

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات محافظتی اسانس گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*)  
بر سمیت سلولی القا شده توسط بتا آمیلوئید در سلول‌های PC12

زهرا عزیزی، مونا سلیمی، ناهید مجلسی، ناصر نقدی\*

بخش فیزیولوژی و فارماکولوژی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

پذیرش: ۷ دی ۱۳۹۸

دریافت: ۲۶ آذر ۱۳۹۸

چکیده

**زمینه و هدف:** در مطالعه قبلی اثر اسانس آویشن شیرازی و ترکیبات اصلی آن، تیمول و کارواکرول بر نقص یادگیری ناشی از بتا آمیلوئید در بهبود عملکرد ادراکی در مدل آلزایمر در موش صحرایی مشاهده شد. در این مطالعه، اثر اسانس آویشن شیرازی بر سمیت سلولی و رادیکال‌های آزاد اکسیژن ایجاد شده توسط بتا آمیلوئید در سلول‌های PC12 به عنوان مدل سلولی آلزایمر ارزیابی گردید.

**روش‌ها:** ابتدا سلول‌های PC12 به مدت ۴۸ ساعت در مجاورت  $A\beta_{25-35}$  و غلظت‌های مختلف آویشن شیرازی قرار داده شدند. سپس بررسی توانایی زیستی سلول‌ها با روش MTT میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن توسط دستگاه فلوریمتری انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج به‌دست‌آمده نشان دادند رقت‌های ۱۸/۷۵، ۳۷/۵ و ۷۵ میکرولیتر بر لیتر اسانس آویشن شیرازی درصد زنده‌بودن سلول‌ها را در مقایسه با بتا آمیلوئید به صورت معنی‌داری افزایش داده‌اند ( $p < 0/001$ ). همچنین رقت‌های ۱۸/۷۵ ( $p < 0/05$ )، ۳۷/۵ و ۷۵ ( $p < 0/001$ ) میکرولیتر بر لیتر اسانس آویشن شیرازی میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن را در مقایسه با بتا آمیلوئید به صورت معنی‌داری کاهش داده‌اند.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به مطالب مذکور، اسانس آویشن شیرازی قادر به کاهش سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن داخل سلولی ایجاد شده توسط بتا آمیلوئید یا به عبارتی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. بنابراین، توانایی اسانس آویشن شیرازی در کاهش سمیت بتا آمیلوئید و اثرات محافظت‌کننده آن در برابر آسیب سلولی ناشی از بتا آمیلوئید در سلول‌های PC12 می‌تواند نشان‌دهنده کارایی احتمالی آن‌ها در درمان بیماری آلزایمر باشد. با این حال، بررسی‌های بیشتری جهت تعیین کارایی بالینی آن ضروری به نظر می‌رسد.

**واژه‌های کلیدی:** آویشن شیرازی، بتا آمیلوئید، بیماری آلزایمر، رادیکال‌های آزاد اکسیژن، سلول PC12

مقدمه

از بین رفتن نورون‌های کولینرژیک در ناحیه سیتوم می‌باشد. از علائم نوروپاتولوژیک این بیماری شامل پلاک‌های آمیلوئیدی خارج سلولی با یک مرکز متشکل از پروتئین بتا آمیلوئید<sup>۱</sup> و همچنین کلافه‌های نوروفیبریلاری داخل سلولی متشکل از پروتئین تاو می‌باشند [۳]. از طرف دیگر، مشخص شده است که استرس اکسیداتیو در پیشرفت بیماری آلزایمر نقش دارد. برخی مطالعات نشان داده‌اند که بتا آمیلوئید نقش کلیدی در تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن<sup>۲</sup> دارد. مقادیر بالای رادیکال‌های آزاد

در حال حاضر بیش از ۲۵ میلیون نفر در جهان مبتلا به دمانس هستند و پیش‌بینی می‌شود که این رقم در سال ۲۰۵۰ میلادی چهار برابر شود. بیماری آلزایمر شایعترین نوع بیماری نورودژنراتیو و علت دمانس در میان سالمندان بوده و به‌عنوان یک معضل بهداشتی، اجتماعی و اقتصادی مطرح می‌باشد [۱]. این بیماری در دهه‌های آخر زندگی دیده می‌شود و با زوال عقل پیش‌رونده و تخریب منتشر عملکرد ذهنی مشخص می‌گردد. ابتدا روند تفکر و حافظه تحت تأثیر قرار گرفته و در پی آن تغییرات خلق‌وخو و رفتار بروز می‌کند [۲]. تغییرات اولیه بیماری آلزایمر شامل آتروفی هیپوکامپ و کورتکس انتورینال و

<sup>1</sup> Amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ )

<sup>2</sup> Reactive oxygen species (ROS)

اکسیژن سبب استرس اکسیداتیو می‌شود که می‌تواند منجر به مرگ سلولی و نهایتاً بیماری‌های نورودژنراتیو از جمله آلزایمر گردد [۴].

