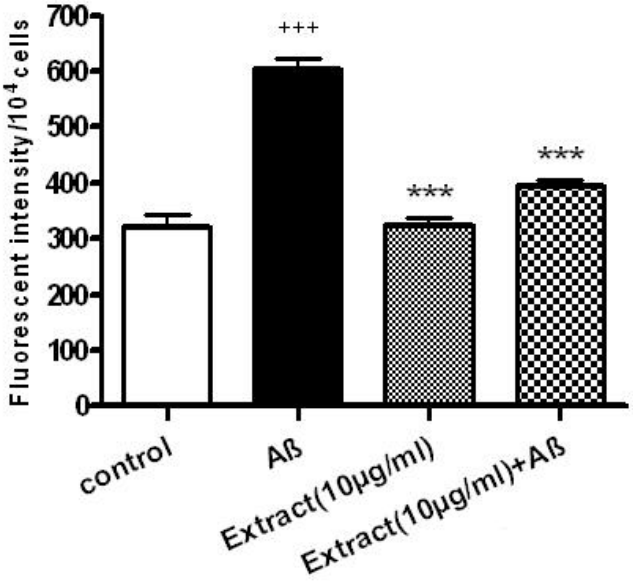
در مطالعه حاضر اثر حفاظتی عصاره تام گیاه بادرنجبویه در برابر سمیت سلولی القا شده به وسیله پپتیدبتاآمیلوئید مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد عصاره تام این گیاه با غلظت‌های بالاتر از ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر حفاظتی کاملی ایجاد می‌نماید. پپتید بتا آمیلوئید [٤١ - ١] هسته اصلی پلاک‌های پیری در مغز بیماران آلزایمری می‌باشد و نشان داده شده است که این پپتید در حیوانات آزمایشگاهی و در کشت سلول‌های عصبی سمی است [۲۲]. همچنین پپتید بتا آمیلوئید ۳۵ - ۲۵ (بتاآمیلوئیدی که محتوی محدوده هیدروفیلیک و هیدروفوبیک می‌باشد) که یک قطعه کوچکتر از پپتید بتاآمیلوئید [٤١-١] می‌باشد اثرات سمی مشابه دارد و در مطالعات زیادی از پپتیدبتاآمیلوئید ۳۵-۲۵ برای القاء سمیت استفاده شده است [۲۱،۲۳].

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2012.11.42.6.4]



نمودار شماره ٤- میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در گروه‌های مورد مطالعه. ۰/۰۰۱>p* اختلاف در برابر گروه بتاآمیلوئید، ۰/۰۰۱>p +++ اختلاف در برابر گروه کنترل را نشان می‌دهد.**



نمودار شماره ٥- مقدار گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) اندازه‌گیری شده در گروه‌های مورد مطالعه. ۰/۰۰۱>p*، اختلاف در برابر گروه بتاآمیلوئید، ۰/۰۰۱>p +++ اختلاف در برابر گروه کنترل را نشان می‌دهد.**

یکی از مکانیسم‌های سمیت سلولی پپتید بتا آمیلوئید (۳۵-۲۵) از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو می‌باشد که این مساله در این آزمایش به خوبی نشان داده شده است و با مطالعات قبلی که دراین زمینه انجام شده است مطابقت دارد [۲٤، ۲۲]. پپتید بتا آمیلوئید (۳۵-۲۵) باعث افزایش گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های PC12 می‌شود و فعالیت آنزیم

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2012.11.42.6.4]

گلوتاتیون پراکسیداز 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 می‌شود. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که می‌توان از چندین تغییر آسیب‌زای القا شده به وسیله پپتیدبتاآمیلوئید (۳۵-۲۵) از طریق مواجهه با عصاره تام گیاه بادرنجبویه جلوگیری نمود.

