

بررسی تأثیر عصاره *Scutellaria pinnatifida* در مهار سمیت سلولی تجمعات سمی آلفاسینوکلئین

مهديه ساشورپور^{۱،۲}، دينا مرشدي^{۳*}، صابر زهري^{۴*}، فرهنگ علي اکبري^۵، مرضيه فتوت^۶، طيبه رجبیان^۷

- ۱- دکتری، دانشگاه محقق اردبیلی، گروه زیست‌شناسی، اردبیل، ایران
 - ۲- دکتری، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده صنعت و محیط زیست، تهران، ایران
 - ۳- دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده صنعت و محیط زیست، تهران، ایران
 - ۴- استاد، دانشگاه محقق اردبیلی، گروه زیست‌شناسی، اردبیل، ایران
 - ۵- محقق، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده صنعت و محیط زیست، تهران، ایران
 - ۶- دانشجوی دکتری، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
 - ۷- دانشیار، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
- * آدرس مکاتبه: تهران، کیلومتر ۱۵ اتوبان تهران-کرج، شهرک علم و فناوری پژوهش، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری کدپستی: ۱۶۱-۱۴۹۶۵، اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، کدپستی: ۱۱۳۶۷-۵۶۱۹۹
تلفن و نمابر: ۴۴۷۸۷۴۲۳ (۰۲۱)، ۳۳۵۱۴۷۰۱ (۰۴۵)
پست الکترونیک: morshedi@nigeb.ac.ir، Zahri@uma.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۲۵

تاریخ تصویب: ۹۶/۱۱/۲

چکیده

مقدمه: بسیاری از بیماری‌های تخریب سیستم عصبی با تشکیل تجمعات پروتئینی موسوم به فیبریل‌های آمیلوئیدی همراه‌اند. تجمعات آمیلوئیدی آلفا سینوکلئین به عنوان عامل کلیدی در بروز و گسترش بیماری‌های تحلیل نوروئی در مغز شناخته شده است و یافتن ترکیباتی که بتوانند تجمعات و یا سمیت آنها را مهار کنند در کانون توجه مطالعات در زمینه بیماری‌های تخریب سیستم عصبی هستند. هدف: در این مطالعه اثرات عصاره‌های استخراجی از ریشه گونه *Scutellaria pinnatifida* (*S. pinnatifida*) بر روی مهار سمیت نوروئی گونه‌های تجمعی - سمی آلفا سینوکلئین بررسی شد.

روش بررسی: به این منظور فرایند فیبریلاسیون در آلفاسینوکلئین القا و با روش‌های استاندارد مانند سنجش فلورسنس ترکیب تیوفلاوین تی و مطالعه تصاویر میکروسکوب فلورسنس تأیید شد. میزان سمیت نوروئی تجمعات سمی فیبریلی آلفاسینوکلئین با تیمار رده سلولی PC12 و با روش‌های MTT و LDH سنجیده شد. نتایج نشان دهنده‌ی مرگ معنی‌دار در سلول‌های تیمار شده با آلفاسینوکلئین بود.

نتایج: برخلاف استخراج‌های متانولی، هگزانی و اتیل استات *S. pinnatifida* استخراج‌های دی‌کلرومتان و بوتانل نرمال مانع مرگ سلولی در حضور آلفا سینوکلئین شدند. همچنین مشخص شد که استخراج‌های دی‌کلرومتان و بوتانل نرمال حاوی میزان قابل توجهی فلاونوئید با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا می‌باشند.

نتیجه‌گیری: با توجه به مطالعه صورت گرفته می‌توان نتیجه گرفت که عصاره‌های استخراجی خاصی از *S. pinnatifida* تأثیرات مخرب تجمعات سمی پروتئین آلفا سینوکلئین را مهار می‌کنند و می‌توانند برای مهار انتقال و گسترش آسیب‌های وابسته به تجمعات آلفا سینوکلئین مورد توجه باشد که این امر نیازمند تحقیقات بیشتر بر روی ترکیبات موجود در این گیاه می‌باشد.

کل واژگان: *Scutellaria pinnatifida*، آلفا- سینوکلئین، بیماری پارکینسون، سمیت سلولی، فلاونوئید



مقدمه

تعداد قابل توجهی از بیماری‌های انسان از جمله بیماری‌های تخریب سیستم عصبی با تشکیل تجمعات پروتئینی پایدار معروف به فیبریل‌های آمیلوئیدی همراه است و بدین سبب به آنها بیماری‌های آمیلوئیدی نیز گفته می‌شود. از جمله این بیماری‌ها، بیماری‌های تحلیل نوروئی موسوم به سینوکلئینوپاتی است که با تشکیل تجمعات آمیلوئیدی پروتئین آلفاسینوکلئین در نورون‌ها، فیبرهای نوروئی و یا سلول‌های گلیال همراه است که به اجسام لوئی شناخته می‌شوند. سه نوع اصلی این بیماری‌ها شامل: بیماری پارکینسون، زوال عقل همراه با اجسام لوئی (LBDS) و آتروفی سیستم‌های مختلف (MSA) می‌باشند. بیماری پارکینسون یک اختلال عصبی مزمن با اثرات شدید پزشکی و اجتماعی می‌باشد که حدود ۳ درصد از افراد سنین ۶۵ تا ۷۴ را تحت تأثیر قرار می‌دهد و در صورتی که تحت درمان قرار نگیرد پیشروی کرده و تبدیل به یک بیماری حاد می‌شود [۱]. بیماری پارکینسون عمدتاً در اثر تخریب نورون‌های دوپامین‌ساز در ناحیه‌ی جسم سیاه مغزی ایجاد شده [۲] و منجر به بروز علائم شدید مانند ترومور، کندی، سفتی عضلات و در برخی موارد حتی مرگ می‌شود [۳].

آلفاسینوکلئین یک پروتئین بسیارحفاظت شده است که در سیستم اعصاب مرکزی (CNS) به میزان فراوان وجود دارد [۴]. آلفاسینوکلئین به طور طبیعی به حالت تانخورده در سیتوپلاسم سلول وجود دارد که فاقد ساختارهای منظم دوم بوده و ساختار پپچشی تصادفی دارد [۵]. ساختار پروتئین در اتصال با ساختارهای غشایی لپیدی دچار تغییر می‌شود [۶]. تحت شرایط شناخته نشده‌ای، ساختار آلفاسینوکلئین به شکلی تغییر می‌کند که مستعد ورود به فرایند موسوم به فیبریلایسیون و ایجاد ساختارهای صفحات بتا می‌شود [۷]. برخی از گونه‌های تجمعی آلفاسینوکلئین که در طی فرایند فیبریلایسیون ایجاد می‌گردند به ویژه الیگومرها بیشتر سمی بوده و قادرند در عملکرد اندامک‌های مختلف درون سلولی از جمله میتوکندری، شبکه اندوپلاسمی و غشای پلاسمایی اختلال ایجاد کنند [۸،۹]. شواهد به دست آمده از نمونه‌های حیوانی و همچنین مطالعات ژنتیکی، بیوشیمیایی و بیوفیزیکی از این فرضیه

حمایت می‌کند که فرایند الیگومریزه شدن و رشد فیبریل آلفاسینوکلئین نقش اساسی در سمیت نوروئی و نهایتاً تخریب سلول دارند [۱۱، ۱۰].