هرچند پیشرفت زیادی در شناخت اتیولوژی و پاتوژنز بیماری آلزایمر به عمل آمده است، روش‌های درمانی موجود بیشتر مبتنی بر درمان علامتی بوده و قادر به جلوگیری از پیشرفت بیماری یا معالجه آن نیستند. تا کنون دو کلاس دارو توسط اداره کل غذا و دارو ایالت متحده آمریکا برای درمان آلزایمر مورد تأیید قرار گرفته است: مهارکننده‌های استیل کولین‌استراز شامل دونپزیل، ریواستیگمین، گالاتامین، ممانتین و آنتاگونیست گیررقابتی گیرنده  $NMDA^2$ . این داروها عملکرد ادراکی بیماران را بهبود بخشیده و بدین ترتیب کیفیت زندگی آنان را ارتقاء می‌دهند [۵] ولی از طرف دیگر، مصرف این داروها غالباً توأم با بروز عوارض جانبی می‌باشد. با در نظر گرفتن عوارض جانبی داروهای فوق و این که این داروها قادر به ایجاد تغییر در روند پاتولوژی بیماری نیستند استراتژی‌های جدید درمانی از قبیل داروهای ضدالتهاب، آنتی‌اکسیدان و آنتی‌آمیلوئید مطرح شده‌اند. اخیراً داروهای گیاهی به میزان قابل توجهی در مدل‌های سلولی و حیوانی آلزایمر و مطالعات بالینی مورد آزمایش قرار گرفته و با توجه به سمیت کمتر و قابلیت عبور از سد خونی- مغزی مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند [۶].

گیاه آویشن شیرازی از تیرهٔ نعنائیان<sup>۴</sup> در طب سنتی ایران به منظور اثرات مفیدش بر توانایی‌های ذهنی انسان مورد استفاده قرار می‌گرفته است و از آن به عنوان مفتوح سدد و محلل ریح و بلاغم و مانع صعود ابخره به دماغ یاد شده است [۷]. ترکیبات عمدهٔ موجود در اسانس گیاه شامل تیمول، کارواکرول و پس از آن پاراسیمین، لینالول و گاماترپینن می‌باشد [۸]. مطالعات انجام شده بر روی آویشن شیرازی نشان داده‌اند که خواص فارماکولوژیک و بیولوژیک متنوعی از جمله خاصیت مهارکنندگی استیل کولین‌استراز [۹]، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهاب [۱۰] دارد.

در مطالعات قبلی مولفین، اثرات مفید اسانس آویشن شیرازی [۱۱] و ترکیبات اصلی آن، کارواکرول و تیمول [۱۲] در بهبود عملکرد ادراکی، به‌ویژه بهبود فراموشی ناشی از تزریق

## مواد و روش‌ها

### تهیه اسانس

گیاه آویشن شیرازی توسط گیاه‌شناس گروه فارماکولوژی دانشکده داروسازی علوم پزشکی شهید بهشتی شناسایی و نام علمی آن تایید گردید. علاوه بر این، نمونه استاندارد هر بار بیومی از گیاه تهیه و در هر بار بیوم آن دانشکده با شماره ۶۱۹ ثبت شد. به منظور تهیه اسانس، ۱۰۰ گرم برگ خشک گیاه توزین و داخل بالن ریخته شده، به آن آب اضافه گردید. سپس با استفاده از دستگاه کلونجر به روش تقطیر با آب اسانس‌گیری آغاز شده و چهار ساعت بعد اسانس جمع‌آوری گردید. درصد اسانس حاصل به این روش ۱-۲٪ وزنی-حجمی می‌باشد. اسانس حاصل تا زمان استفاده، در شیشه‌های تیره و در دمای ۴ °C در یخچال نگهداری شد.