اگر چنانچه قبل از اضافه کردن پپتیدبتاآمیلوئید (۳۵-۲۵)، سلول‌های PC12، ۱ ساعت با عصاره تام گیاه مواجهه شده باشند، میزان بقای سلولی آنها در مقایسه با گروه مواجهه شده با پپتیدبتاآمیلوئید (۳۵-۲۵) افزایش خواهد یافت. همچنین تولید افزایش یافته گونه‌های فعال اکسیژن ایجاد شده به وسیله پپتیدبتاآمیلوئید در پاسخ به مواجهه با عصاره تام گیاهی کاهش می‌یابد. همچنین کاهش فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز ایجاد شده به وسیله پپتیدبتاآمیلوئید با مواجهه سلول‌ها با عصاره تام گیاهی قابل جبران است. در نتیجه عصاره گیاه بادرنجبویه می‌تواند از طریق جبران توان دفاع پاداکسایشی سلول و پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن ایجاد شده از آسیب‌های اکسایشی سلول را حفظ نماید که این مسأله با کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدها در گروهی که با پپتیدبتاآمیلوئید و عصاره مواجه بودند، نمایان است. این یافته بیانگر این می‌باشد که توانایی حفاظت سلولی مشاهده شده را می‌توان به خصوصیت پاداکسایشی این گیاه نسبت داد [۱۲]. این نتایج نشان می‌دهد که عصاره تام گیاه می‌تواند به طور مؤثر از استرس اکسایشی ایجاد شده به وسیله پپتیدبتاآمیلوئید (۳۵-۲۵) جلوگیری کرده و نقش مهمی در مسیرهای دفاع سلولی بر علیه استرس اکسایشی در طول فرآیندهای نرودژنریتیو در بیماری آلزایمر داشته باشد.

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که عصاره گیاه بادرنجبویه خاصیت پاد اکسایشی قوی دارد و قابلیت پاکسازی رادیکال‌های آزاد آنیون سوپراکسید و نیتریک اکسایدرا دارا می‌باشد. خاصیت پاد اکسایشی این گیاه به ترکیبات فنلی آن نسبت داده می‌شود. ترکیبات فنلی موجود در این گیاه از مشتقات هیدروکسی سینامیک اسید و فلاونوئیدها می‌باشند. بیشترین ترکیب شناخته شده در این گیاه روزمارنیک اسید و بعد از آن کوماریک اسید و کافئیک اسید می‌باشند. ترکیبات فلاونوئیدی گیاه شامل naringin، hespiridin، naringenin، hesperetin می‌باشند. برای همه این ترکیبات خاصیت پاد اکسایشی ذکر شده است [۲۵].

برای عصاره این گیاه علاوه بر اثر پاد اکسایشی خواص دیگری ذکر شده است که می‌توانند در اثرات نروپروتکتیو این گیاه نقش داشته باشند. عصاره به دست آمده از سرشاخه هوایی این گیاه دارای خصوصیات مهارکنندگی آنزیم استیل‌کولین استراز می‌باشد [۱۱]. همچنین عصاره این گیاه حاوی اجزایی می‌باشد که تمایل به اتصال به رسپتورهای نیکوتینی را دارند [۲۶،۲۷]. گیرنده‌های نیکوتینی استیل‌کولین با بسیاری از عملکردهای مغزی به خصوص فعالیت‌های ادراکی پیچیده از قبیل دقت، یادگیری، یکپارچگی حافظه، دریافت حواس، کنترل فعالیت‌های حرکتی، دریافت درد و تنظیم حرارت بدن در ارتباط می‌باشند [۲۸،۲۹]. نقش پاتولوژیک گیرنده‌های نیکوتینی استیل‌کولین در بیماری آلزایمر که با از بین رفتن تعداد زیادی از گیرنده‌ها همراه می‌باشد به خوبی به اثبات رسیده است [۳۰].