تأثیرات سمیت سلولی تجمعات آمیلوئیدی در دو دسته اثرات مستقیم و غیرمستقیم قرار می‌گیرند. در دسته اول، تجمعات آمیلوئیدی به طور مستقیم بر روی پایداری غشاءهای سلولی و اندامک‌های درون آن تأثیر می‌گذارد که این اتفاق می‌تواند از طریق تشکیل منافذ در غشاء و افزایش نفوذپذیری غشاء در مجاورت با تجمعات به ویژه از نوع الیگو شده و منجر به اختلال در ساختار و عملکرد غشا شود [۱۳، ۱۲]. تأثیرات غیرمستقیم تجمعات آمیلوئیدی بر روی سلول از طریق تأثیر بر روی مسیرها و متابولیت‌های سلولی است که در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شود. از جمله مهم‌ترین آنها افزایش گونه‌های فعال اکسیژنی و نیتروژنی در سلول، اختلال در سیستم کاهشی سلول، کاهش عملکرد پروتئین‌ها در حضور تجمعات و افزایش فسفوریلاسیون پروتئین‌هایی است که بر روی ساختارهای آمیلوئیدی تجمع می‌یابند [۱۴]. افزایش گونه‌های فعال اکسیژنی موجب ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول می‌شود که طی آن صدمات شدیدی در سلول ایجاد شده و مجموعه این اتفاقات درون سلولی منجر به مرگ سلول خواهد شد. آلفاسینوکلئین می‌تواند درون CNS در میان سلول‌ها انتشار پیدا کند. بدین صورت که تجمعات مستعد هسته‌گذاری (seeding) آلفاسینوکلئین از سلول دهنده به فضای خارج سلولی آزاد شده و سلول گیرنده با برداشت این پروتئین‌ها به عنوان جایگاهی برای شکل‌گیری تجمعات جدید سمی عمل می‌کند (فرضیه‌ی شبه پرئونی) [۱۵]. مطالعات نشان داده است که سلول‌ها می‌توانند آلفاسینوکلئین را به فضای اطراف خود آزاد کنند. به عنوان مثال غلظت نانومولار از منومرها و الیگومرهای آلفاسینوکلئین در مایع مغزی- نخاعی و پلاسمای نمونه‌های بیماران پارکینسونی و افراد سالم مشاهده شده است با این تفاوت که در بیماران پارکینسونی غلظت بالایی از این فرم‌های آلفاسینوکلئین وجود دارد. این مورد وجود فرایند ترشح آلفاسینوکلئین از سلول‌ها را تأیید می‌کند [۱۷، ۱۶].



افزایش بوده و مهم‌ترین علل آن، پایین بودن اثرات جانبی داروهای گیاهی است. گونه‌های مختلف گیاه *Scutellaria* به دلیل دارا بودن مواد مؤثره دارویی و همچنین فلاونوئیدهای ویژه از دیرباز در مصارف درمانی مختلف مورد توجه قرار گرفته‌اند [۲۵]. یکی از گونه‌هایی که به طور گسترده در طب سنتی چین مورد استفاده دارویی قرار می‌گیرد گونه *Scutellaria baicalensis* است که به صورت بالینی در درمان آلرژی، هایپر لیپیدمیا، سختی رگ‌ها و بیماری‌های التهابی استفاده شده است [۳۰]. گونه *S. pinnatifida* یک نمونه‌ی بومی ایران است و تاکنون اطلاعات کمی از خواص دارویی این گیاه در دست می‌باشد. طبق مطالعات قبلی مشخص شده است که در میان ۶۰ نوع مختلف از گیاهان بومی ایران، *S. pinnatifida* دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی است [۳۱]. در مطالعه دیگری که بر روی بخش‌های هوایی گیاه *S. pinnatifida* انجام شد، مشاهده شد که عصاره متانولی نسبت به عصاره دی‌کلرومتانی دارای خاصیت ضدباکتریایی بالاتری است اما عصاره دی‌کلرومتان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری دارد [۳۲]. همچنین در یک مطالعه خاصیت القا مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده ریشه *S. pinnatifida* بر روی سلول‌های سرطانی مشاهده شد [۳۳].

با توجه به اینکه هنگام تشخیص بیماری‌های وابسته به تجمععات، مقدار زیادی از تجمععات سمی در محیط CNS گسترده شده که قادرند با سازوکار شبه پیریونی به سلول‌های سالم آسیب بزنند در این مطالعه تأثیر حضور عصاره‌های *S. pinnatifida* در محیط سلول‌ها در حفاظت سلول‌های PC12 در برابر سمیت ناشی از آلفا سینوکلئین را مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد مورد نیاز

حلال‌های متانول، هگزان، دی‌کلرومتان، اتیل استات، بوتانل نورمال، نمک‌ها از شرکت Merck (آلمان)، کلرید آلومینیوم، رادیکال دی‌فنیل او۱ پیکریل‌هیدرازیل (DPPH)، تیوفلاوین تی (ThT)، قرمز کنگو (Congo red)، ۳- (۴،۵) دی‌متیل

مطالعات نشان داده‌اند که برخی ترکیبات طبیعی گیاهی، شامل گروه‌های مختلفی از پلی‌فنول‌ها، قادر هستند تجمععات و سمیت سلولی پروتئین آلفاسینوکلئین را مهار کنند [۱۸، ۱۹]. در این راستا داروهایی با منشأ طبیعی مورد بررسی قرار گرفته‌اند که در درمان اختلالات مغزی از جمله از دست دادن حافظه و زوال عقل مؤثر واقع شدند. طی مطالعات صورت گرفته بر روی این گروه از ترکیبات، نتایج بسیار روشنی از تأثیر فلاونوئیدها در حفاظت نورون‌ها به دست آمده است. این ترکیبات که در خانواده پلی‌فنول‌ها قرار دارند مهارکننده‌های قوی فیبریلایون پروتئین آلفاسینوکلئین بوده و علاوه بر آن قادرند ساختارهای فیبریلی از پیش ایجاد شده را به فرم‌های منومری و یا الیگومری غیرسمی تبدیل کنند [۲۰، ۲۱]. از جمله فلاونوئیدهای مؤثر در این زمینه فلاونوئید بایکالئین (baicalein) است که مطالعات زیادی بر روی آن صورت گرفته است و نشان داده شده که در شرایط برون‌تنی و درون تنی (*in vivo* و *in vitro*) اثرات محافظت نورونی قابل توجهی دارد [۲۲، ۲۳]. اپی‌گالوکاتکین ۳- گالات (epigallocatechin-3-gallate (EGCG)، فلاونوئید دیگری است که نقش محافظت نورونی آن در مدل موشی پارکینسونی القا شده توسط MPTP نشان داده شده است [۲۳]. ویژگی جالب توجه دیگر در فلاونوئیدها این است که این ترکیبات مهارکننده‌های قوی رادیکال‌های آزاد نیز می‌باشند [۲۴]. رادیکال‌های آزاد در طی استرس‌های اکسیداتیو در سلول ایجاد می‌شود که یکی از عوامل مخرب در بیماری‌های تحلیل برنده عصبی محسوب می‌شوند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی بایکالئین (baicalein)، بایکالین (baicalin)، اسکولکپ فلاون‌ها (skullcap flavones) و وگونین (wogonin) ارتباط نزدیکی با اثرات محافظت نورونی آنها دارد [۲۵، ۲۶]. فلاونوئیدها جزء ترکیبات ضدالتهابی می‌باشند و به نظر می‌رسد این ویژگی را با تأثیر بر روی مسیر NF-kB در سلول اعمال می‌کنند [۲۸، ۲۷]. گیاهان به عنوان یکی از بهترین منابع تولیدکننده متابولیت‌های ثانویه‌ای همچون فلاونوئیدها می‌باشند [۲۹]. گرایش عمومی جامعه به استفاده از داروها و درمان‌های گیاهی و به طور کلی فرآورده‌های طبیعی بویژه در طی سال‌های اخیر روبه