<sup>3</sup> N-methyl-D-aspartate (NMDA)  
<sup>4</sup> Lamiaceae

## کشت سلول PC12 و انتخاب شرایط بهینه جهت آزمایشات

سلول‌های PC12 از نوع شناور در دو محیط کشت DMEM<sup>5</sup> و RPMI-1640<sup>6</sup> تکثیر شدند و محیط کشت RPMI به همراه PBS<sup>7</sup> ۱۵٪ جهت رشد و تکثیر سلول‌ها انتخاب شد. محیط کشت سلول‌ها هر دو تا سه روز یکبار تعویض می‌گردید، به این ترتیب که ۷۵٪ محیط قدیمی دور ریخته شده و به همین مقدار محیط کشت جدید اضافه می‌شد. برای پاساژ دادن سلول‌ها، تمامی محتویات سلولی فلاسک به لوله ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شده و پس از سانتریفیوژ، محیط رویی دور ریخته شده و محیط جدید به لوله اضافه می‌گردید. در مرحله آخر، حجم مناسبی از محیط کشت حاوی سلول‌ها را در فلاسک کشت ریخته و فلاسک فوق به انکوباتور ۳۷ °C درجه حاوی ۵٪ دی‌اکسیدکربن منتقل می‌شد.

## آماده‌سازی پپتید بتا آمیلوئید و ارزیابی سمیت سلولی آن

مقدار یک رم  $A\beta_{25-35}$  در یک میلی‌لیتر RPMI حل شده و در دمای ۳۷ °C به مدت چهار روز انکوبه شد تا ساختمان شبه فیبریلی و توده ای<sup>۸</sup> پیدا کند. غلظت‌های مختلف ۳۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار بتا آمیلوئید اگریگیت شده با سلول‌های PC12 به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد، سپس با استفاده از آزمون MTT<sup>۹</sup> سمیت سلولی آن بررسی گردید [۱۵]. با توجه به کاهش میزان زنده ماندن سلول‌های PC12 تا ۴۱/۸۲٪ کنترل در غلظت ۵۰ میکرومولار بتا آمیلوئید، این غلظت جهت آزمایشات بعدی برای بررسی اثرات اسانس و اجزاء آن انتخاب گردید. به منظور نگهداری بتا آمیلوئید، مقدار ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از فرم اگریگیت شده آن در میکروتیوب‌های نیم میلی گرمی ریخته و تا زمان استفاده در فریزر ۷۰ °C- نگهداری شد.

## آزمون MTT و تعیین توانایی زیستی سلول‌ها

جهت تعیین توانایی زیستی سلول‌ها<sup>۱۰</sup>، آزمون MTT انجام گردید. MTT نمک محلول در آب تترازولیوم است که تحت تاثیر آنزیم‌های دهیدروژناز موجود در میتوکندری‌های فعال در سلول‌های زنده، در اثر شکستن حلقه تترازولیوم به فورمازان بنفش رنگ تبدیل می‌شود [۱۵]. برای تعیین تعداد سلول مناسب جهت کار، تعداد ۵۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۲۰۰۰۰ و ۳۰۰۰۰ سلول در پلیت‌های ۹۶ خانه پلیت شدند تا از رشد سلول‌ها اطمینان حاصل شود و بر اساس نتایج MTT، تعداد ۲۰۰۰۰ سلول در حجم ۱۰۰ میکرولیتر مناسب تشخیص داده شد.

روش کار به این ترتیب بود که ابتدا تمامی پلیت‌ها، ژلاتینه شدند تا چسبندگی سلول‌ها در هر یک از خانه‌ها بالا رود. سپس تعداد سلول مورد نظر در حجم ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت در هر خانه از پلیت‌های ۹۶ تایی پلیت شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C حاوی دی‌اکسیدکربن قرار گرفتند. سپس موادی که قرار است اثرشان بر روی سلول‌ها ارزیابی شود به هر یک از خانه‌ها اضافه شدند. پس از ۴۸ ساعت ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT به غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر خانه از پلیت اضافه گردید و مجدداً پلیت به مدت سه ساعت در انکوباتور ۳۷ °C قرار گرفت. در طی این مدت یکسری کریستال تشکیل می‌شود که برای بهتر چسبیدن کریستال‌ها به خانه‌ها، پلیت‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس به آرامی محلول رویی کاملاً با سمپلر کشیده و دور ریخته شد و به منظور حل شدن کریستال‌ها ۱۰۰ میکرولیتر DMSO<sup>۱۱</sup> به هر یک از خانه‌ها اضافه گردید و بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون میزان جذب نور با دستگاه پلیت ریدر در طول موج‌های ۵۴۵ و ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. تمامی نمونه‌ها به صورت چهارتایی در سه روز مختلف مورد بررسی قرار گرفتند.