مواجهه با آگونیست‌های گیرنده نیکوتینی ممکن است نه تنها از طریق تکمیل انتقال کولینرژیک بلکه همچنین از طریق حفاظت در برابر سمیت القا شده توسط بتاآمیلوئید باعث بهبود ادراکی شود [۳۱]. مطالعات بالینی نشان می‌دهد که تجویز نیکوتین در بیماران مبتلا به آلزایمر باعث بهبود حافظه و درک می‌شود [۳۲]. در مطالعات *in vitro* دیده شده که نیکوتین اثر محافظتی بر سمیت ناشی از پپتیدآمیلوئید بتا دارد. پیش درمانی با نیکوتین باعث کاهش سمیت پپتیدآمیلوئیدبتا بر روی نرون‌های کورتیکال کشت داده شده رت می‌شود و انکوباسیون توأم سلول‌ها با نیکوتین و مکامیلامین - آنتاگونیست رسپتورهای نیکوتینی – اثرات حفاظتی نیکوتین بر سمیت ناشی از پپتید آمیلوئید بتا در نرون‌های کورتیکال کشت داده شده رت را از بین می‌برد و نشان می‌دهد که اثرات حفاظتی نیکوتین از طریق

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2012.11.42.6.4]

رسپتورهای نیکوتینی اعمال می‌شود [۳۳] پپتید آمیلوئید بتا در نرون‌های هیپوکامپ کشت داده شده رت باعث القا آپاپتوز از طریق افزایش میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن و فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ (caspase 3) می‌شود و این اثرات پپتیدآمیلوئیدبتا به وسیله پیش درمانی سلول‌ها با نیکوتین مهار می‌شود و انکوباسیون توام نیکوتین با مکامیلامین این اثرات نیکوتین را مهار می‌کند. این مطالعه نشان می‌دهد تحریک رسپتورهای نیکوتینی باعث مهار استرس اکسایشی و القا آپاپتوز توسط پپتیدآمیلوئید بتا در نرون‌های هیپوکامپ کشت داده شده رت می‌شود [۳٤]. با توجه به مطالعات ذکر شده می‌توان فرض کرد که عصاره گیاه بادرنجبویه با داشتن ترکیباتی که آگونیست گیرنده نیکوتینی هستند اثرات حفاظتی خود را اعمال می‌کند که البته این فرضیه نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

همان‌طور که ذکر شد مهم‌ترین ترکیبی که در عصاره گیاه وجود دارد رزمارینیک اسید می‌باشد. رزمارینیک اسید یک ترکیب فنلی ساده است که فعالیت پاد اکسایشی دارد. این ترکیب خاصیت پاکسازی رادیکال‌های اکسیژن و رادیکال بسیار فعال پروکسی نیتریت را دارد و در مطالعه صورت گرفته مشخص شده است که رزمارینیک اسید اثر محافظی در برابر سمیت سلولی ناشی از پپتیدبتاآمیلوئید ایجاد می‌کند. رزمارینیک اسید از شکل‌گیری گونه‌های فعال اکسیژن فرآیند پراکسیداسیون لیپید شکسته شدن DNA و فعال شدن کاسپاز ۳ که به وسیله پپتیدبتاآمیلوئید در سلول‌های PC12 ایجاد می‌شود جلوگیری می‌نماید همچنین مانع هیپرفسفوریلاسیون پروتئین تاو می‌شود [۳۵]. رزمارینیک اسید همچنین قادر است آنزیم کولین استراز را مهار کند [۱۱] و از این طریق هم می‌تواند اثرات حفاظتی خود را اعمال کند و اثرات حفاظتی مهارکننده‌های آنزیم کولین‌استراز در سمیت ناشی از پپتیدبتاآمیلوئید شناخته شده است [۷]. از جمله ترکیبات فنلی دیگر که در گیاه یافت می‌گردد ترکیب کافئیک اسید می‌باشد این ترکیب دارای اثرات پاد اکسایشی بوده و قادر است که از اثرات سمی بتاآمیلوئید جلوگیری نماید. به علاوه در تحقیقات صورت گرفته مشخص شده است مهار ورود کلسیم یکی از مکانیسم‌های اصلی است که کافئیک اسید در حفاظت از سلول‌های عصبی در برابر سمیت القا شده توسط پپتیدبتاآمیلوئید اعمال می‌کند. همچنین به خوبی مشخص شده است که این ترکیب قادر است که از فسفوریلاسیون تائو جلوگیری نماید [۳٦].