بیان و خالص سازی پروتئین آلفاسینوکلئین

پلاسمید بیانی pNIC28-Bsa4 حاوی cDNA ژن آلفاسینوکلئین انسانی که از دانشگاه استنفورد آمریکا به صورت اهدایی دریافت شده بود، در باکتری اشرشیاکلی BL21 با استفاده از القا توسط IPTG (۰/۱ میلی مولار) بیان شد. خالص سازی پروتئین بیان شده مطابق روش هوانگ و همکاران انجام شد [۳۶]. به طور خلاصه خالص سازی پروتئین آلفاسینوکلئین در سه مرحله انجام شد که شامل شوک اسمزی، کروماتوگرافی تعویض آنیونی و کروماتوگرافی بر اساس اندازه بود.

القاء فیبریلایسیون در پروتئین آلفاسینوکلئین

آلفاسینوکلئین یکی از پروتئین‌هایی است که در حالت طبیعی مونومر و بدون ساختار ثانویه‌ی منظم است اما در شرایط بیماری به فیبریل‌های با ساختار منظم صفحات بتا تبدیل می‌شود که تحت شرایط ویژه‌ای در آزمایشگاه می‌توان این ساختارها را القا کرد. برای القاء فیبریلایسیون، ۲ میلی گرم در میلی لیتر از این پروتئین در بافر ۳۰ میلی مولار تریس (pH= ۷/۲) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد به گونه‌ای که در تمام مدت محلول حاصل با استفاده از یک مگنت ریز با سرعت ثابت هم زده شد [۳۷].

سنجش نشر فلورسانس تیوفلاوین تی

به منظور بررسی فرایند فیبریلایسیون آلفاسینوکلئین از نشر فلورسانس ThT استفاده شد. ThT در هنگام اتصال به ساختارهای فیبریلی صفحات بتا نشر فلورسانس خواهد داشت [۳۸]. به این منظور مقدار ۴۹۰ میکرو لیتر محلول ThT رقیق شده با ۱۰ میکرو لیتر نمونه‌ی پروتئینی به مدت ۳ دقیقه در شرایط تاریکی و دمای اتاق گرماگذاری شد. با برانگیختگی نمونه در طول موج ۴۴۰ نانومتر، نشر فلورسانس در بازه ۴۵۰ تا ۵۵۰ نانومتر ثبت شد.

جذب نوری قرمز کنگو

برای ارزیابی تشکیل یا عدم تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی همچنین میتوان از آزمون رنگ سنجی قرمز کنگو استفاده کرد

تیازول-۲-۵-دی فنیل تترازولیوم (MTT) و دی متیل سولفوکسید (DMSO) از شرکت Sigma (آمریکا) خریداری شدند. رده سلولی PC12 از انستیتو پاستور تهیه شد. محیط DMEM (High glucose) سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) و آنتی‌بیوتیک Penicillin/ Streptomycin از شرکت GIBCO (آمریکا) تهیه شد.

جمع آوری و خشک کردن گیاه

ریشه‌های گیاه *S. pinnatifida* در اردیبهشت ماه از منطقه داماش واقع در شمال ایران جمع‌آوری شد. داماش از روستاهای ییلاقی دهستان جیرنده بخش عمارلو، شهرستان رودبار است. این روستا در مختصات جغرافیایی ۳۱۴۸۴۹ شرقی و ۲۰۴۵۳۶ شمالی قرار گرفته است. گیاه توسط هرباریوم دانشگاه تهران شناسایی شده و با شماره هرباریومی 45950-TUH ثبت شد. پس از شستشوی کامل گیاه با آب، ریشه‌ها در دمای اتاق در شرایط سایه خشک شده و به صورت پودر تهیه شد.

عصاره‌گیری

به منظور تهیه عصاره اولیه از ریشه گیاه *S. pinnatifida* ۱۰ گرم از پودر ریشه در ۱۰ میلی لیتر متانول ۹۰ درصد/۱۰ درصد آب به روش سونیکاسیون عصاره‌گیری شد [۳۴]. پس از عبور از کاغذ صافی، عصاره حاصل به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد تا ذرات ریز معلق موجود در آن جداسازی شوند. در نهایت عصاره استخراجی به دست آمده به صورت انجمادی خشک شد.

جزء جزء سازی عصاره خام اولیه

به منظور جداسازی ترکیبات موجود در عصاره خام، جداسازی مایع-مایع با استفاده از حلال‌های غیر قابل اختلاط انجام شد [۳۵]. در این فرایند ۰/۳ گرم از عصاره خشک شده در ۱۰ میلی لیتر آب پراکنده شد و سپس به طور متوالی به ترتیب توسط ۱۰ میلی لیتر از حلال‌های هگزان، دی‌کلرومتان، اتیل استات و بوتانل نرمال جزء جزء سازی شد.



بررسی بقای سلولی

از آزمون MTT و همچنین LDH جهت ارزیابی کسر بقای سلولی استفاده می‌شود. آزمون MTT یک روش رنگ‌سنجی بر پایه احیا و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ فورمازان می‌باشد [۴۰]. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول سلولی با غلظت 3×10^4 سلول در میلی‌لیتر، در هر خانه کشت و در تکرارهای سه تایی تیمار شدند. سپس به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در کلیه تیمارها از DMSO رقیق شده با محیط کشت، به عنوان حلال نهایی استفاده شد. DMSO رقیق شده مورد استفاده، به تنهایی تأثیری بر میزان زنده ماندن سلول‌ها نداشت. پس از اتمام گرماگذاری، محیط کشت رویی خارج شده و مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ mg/ml) به سلول‌ها اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در گرمخانه حاوی CO_2 در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. مایع رویی هر خانه برداشته شده و با ۱۰۰ میکرولیتر DMSO خالص جایگزین شد. این محلول باعث حل شدن رسوب فورمازان می‌شود و جذب نوری آن در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه خوانش میکروپلیت ثبت شد.

اساس آزمون LDH سنجش وضعیت دست نخوردگی غشای سلول می‌باشد. در صورت سمی بودن تجمعات، غشا تغییر کرده و آنزیم‌هایی مانند لاکتات دهیدروژناز از سلول خارج می‌شوند. اگر سوبسترای این آنزیم (پیروات) در محیط باشد، میزان آن در محیط کم می‌شود و کاهش سوبسترا نسبت به نمونه کنترل بیانگر افزایش خروج آنزیم به واسطه اثر مخرب تجمعات بر روی غشای سلول‌ها می‌باشد. روش کشت و تیمار مانند آنچه در سنجش MTT گفته شد، می‌باشد. در زمان‌های مختلف بعد از تیمار به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط روی سلول‌ها از هر چاهک را برداشته و به یک میلی‌لیتر محلول از قبل آماده شده (ترکیب حاوی چهار حجم از محلول ۱ یا همان سوبسترا و یک حجم از محلول ۲ یا کوفاکتور آنزیم) می‌افزایم و جذب نمونه‌ها را چهار بار که هر بار به فاصله ۱ دقیقه، در طول موج ۳۴۰ نانومتر بررسی و با محاسبه ΔA (تغییرات جذب) میزان لاکتات دهیدروژناز آزاد شده از سلول‌های تیمار شده را اندازه‌گیری می‌نمائیم.