## بررسی اثر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی بر سمیت ناشی از بتا آمیلوئید

برای تعیین محدوده غلظت‌های غیرسمی اسانس آویشن

<sup>5</sup> Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)

<sup>6</sup> Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640)

<sup>7</sup> Phosphate buffered saline (PBS)

<sup>8</sup> Aggregate

<sup>9</sup> MTT, (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)

<sup>10</sup> Cell viability

<sup>11</sup> Dimethyl sulfoxide (DMSO)

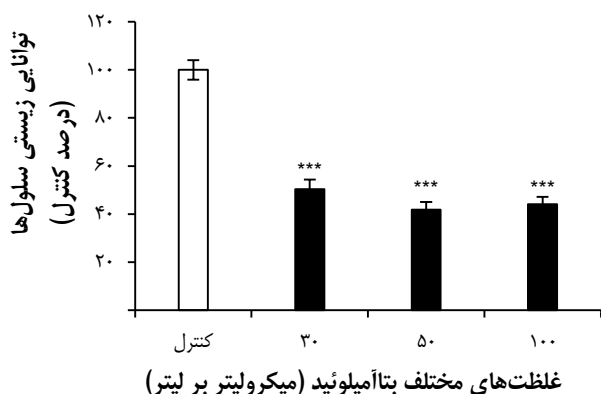
واریانس یک طرفه<sup>۱۷</sup> و در موارد وجود اختلاف معنی دار، از تست توکی<sup>۱۸</sup> استفاده گردید.  $p < 0.05$  به عنوان معیار معنی دار بودن اختلاف در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

### ارزیابی سمیت سلولی پپتید بتا آمیلوئید

آنالیز آماری نشان‌دهنده اختلاف معنی دار میان گروه‌ها بود. در گروه‌های با غلظت‌های مختلف ۳۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار بتا آمیلوئید، کاهش معنی‌داری در درصد زنده‌بودن سلول‌ها در آزمون MTT پس از ۴۸ ساعت مواجهه سلول‌ها با بتا آمیلوئید مشاهده شد. بر مبنای نتایج، بتا آمیلوئید با غلظت ۵۰ میکرومولار توانست بیشترین میزان سمیت سلولی را ایجاد کند و بر همین اساس این غلظت برای دیگر آزمایشات انتخاب شد. (نمودار ۱).

تعیین دوزهای موثر اسانس آویشن شیرازی اثر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی بر میزان زنده‌بودن سلول‌ها در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود، بین گروه کنترل و گروه‌های آویشن شیرازی تا غلظت ۱۰۰ میکرولیتر بر لیتر اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. البته غلظت‌های ۷۵۰، ۱۵۰۰ و ۳۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر اسانس درصد زنده‌بودن سلول‌ها را در مقایسه با کنترل به صورت معنی‌داری کاهش داده اند ( $p < 0.001$ ). بنابراین غلظت‌های ۱۸/۷۵، ۳۷/۵ و ۷۵ میکرولیتر بر لیتر اسانس آویشن شیرازی برای دیگر آزمون‌ها انتخاب شدند (نمودار ۲).



**نمودار ۱-** اثر غلظت‌های مختلف بتا آمیلوئید بر بقای سلول‌های PC12 که با آزمون MTT سنجیده شده است. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای

<sup>17</sup> One-way ANOVA

<sup>18</sup> Tukey's Honestly Significant Difference

شیرازی تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس بر سلول‌های PC12 با استفاده از آزمون MTT بررسی شد و بر اساس آن سه غلظت ۱۸/۷۵، ۳۷/۵ و ۷۵ میکرولیتر بر لیتر جهت کارهای بعدی انتخاب شد. پس از آن غلظت ۵۰ میکرومولار از بتا آمیلوئید اگریگیت شده به همراه غلظت‌های فوق از اسانس با سلول‌های PC12 به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند، سپس با استفاده از آزمون MTT میزان زنده‌ماندن سلول‌ها بررسی گردید. ویتامین E<sup>۱۲</sup> با دوز ۵۰ میکرومولار به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