علاوه بر ترکیبات ذکر شده فوق که اثرات نروپروتکتیوی آنها مطالعه شده است عصاره گیاه بادرنجبویه حاوی ترکیبات متعددی می‌باشد که اثرات نروپروتکتیوی آنها مطالعه نشده است و هر کدام می‌توانند در اثر حفاظتی دیده شده از عصاره این گیاه در این مطالعه نقش داشته باشند. گرچه اثرات سینرژیکی احتمالی این ترکیبات هم دور از انتظار نمی‌باشد و نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه می‌باشد.

منابع

1. Blennow K, de Leon MJ and Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet* 2006; 368: 387 – 403.

2. Hardy J and Dennis J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* 2002; 297 (5580): 353 - 6.

3. Butterfield AD, Drake J, Pocernich C and Castegna A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid β-peptide. *TRENDS in Molecular Medicine* 2001; 7: (12): 548 - 54.

4. Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am. J. Clin. Nutr*. 2000; 71: 621 – 9.

5. Aliev G, Obrenovich ME, Reddy VP, Shenk JC, Moreira PI, Nunomura A, Zhu X, Smith MA, Perry G. Antioxidant therapy in Alzheimer's disease: theory and practice. *Mini Rev Med Chem*. 2008; 8 (13): 1395 - 406.

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-12]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2012.11.42.6.4]

6. Schliebs R. Basal forebrain cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease-interrelationship with beta-amyloid, inflammation and neurotrophin signaling. *Neurochem. Res*. 2005; 30: 895 - 908.

7. Lane RM, Kivipelto M and Greig NH. Acetylcholinesterase and its inhibition in Alzheimer disease. *Clin. Neuropharmacol*. 2004; 27: 141 - 9.

8. Carreiras MC and Marco JL. Recent approaches to novel anti-Alzheimer therapy. *Curr Pharm Des*. 2004; 10: 3167 - 75.

9. Mrlianova MD. Tekelova M, Felklova J, Toth P Musil and Grancai D. Comparison of the quality of *Melissa officinalis* L. cultivar Citra with Mellissas of European origin. *Pharmacospsychiatry* 2001; 34: 20 - 21.

10. Blumenthal M, Lemon Balm Monograph. The Complete German Commission E Monographs:Therapeutic Guide to Herbal Medicines. 1st ed. American BotanicalCouncil, 1998, pp: 160 – 1.

11. Dastmalchi K, Ollilainen V, Lackman P, af Gennäs BG, Dorman HJ, Järvinen PP, Yli-Kauhaluoma J, Hiltunen R. Acetylcholinesterase inhibitory guided fractionation of Melissa officinalis L. *Bio. & Med. Chem*. 2009; 17: 867 – 71.

12. Pereira RP, Fachinetto R, de Souza Prestes A, Puntel RL, Santos da Silva GN, Heinzmann BM, Boschetti TK, Athayde ML, Bürger ME, Morel AF, Morsch VM, Rocha JB. Antoxidant Effects of Different Extracts from *Melissa officinalis*, Matricaria recutita and Cymbopogon citrates. *Neurochem. Res*. 2008; 34: 973 - 83.

13. Akhondzadeh S, Noroozian M, Mohammadi M, Ohadinia S, Jamshidi AH and Khani M. Melissa officinalis extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebocontrolled trial. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr*. 2003; 74: 863 – 6.

14. Committee of Iranian Herbal Pharmacopoeia. Iranian Herbal Pharmacopoeia. Ministry of Health and Medical Education. Tehran, 2002, p: 24.

15. Dan Qiao, Frederic J. Seidler, Theodore A. Slotkin, Oxidative mechanisms contributing to the developmental neurotoxicity of nicotine and chlorpyrifos. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005; 206: 17 – 26.

16. Da Hua Shi, Jun HuaWu, Hui Ming Ge, Ren-Xiang Tan, Protective effect of hopeahainol A, a novel acetylcholinesterase inhibitor, on hydrogen peroxide -induced injury in PC12 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2009; 28: 30 – 6.