[۳۸]. قرمز کنگو توانایی اتصال به صفحات بتا را دارد و در حالت طبیعی نارنجی رنگ است اما زمانی که فیبریل به آن اضافه می‌شود به ارغوانی تغییر رنگ می‌دهد و در طیف جذبی آن یک انتقال به طول موج‌های بلندتر مشاهده می‌شود. بنابراین برای بررسی روند فیبریلاسیون پروتئین استفاده شد. ثبت جذب نوری نمونه‌ها در فاصله ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر انجام شد. به این منظور، ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های گرماگذاری شده به ۴۸۰ میکرولیتر محلول تازه قرمز کنگو ($5 \mu M$) در بافر فسفات سدیم ۲۰ میلی‌مولار) اضافه شد و طیف جذب نوری در بازه ۴۰۰-۶۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد. افزایش جذب نوری قرمز کنگو و انتقال طیف نشی آن به سمت طول موج قرمز نشان‌دهنده وجود ساختارهای آمیلوئیدی می‌باشد.

تصویربرداری فلورسانس از تجمعات آمیلوئیدی

برای تأیید وجود تجمعات آمیلوئیدی از تصویربرداری با میکروسکوپ فلورسانس (Nikon Eclipse E600) استفاده شد [۳۹]. بدین منظور ۱۵ میکرولیتر از نمونه حاوی تجمعات فیبریلی به ۱۵ میکرولیتر محلول رقیق شده ThT ($50 \mu M$) میکرومولار) اضافه شد. نمونه‌های تازه تهیه شده در تاریکی روی لام ریخته شد و تصاویر آن توسط میکروسکوپ فلورسانس گرفته شد.

کشت و تیمار رده سلولی PC12

در این تحقیق، از رده سلولی PC12 که از سلول‌های نوروبلاستوما انسانی است، استفاده شد. این رده سلولی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. 3×10^4 سلول در هر چاهک در ظروف کشت ۹۶ خانه‌ای در محیط DMEM (high glucose) حاوی ۱۰ درصد FBS و به مقدار استاندارد پنی‌سیلین / استرپتومایسین، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رطوبت ۹۰ درصد و ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری، در حضور و عدم حضور عصاره‌های استخراجی از گیاه (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) توسط پروتئین آلفاسینوکلئین (به مقدار ۱۰ درصد محیط) تیمار شدند.



از ضریب جذب مولی تقریبی معادل 0.412 میلی گرم در میلی لیتر محاسبه شد و پروتئین‌ها بعد از خشک‌سازی انجمادی در 20°C - درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

جهت بررسی فیبریلایسیون پروتئین نوترکیب آلفاسینوکلئین خالص، از محلول پروتئینی در زمان‌های مختلف گرم‌گذاری در شرایط مناسب برای القای تشکیل تجمعات فیبریلی، نمونه برداری شد. بررسی افزایش نشر فلورسانس در حضور ThT نشانگر افزایش جذب در 480 نانومتر بود و با افزایش زمان گرم‌گذاری شدت نشر فلورسانس بیشتر شد، که از نشانه‌های شکل‌گیری ساختارهای فیبریلی از نوع صفحات بتا است (شکل شماره ۱- الف). داده‌های حاصل از آزمون رنگ‌سنجی قرمز کنگو نیز نشان داد که در نمونه‌ی حاوی تجمعات فیبریلی آلفاسینوکلئین در مقایسه با نمونه کنترل رنگ، نه تنها شدت جذب نوری افزایش یافته بلکه یک انتقال به سمت طول موج قرمز در طیف جذبی آن دیده می‌شود که از ویژگی‌های اتصال قرمز کنگو به ساختارهای فیبریلی است (شکل شماره ۱- ب). جهت تأیید این آزمون‌ها از تصویربرداری میکروسکوپ فلورسانس استفاده شد که نتیجه حاصل نشان‌دهنده‌ی تشکیل ساختارهای گسترده فیبریلی از پروتئین واجد نشر فلورسانس بود (شکل شماره ۱- ج).

بررسی سمیت سلولی تجمعات فیبریلی آلفا سینوکلئین با

روش MTT و LDH

تجمع ساختارهای آمیلوئیدی می‌تواند باعث ایجاد سمیت و در نهایت مرگ سلول‌های عصبی شود. به منظور سنجش سمیت با روش MTT، رده سلولی PC12 در مجاورت عصاره‌ها و همچنین در عدم حضور عصاره‌ها با آلفا سینوکلئین تیمار گردید. داده‌ها نشان داد که گونه‌های تجمعی ۷ ساعته آلفاسینوکلئین اثر کشندگی قوی بر روی سلول‌های مذکور در مقایسه با سلول‌های کنترلی بدون تیمار داشتند به طوری که کسر بقاء سلول به ۵۲ درصد کاهش یافته بود، درحالی که تیمار با آلفا سینوکلئین در حضور عصاره‌های بوتانل نرمال و دی‌کلرومتان به میزان معنی‌داری مرگ سلولی کمتری داشتند و کسر زنده‌مانی سلول هادر این گروه‌های آزمایشی به میزان قابل

تعیین محتوی کل فلاونوئید عصاره‌ها

محتوی کل فلاونوئیدی عصاره‌های گیاه با استفاده از روش آلومینیوم کلراید (AlCl_3) تعیین شد [۴۱]. این روش بر اساس تشکیل کمپلکس فلاونوئید - آلومینیوم می‌باشد. بدین منظور 100 میکرولیتر از عصاره خالص گیاه و جزء‌های جدا شده حاصل از آن با حجم برابری از محلول متانولی $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2% درصد) مخلوط شد. پس از آنکه محلول حاصل به شدت تکان داده شد، نمونه‌ها به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند و سپس جذب آن در 430 نانومتر مورد سنجش قرار گرفت. تعیین مقدار فلاونوئید کل در هر کدام از جزء‌های عصاره گیاه بر اساس منحنی استاندارد فلاونوئید بایکالئین صورت گرفت.

تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از روش DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت [۴۲]. محلول متانولی DPPH با غلظت 0.002% درصد وزنی/حجمی در آماده شد. سپس یک میلی‌لیتر از این محلول با یک میلی‌لیتر (حاوی یک میلی‌گرم عصاره خشک) از عصاره‌ها ترکیب شد و پس از 30 دقیقه قرارگیری در دمای اتاق، جذب نوری محلول در 517 نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیز آماری داده‌ها

آزمایشات با حداقل سه بار تکرار انجام شد و نتیجه به صورت میانگین به همراه انحراف معیار ارائه شد. داده‌ها با نرم افزار SPSS مورد تحلیل قرار گرفته، معنادار بودن نتایج بین دو گروه با روش student-test سنجیده شد. حداقل معنی‌دار بودن $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است.