### اندازه گیری میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن

برای تعیین رادیکال‌های آزاد اکسیژن داخل سلولی، از رنگ DCF-DA<sup>۱۳</sup> استفاده شد. DCF-DA یک نشانگر غیرفلورسانس قابل نفوذ به داخل سلول‌ها می‌باشد که در اثر اکسیداسیون توسط پراکسیدازهای داخل سلولی به ماده به شدت فلورسانت DCF<sup>۱۴</sup> تبدیل می‌شود. میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن بر اساس تغییر در میزان شدت فلورسانت DCF توسط فلوریمتری ارزیابی می‌گردد [۱۶]. روش کار به این ترتیب بود که پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون بتا آمیلوئید در مجاورت سلول‌های PC12 در حضور و یا عدم حضور اسانس گیاهی آویشن شیرازی، سلول‌های PC12 با ۵ میکرومولار رنگ DCF-DA به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C درجه انکوبه شدند. سپس به آرامی رنگ اضافه شده به هریک از چاهک‌ها با سمپلر کشیده و دور ریخته شد و با بافر PBS دو مرتبه شستشوی سلول‌ها انجام گردید. در آخر شدت فلورسانت DCF برای هر نمونه توسط دستگاه فلوریمتری با طول موج‌های تحریک<sup>۱۵</sup> ۴۸۵ نانومتر و بازتابش<sup>۱۶</sup> ۵۲۸ نانومتر سنجیده شد. ویتامین E با دوز ۵۰ میکرومولار به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

### آنالیز آماری

جهت مقایسه داده‌های به‌دست‌آمده، از آزمون آنالیز

<sup>12</sup> Vitamin E

<sup>13</sup> 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA)

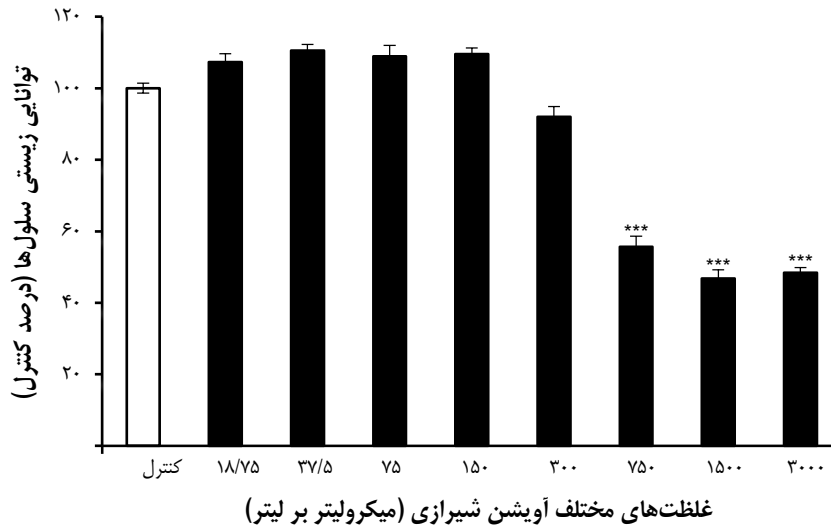
<sup>14</sup> 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF)

<sup>15</sup> Excitation

<sup>16</sup> Emission

$p < 0/001$

معیار میانگین بیان شده است. \*\*\*: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل

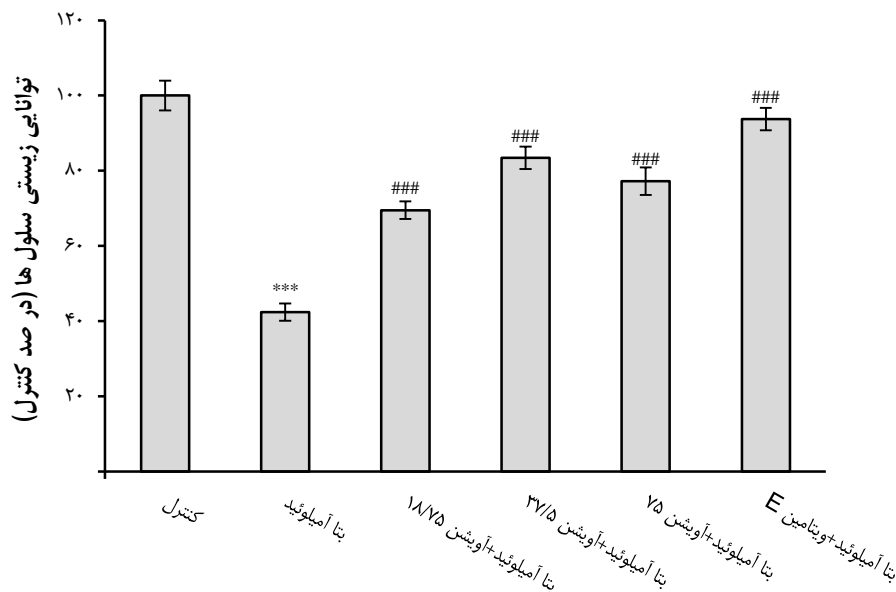


**نمودار ۲-** اثر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی بر بقای سلول‌های PC12 که با آزمون MTT سنجیده شده است. \*\*\*: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با  $p < 0/001$