17. Qiu xiao X, Wang R, Fan Han Y, Tang XT. Protective effect of huperzine A on beta –amyloid 25-35 induced oxidative injury in rat phechromocytoma cells. *Neurosciense letters*, 2005; 286: 155 - 8.

18. 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.

19. Lucio G. Costa, Ernest Hodgson, David A.Lawrenc; Terence R. Ozolins, Reed DJ and Greenlee WF. Assessment of Cell Toxicity, Measurement of Lipid Peroxidation, Current Protocols in Toxicol. John Wiley & Sons Inc. 1999, Chapter 2, Section 4, pp: 3 – 5.

20. Glutathione Peroxidase Assay Kit, BioVision Research Products.

21. Yu-song GE, Wei-ya T and Chao-dong Z. Protective effect of cyclophilin A against Alzheimer's amyloid beta-peptide (25-35)-induced oxidative stress in PC12 cells. *Chin. Med. J*. 2009; 122: 716 – 24.

22. Butterfield DA. Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2012.11.42.6.4]

disease brain. A Review. *Free Radic Res.* 2002; 36: 1307 - 13.

23. Qiu xiao X, Wang R, Fan Han Y, Tang XT. Protective effect of huperzine A on beta – amyloid25-35 induced oxidative injury in rat phechromocytoma cells. *Neurosciense letters* 2005; 286: 155 - 58.

24. Butterfield DA. Beta-Amyloid-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Chem. Res. Toxicol*. 1997; 10: 495 – 506.

25. Dastmalchia K, Damien Dormana HJ, Pa¨ ivi P. Oinonena, Darwisd Y, Into Laaksoa, Hiltunena R. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract, LWT, 2008; 41: 391 – 400.

26. Wake G, Court J, Pickering A, Lewis R, Wilkins R, Perry E. CNS acetylcholine receptor activity in European medicinal plants traditionally used to improve failing memory. *J. Ethnopharmacol*. 2000; 69: 105 – 14.

27. Perry N, Court G, Bidet N, Court J, Perry E. European Herbs with cholinergic activities: potential in dementia therapy. *Int. J. Geri Psy* 1996; 11: 1063 – 9.

28. Clementi F, Fornasari D, Gotti C. Neuronal nicotinic receptors, important new players in brain function. *Eur. J. Pharmacol*. 2000; 393: 3 – 10.

29. Paterson D, Nordberg A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog. Neurobiol.* 2000; 61: 75 – 111.

30. Newhouse PA, Potter A, Kelton M, Corwin J. Nicotinic treatment of Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* 2001; 49: 268 – 78.

31. Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Kimura J, Kume T, Kochiyama H, Maeda T, Akaike A. Nicotinic receptor stimulation protects neurons against beta-amyloid toxicity. *Ann. Neurol.* 1997; 42: 159 – 63.

32. Jones GM, Sahakian BJ, Levy R, Warburton DM, Gray JA. Effects of acute subcutaneous nicotine on attention, information processing and short-term memory in Alzheimer's disease. *Psychopharmacol*. 1992; 108: 485 – 9.

33. Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Kimura J, Kume T and Kochiyama H. Nicotinic receptor stimulation protects neurons against beta-amyloid toxicity. *Ann. Neurol.* 1997; 42: 159 – 63.

34. Qiang L, Baolu Z. Nicotine attenuates b-amyloid peptide-induced neurotoxicity, free radical and calcium accumulation in hippocampal neuronal cultures. *British J. Pharmacol*. 2004; 141: 746 – 54.

35. Iuvone T, De Filippis D, Esposito G and Izzo A. The Spice Sage and its active ingredient rosmarinic acid protect PC12 cells from amyloid-β peptide-induced neurotoxicity. *J. Phar and Experther*. 2006; 319: 1143 - 9.

36. Donggeun S, Hyo-Shin K, Dongho L, Seong Soo J, Kwang Woo H, So-Young P. Protective effect of caffeic acid against beta-amyloid-induced neurotoxicity by the inhibition of calcium influx and tau phosphorylation. *Life Sciences* 2009; 84 (8 - 9): 257 - 62.

[Downloaded from jmp.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2012.11.42.6.4]