نتایج

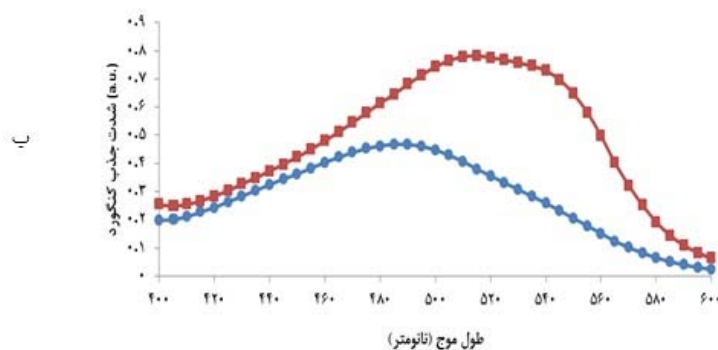
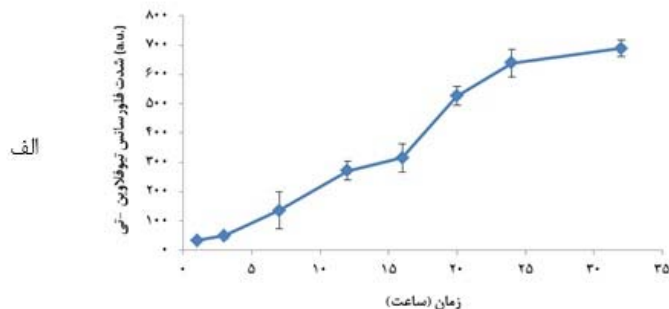
القای تجمعات فیبریلی در آلفاسینوکلئین و تعیین

شاخصه‌های فیبریلایسیون

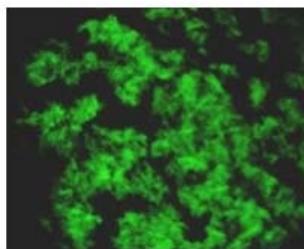
طبق آنچه در بخش روش‌ها توضیح داده شد، پس از بیان و خالص‌سازی پروتئین، غلظت پروتئین خالص شده با استفاده



توجهی بالا بود (شکل شماره ۲-الف). نتایج مطالعه سنجش LDH نیز نشان داد حضور عصاره‌های بوتانل نرمال و دی کلرومتان به میزان معنی‌داری مانع نفوذ آنزیم به محیط و پایداری سلولی شده است (شکل شماره ۲-ب).

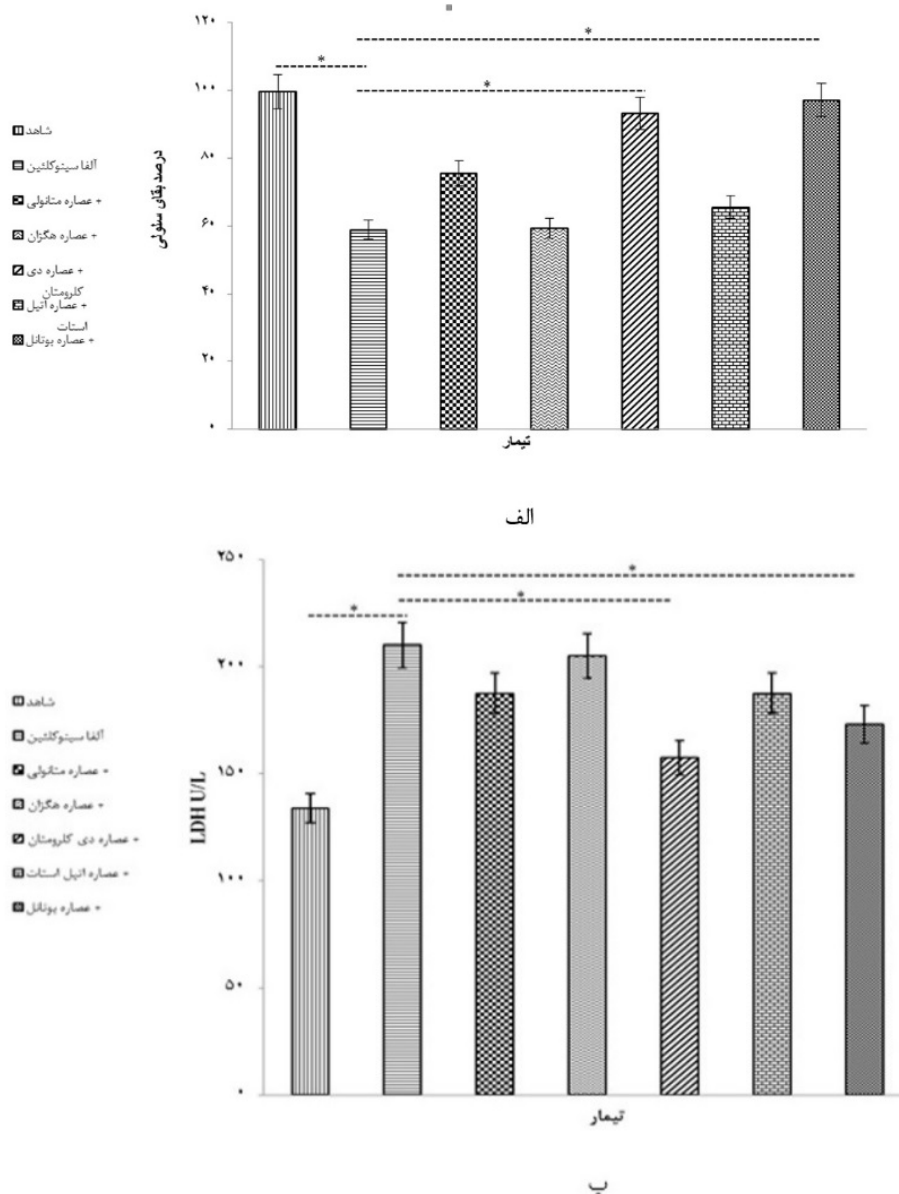


ج



شکل شماره ۱- بررسی القای تجمعات فیبریلی در آلفاسینوکلئین. الف) طیف نشر فلورسانس ThT پس از اضافه کردن نمونه سینوکلئین که در زمان‌های ۳ تا ۳۲- ساعت در $pH=7/2$ و دمای 37 درجه سانتی‌گراد با غلظت 2 میلی‌گرم گرماگذاری شده بود. ب) طیف جذبی قرمز کنگو (■) آلفا سینوکلئین گرماگذاری شده به مدت 24 ساعت در $pH=7/2$ و دمای 37 درجه سانتی‌گراد. (●) قرمز کنگو به عنوان کنترل. ج) بررسی تشکیل تجمعات فیبریلی آلفاسینوکلئین با استفاده از عکس فلورسانس تیوفلاوین تی بزرگنمایی: تصاویر $20\times$ برابر





شکل شماره ۲- بررسی وضعیت زنده ماندنی رده سلولی PC12 تیمار شده با ۱۰ درصد از نمونه ۷ ساعته آلفاسیتوکلئین به تنهایی و به همراه عصاره های مختلف *S. pinnatifida* با سنجش MTT (الف) و LDH (ب) * $p \text{ value} < 0.05$ کیفیت نوشته های تصویر خوب نیست

مختلفی از فلاونوئید در هر کدام از جزءها وجود دارد، بدین ترتیب که عصاره های متانولی، دی کلرومتانی و بوتانل نرمال حاوی بیشترین غلظت از فلاونوئید بود. همچنین عصاره هگزان کمترین میزان از فلاونوئید را داشت (جدول شماره ۱).

تعیین میزان کل فلاونوئید عصاره *S. pinnatifida*

بر اساس یافته های پیشین در ارتباط با اهمیت و نقش فلاونوئیدها در محافظت از نورون ها، محتوی کل فلاونوئیدی عصاره خالص و جزءهای حاصل از آن با استفاده از روش آلومینیوم کلراید سنجش شد. نتایج نشان داد که غلظت های



جدول شماره ۱- میزان فلاونوئید تام و درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های ریشه *S. pinnatifida*

| فعالیت آنتی‌اکسیدانی (درصد) | محتوی فلاونوئیدی (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) | حلال مصرفی |
|-----------------------------|---|--------------|
| ۹۲/۰۰۵ ± ۰/۱۶۴ | ۱/۵۰۹ ± ۰/۰۵۵ | متانول |
| ۱۹/۲۸۱ ± ۰/۰۹۹ | ۰/۰۰۹ ± ۰/۰۰۱ | هگزان |
| ۹۲/۸۶۱ ± ۰/۸۷۸ | ۲/۲۴۴ ± ۰/۰۲۹ | دی‌کلرومتان |
| ۹۲/۰۷۸ ± ۰/۶۹۹ | ۱/۰۰۹ ± ۰/۰۱۱ | اتیل استات |
| ۹۶/۰۱۸ ± ۱/۹۰۳ | ۱/۴۱۵ ± ۰/۰۱۳ | بوتانل نرمال |

آمیولئیدی آلفاسینوکلتین بر روی سلول‌های تیمار شده شوند. به منظور دستیابی به ترکیبات با خلوص بالاتر از عصاره‌ی خام ریشه گیاه، از سیستم جداسازی مایع-مایع با استفاده از حلال‌های غیرقابل اختلاط استفاده شد. با استفاده از این روش سریع و آسان عصاره‌هایی با خاصیت مهارکنندگی سمیت سلولی به دست آمد. بررسی میزان سمیت سلولی آلفاسینوکلتین با روش MTT و LDH، نشانگر کاهش قابل توجه درصد زنده مانی سلول‌ها در اثر تیمار با تجمعات آمیولئیدی آلفاسینوکلتین بود. در حالی که افزودن عصاره‌ها به محیط کشت سلول‌ها در طی روند تیمار موجب مهار مرگ سلول‌ها به طور معنی‌دار شد. مشخص شد که عصاره‌های دی‌کلرومتان و بوتانل نرمال در مقایسه با دیگر عصاره‌ها نقش محافظتی بالاتری بر روی سلول‌های تیمار شده با آلفاسینوکلتین دارد. با در نظر گرفتن میزان قطبیت حلال‌ها، حلال‌های دی‌کلرومتان و بوتانل نرمال به ترتیب با ثابت‌های دی‌الکترونیک ۱، ۹ و ۱۸ در مقایسه با حلال‌های هگزان و اتیل استات در گروه حلال‌های قطبی قرار می‌گیرند. ظاهراً عصاره‌های استخراجی توسط حلال‌های دی‌کلرومتان و بوتانل نرمال حاوی ترکیبات با قطبیت بالاتری می‌باشند. وجود ترکیباتی چون فلاونوئیدها که اثرات محافظت‌نورونی آنها پیشتر به اثبات رسیده است [۲۰، ۲۳، ۴۴] نیز می‌تواند عامل افزایش زنده‌مانی سلول‌ها در برابر سمیت ناشی از آلفاسینوکلتین باشد. دو فلاونوئید با اهمیت wogonin و skullcap flavone که طی مطالعات قبلی در ریشه‌ی *S. pinnatifida* شناسایی شده‌اند واجد خاصیت ضدالتهابی قوی می‌باشند [۴۵، ۴۶]. مشخص شده

بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های *S. pinnatifida*

از آنجایی که در بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی، وجود رادیکال‌های آزاد حاصل از تغییرات ایجاد شده در سلول، جزء عوامل مخرب محسوب شده و نقش بالایی در پیشرفت و افزایش شدت بیماری دارد، وجود خاصیت آنتی‌اکسیدانی در ترکیباتی که به عنوان دارو مورد استفاده قرار می‌گیرد اهمیت ویژه‌ای دارد.

در این راستا، بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراجی از گیاه *S. pinnatifida* با استفاده از روش DPPH نشان داد که تعدادی از عصاره‌ها (عصاره‌های بوتانل نرمال، دی‌کلرومتان و اتیل استات، به ترتیب با درصد مهارکنندگی: ۹۶/۰۱۸، ۹۲/۸۶۱ و ۹۲/۰۷۸ قدرت بسیار بالایی در حذف رادیکال‌های آزاد دارند (جدول شماره ۱).

بحث

در این مطالعه اثر عصاره‌های ریشه *S. pinnatifida* در کاهش سمیت نورونی حاصل از حضور تجمعات فیبریلی آلفاسینوکلتین بررسی شد. با در نظر گرفتن ویژگی‌های دارویی گونه‌های مختلف *Scutellaria* که طی مطالعات قبلی به اثبات رسیده است [۲۵] و وجود فلاونوئیدهای wogonin و skullcap flavone در ریشه *S. pinnatifida* [۴۳] که اهمیت درمانی در بیماری‌های تحلیل سیستم عصبی دارند، در این پژوهش فرض شد که عصاره‌های استخراجی *S. pinnatifida* می‌توانند موجب تعدیل اثرات سمی تجمعات



قدرتمندی می‌باشند [۵۳، ۵۲]. در این پژوهش فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های *S. pinnatifida* با استفاده از روش DPPH بررسی شد. نتایج نشان داد که عصاره‌ی متانولی و همچنین جزء‌های جداسازی شده حاصل از آن قادرند به میزان قابل توجهی رادیکال‌های آزاد را مهار کنند که در میان آنها عصاره‌های دی‌کلرومتان و بوتانل نرمال قادر به مهار رادیکال‌های آزاد در سطح بالاتر شدند.

هدف این مطالعه به صورت متمرکز و ویژه بر روی اثر عصاره‌های گیاه *S. pinnatifida* بر روی تجمع پروتئین کلیدی در بیماری‌های نورودجنریو یعنی آلفا سینوکلئین بوده است که جزو سه پروتئین مهم و اصلی آمیلوئیدوزن در مغز و مسبب بیماری‌های سینوکلئوپاتی است. ما در این مطالعه به دنبال حل این سوال بودیم که با توجه به فرضیه شبه پریونی (وجود تجمعات در مغز موجب گسترش تحلیل نورونی می‌شود) اگر در محیط بیرونی نورون تجمعات سمی وجود داشته باشد، آیا استخراج‌ها می‌توانند مانع تأثیر سمی آنها بر نورن‌های سالم شوند. این نکته شاید اهمیت بیشتری نسبت به تأثیر مهارکنندگی و ضدفیبریلاسیون آنها داشته باشد. تجمعات سمی آلفا سینوکلئین در مراحل اولیه فاز رشد exponential growth phase بیشتر حضور دارند به همین دلیل نمونه‌های گرماگذاری شده ۷ ساعته مطالعه شده است. با توجه به نتایج به دست آمده از این بررسی مشاهده شد که حضور عصاره‌های گیاه در محیط خارج سلولی، قادر به مهار سمیت سلولی تجمعات آلفاسینوکلئین به طور معنی‌دار می‌شود.

است که واکنش‌های التهابی در مغز نقش زیادی در تحلیل سیستم عصبی در بیماران پارکینسون دارد [۴۷، ۲۷]. wogonin قادر است از طریق مهار مسیر NF- κ B خاصیت ضدالتهابی خود را اعمال کند [۲۸، ۴۵]. همچنین skullcap flavone ها می‌توانند تأثیرات ضدالتهابی قوی خود را از طریق مهار *monocyte chemotactic protein-1* که فاکتور اصلی برای شروع پاسخ‌های التهابی است اعمال کنند [۴۸، ۴۹].

اندازه‌گیری محتوی فلاونوئیدی عصاره‌ها نشانگر وجود میزان بالایی از فلاونوئید بود که در این میان، عصاره‌ی دی‌کلرومتانی بیشترین مقدار فلاونوئید را دارا می‌باشد (۲/۲۴۴ mg/g).

در این پژوهش مشاهده شد که ارتباط مستقیمی بین میزان محتوی فلاونوئیدی عصاره‌ها با میزان مهار سمیت سلولی آنها وجود دارد. به طوری که عصاره‌ی دی‌کلرومتان با بیشترین مقدار فلاونوئید بالاترین میزان مهار را بر روی سمیت سلولی ایجاد شده توسط آلفاسینوکلئین نشان می‌دهد. در مقابل عصاره‌ی هگزانی با پایین‌ترین سطح میزان فلاونوئید، کمترین میزان محافظت‌کنندگی سلول‌ها را دارد.

رویداد دیگری که در روند پیشرفت بیماری در پارکینسون نقش مهمی دارد، استرس اکسیداتیو است که منجر به تولید سطح بالایی از رادیکال‌های آزاد شده و یک مکانیسم معمول بیماری‌زا جهت تحلیل سیستم عصبی است [۵۰]. رادیکال‌های آزاد تأثیرات زیان‌باری بر روی اندامک‌های سلولی داشته و در نهایت منجر به مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌ها می‌شود [۵۱]. ثابت شده است که فلاونوئیدها ترکیبات آنتی‌اکسیدان

منابع

1. Dorsey E, Constantinescu R, Thompson J, Biglan K, Holloway R, Kieburtz K and et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* 2007; 68 (5): 384-6.
2. Sulzer D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends in*

- Neurosciences* 2007; 30 (5): 244-50.
3. Alves G, Wentzel-Larsen T, Aarsland D and Larsen JP. Progression of motor impairment and disability in Parkinson disease a population-based study. *Neurology* 2005; 65 (9): 1436-41.
4. Murphy DD, Rueter SM, Trojanowski JQ and Lee VM-Y. Synucleins are developmentally



- expressed, and α -synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience* 2000; 20 (9): 3214-20.
5. Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA and Lansbury PT. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochem.* 1996; 35 (43): 13709-15.
 6. Jo E, McLaurin J, Yip CM, George-Hyslop PS and Fraser PE. α -Synuclein membrane interactions and lipid specificity. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275 (44): 34328-34.
 7. Bodles AM, Guthrie DJ, Greer B and Irvine GB. Identification of the region of non-A β component (NAC) of Alzheimer's disease amyloid responsible for its aggregation and toxicity. *Journal of Neurochem.* 2001; 78 (2): 384-95.
 8. Büeler H. Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Experimental Neurol.* 2009; 218 (2): 235-46.
 9. Niranjana R. The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease: focus on astrocytes. *Molecular Neurobiol.* 2014; 49 (1): 28-38.
 10. Galvin JE, Lee VM-Y, Trojanowski JQ. Synucleinopathies: clinical and pathological implications. *Archives of Neurology* 2001; 58 (2): 186-90.
 11. Taschenberger G, Garrido M, Tereshchenko Y, Bähr M, Zweckstetter M and Kügler S. Aggregation of α Synuclein promotes progressive in vivo neurotoxicity in adult rat dopaminergic neurons. *Acta neuropathologica* 2012; 123 (5): 671-83.
 12. Demuro A, Mina E, Kaye R, Milton SC, Parker I and Glabe CG. Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280 (17): 17294-300.
 13. Arispe N. Architecture of the Alzheimer's A β P ion channel pore. *The Journal of Membrane Biology* 2004; 197 (1): 33-48.
 14. Conte A, Pellegrini S and Tagliazucchi D. Synergistic protection of PC12 cells from β -amyloid toxicity by resveratrol and catechin. *Brain Research Bulletin.* 2003; 62 (1): 29-38.
 15. Steiner JA, Angot E and Brundin P. A deadly spread: cellular mechanisms of α -synuclein transfer. *Cell Death & Differentiation* 2011; 18 (9): 1425-33.
 16. Costanzo M and Zurzolo C. The cell biology of prion-like spread of protein aggregates: mechanisms and implication in neurodegeneration. *Biochemical J.* 2013; 452 (1): 1-17.
 17. Bellucci A, Zaltieri M, Navarria L, Grigoletto J, Missale C and Spano P. From α -synuclein to synaptic dysfunctions: new insights into the pathophysiology of Parkinson's disease. *Brain Res.* 2012; 1476: 183-202.
 18. Caruana M, Högen T, Levin J, Hillmer A, Giese A and Vassallo N. Inhibition and disaggregation of α -synuclein oligomers by natural polyphenolic compounds. *FEBS Letters* 2011; 585 (8): 1113-20.
 19. Meng X, Munishkina LA, Fink AL and Uversky VN. Effects of various flavonoids on the synuclein fibrillation process. *Parkinson's Disease.* 2010; 2010.
 20. Meng X, Munishkina LA, Fink AL and Uversky VN. Molecular mechanisms underlying the flavonoid-induced inhibition of α -synuclein fibrillation. *Biochemistry* 2009; 48 (34): 8206-24.
 21. Lu JH, Ardah MT, Durairajan SSK, Liu LF, Xie LX, Fong WFD and et al. Baicalein Inhibits Formation of α -Synuclein Oligomers within Living Cells and Prevents A β Peptide Fibrillation and Oligomerisation. *Chembiochem* 2011; 12 (4): 615-24.
 22. Hu Q, Uversky VN, Huang M, Kang H, Xu F, Liu X, et al. Baicalein inhibits α -synuclein oligomer formation and prevents progression of α -synuclein accumulation in a rotenone mouse model of Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica*



Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease 2016; 1862 (10): 1883-90.

23. Levites Y, Weinreb O, Maor G, Youdim MB, Mandel S. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *J. Neurochem.* 2001; 78 (5): 1073-82.

24. Mustafa R, Hamid AA, Mohamed S and Bakar FA. Total phenolic compounds, flavonoids, and radical scavenging activity of 21 selected tropical plants. *Journal of Food Science* 2010; 75 (1): C28-C35.

25. Huang W-H, Lee A-R and Yang C-H. Antioxidative and anti-inflammatory activities of polyhydroxyflavonoids of *Scutellaria baicalensis* GEORGI. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2006; 70 (10): 2371-80.

26. Shieh D-e, Liu L-T and Lin C-C. Antioxidant and free radical scavenging effects of baicalein, baicalin and wogonin. *Anticancer Res.* 1999; 20 (5A): 2861-5.

27. Suk K. Regulation of neuroinflammation by herbal medicine and its implications for neurodegenerative diseases. *Neurosignals* 2005; 14 (1-2): 23-33.

28. Kim DH, Kim HK, Park S, Kim JY, Zou Y, Cho KH and et al. Short-term feeding of baicalin inhibits age-associated NF- κ B activation. *Mechanisms of Ageing and Development* 2006; 127 (9): 719-25.

29. Janicijevic J, Tosic S, Mitrovic T and editors. Flavonoids in plants. Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions, 9, Nis (Serbia), 2007; 2008; 12 (4): 73-82.

30. Huang KC. The pharmacology of Chinese herbs: CRC press; 1998, 87 (2): 173-176.

31. Souri E, Amin G, Dehmobed-Sharifabadi A, Nazifi A and Farsam H. Antioxidative activity of sixty plants from Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Res.* 2010; 13 (17): 55-9.

32. Sauvage S, Samson E, Granger M, Majumdar A, Nigam P, Nahar L and et al. Assessment of free-radical-scavenging and antibacterial activities, and brine shrimp toxicity of *Scutellaria pinnatifida* (Lamiaceae). *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine* 2010; 10 (4): 304-9.

33. Boozari M, Mohammadi A, Asili J, Emami SA and Tayarani-Najaran Z. Growth inhibition and apoptosis induction by *Scutellaria pinnatifida* A. Ham. on HL-60 and K562 leukemic cell lines. *Environmental Toxicology and Pharmacol.* 2015; 39 (1): 307-12.

34. Azwanida N. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med. Aromat. Plants* 2015; 4 (196): 2167-0412.1000196.

35. Wang C-Z, Li X-L, Wang Q-F, Mehendale SR and Yuan C-S. Selective fraction of *Scutellaria baicalensis* and its chemopreventive effects on MCF-7 human breast cancer cells. *Phytomedicine* 2010; 17 (1): 63-8.

36. Huang C, Ren G, Zhou H and Wang C-c. A new method for purification of recombinant human α -synuclein in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 2005; 42 (1): 173-7.

37. Taebnia N, Morshedi D, Yaghmaei S, Aliakbari F, Rahimi F and Arpanaei A. Curcumin-Loaded Amine-Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles Inhibit α -Synuclein Fibrillation and Reduce Its Cytotoxicity-Associated Effects. *Langmuir* 2016; 32 (50): 13394-402.

38. Nilsson MR. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods* 2004; 34 (1): 151-60.

39. Ban T, Hamada D, Hasegawa K, Naiki H and Goto Y. Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence. *Journal of Biological Chem.* 2003; 278 (19): 16462-5.

40. Hansen MB, Nielsen SE and Berg K. Re-examination and further development of a precise



and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunological Methods* 1989; 119 (2): 203-10.

41. Lamaison J and Carnat A. Levels of principal flavonoids in flowers and leaves of *Crataegus-Monogyna* Jacq and *Crataegus-Laevigata* (Poiret) Dc (Rosaceae). *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 1990; 65 (11): 315-20.

42. Kim D-O, Jeong SW and Lee CY. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.* 2003; 81 (3): 321-6.

43. Ghahreman A and Attar F. Biodiversity of Plant Species in Iran: The vegetation of Iran, plant species, red data of Iran, endemic species, rare species, species threatened by extinction: Central Herbarium of Tehran University, Faculty of Science, 1999.

44. Masuda M, Suzuki N, Taniguchi S, Oikawa T, Nonaka T, Iwatsubo T and et al. Small molecule inhibitors of α -synuclein filament assembly. *Biochem.* 2006; 45 (19): 6085-94.

45. Piao HZ, Jin SA, Chun HS, Lee J-C and Kim W-K. Neuroprotective effect of wogonin: potential roles of inflammatory cytokines. *Archives of Pharmacol Res.* 2004; 27 (9): 930.

46. Lee H-H, Yang L-L, Wang C-C, Hu S-Y, Chang S-F and Lee Y-H. Differential effects of natural polyphenols on neuronal survival in primary cultured central neurons against glutamate-and glucose deprivation-induced neuronal death. *Brain Res.* 2003; 986 (1): 103-13.

47. Gao H-M and Hong J-S. Why neurodegenerative diseases are progressive:

uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends in Immunol.* 2008; 29 (8): 357-65.

48. Tai MC, Tsang SY, Chang LY and Xue H. Therapeutic potential of wogonin: a naturally occurring flavonoid. *CNS Drug Reviews* 2005; 11 (2): 141-50.

49. Lamer-Zarawska E, Wiśniewska A and Błach-Olszewska Z. Anticancer properties of *Scutellaria baicalensis* root in aspect of innate immunity regulation. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2010; 19: 419-28.

50. Uttara B, Singh AV, Zamboni P and Mahajan R. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacol.* 2009; 7 (1): 65-74.

51. Gilgun-Sherki Y, Melamed E and Offen D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacol.* 2001;40(8):959-75.

52. Burda S and Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chem.* 2001; 49 (6): 2774-9.

53. Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI and Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2005; 579 (1): 200-13.



Inhibitory Effect of *Scutellaria pinnatifida* Extracts on the Alpha Synuclein Cytotoxicity

Sashourpour M (Ph.D.)^{1,2}, Morshedi D (Ph.D.)^{2*}, Zahri S (Ph.D.)^{1*}, Aliakbari F (M.Sc.)², Fotovvat M (Ph.D. Student)³, Radjabian T (Ph.D.)⁴

1- Department of Biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

2- Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

3- Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

4- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran

*Corresponding author: National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Shahrak-e Pajooresh, Km 15, Tehran – Karaj Highway, Tehran, Iran and University of Mohaghegh Ardabil, Ardabil, Iran, postcode: 56199-11367

Tel & Fax: +98-21-44787423 and +98-45-33514701

E-mail: morshedi@nigeb.ac.ir, Zahri@uma.ac.ir

Abstract

Background: Many of neurodegenerative diseases (NDs) are associated with formation of the protein aggregates called amyloidal fibrils. Fibrillization of alpha-synuclein seems to be a key stage in the creation and progression of NDs and finding the compounds that inhibit the toxicity of alpha-synuclein aggregates seems to be one of the most attention subjects in the neurodegenerative studies.

Objective: In this study, the effects of various extracts derived from the roots of *S. pinnatifida*, on the alpha-synuclein cytotoxicity were assayed.

Methods: In this regard, the process of fibrillization was induced in alpha-synuclein and then formation of aggregates was verified using standard methods such as thioflavin T fluorescence assay and microscopic fluorescence images. Neurotoxicity of alpha-synuclein fibrils on PC12 cells was examined by MTT and LDH methods.

Results: Results showed that, after treatment with alpha-synuclein aggregates, the rate of cell death was evaluated significantly. In spite of the methanolic, hexane and ethyl acetate extracts, in the presence of dichloromethane and n. butanol extracts, the death of cells treated with alpha-synuclein were inhibited significantly. Furthermore, it was found that dichloromethane and n.butanol extracts contained high amount of anti-oxidant flavonoids.

Conclusion: It can be concluded that the extracts of *S. pinnatifida*, significantly inhibit the harmful effects of toxic alpha-synuclein aggregates and can be used to treat amyloid-related disorders. However, it is required more investigations on the kind of the effective compounds of *S. pinnatifida* extracts.

Keywords: *Scutellaria pinnatifida* (*S. pinnatifida*), Alpha – synuclein, Cytotoxicity, Flavonoids, Parkinson's disease