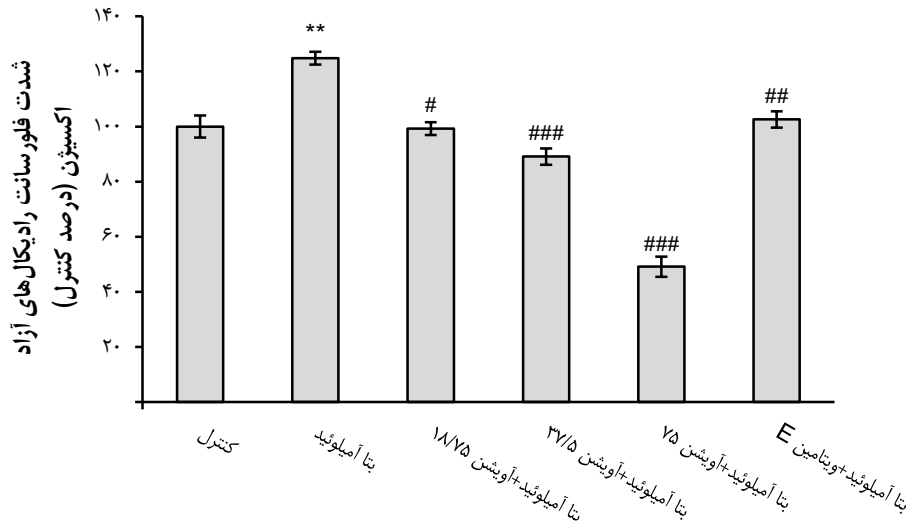
بتا آمیلوئید را به طور معنی‌داری کاهش دهد ( $p < 0/001$ ). غلظت‌های ۱۸/۷۵، ۳۷/۵ و ۷۵ میکرولیتر بر لیتر اسانس آویشن شیرازی درصد زنده‌بودن سلول‌ها را در مقایسه با بتا آمیلوئید به صورت معنی‌داری افزایش دادند ( $p < 0/001$ ). این اثر مشابه گروه ویتامین E به عنوان کنترل مثبت که توانست سمیت سلولی ایجاد شده توسط بتا آمیلوئید را به طور معنی‌داری کاهش دهد، بود ( $p < 0/001$ ) (نمودار ۳).

### اثر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی بر سمیت ناشی از بتا آمیلوئید

آنالیز آماری نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان گروه‌ها بود. بتا آمیلوئید با غلظت ۵۰ میکرومولار کاهش معنی‌داری در درصد زنده‌بودن سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل ایجاد کرد ( $p < 0/001$ ). درحالی‌که ویتامین E با غلظت ۵۰ میکرومولار به عنوان کنترل مثبت، توانست سمیت سلولی ایجادشده توسط



**نمودار ۳-** اثر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی بر سمیت ناشی از بتا آمیلوئید در سلول‌های PC12 که با آزمون MTT سنجیده شده است. \*\*\*: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با  $p < 0/001$  ####: اختلاف معنی‌دار با گروه بتا آمیلوئید با  $p < 0/001$ .



**نمودار ۴-** اثر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی بر میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن. ایجاد شده توسط بتا آمیلوئید در سلول‌های PC12 که با فلوریمتری سنجیده شده است. \*\*: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با  $p < 0/01$  #: اختلاف معنی‌دار با گروه بتا آمیلوئید با  $p < 0/05$  ###: اختلاف معنی‌دار با گروه بتا آمیلوئید با  $p < 0/01$  ####: اختلاف معنی‌دار با گروه بتا آمیلوئید با  $p < 0/001$ .

سلولی و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن ناشی از بتا آمیلوئید در سلول‌های PC12 به‌عنوان یک مدل سلولی آرایمر بررسی شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان دادند آویشن شیرازی سبب مهار آسیب سلولی القا شده توسط بتا آمیلوئید و کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن داخل سلولی می‌گردد. در مطالعه قبلی توسط مولفین نشان داده شد اسانس آویشن شیرازی باعث بهبود فراموشی ناشی از تزریق بتا آمیلوئید در هیپوکامپ موش صحرایی می‌شود [۱۱]. با توجه به این‌که بتا آمیلوئید نقش کلیدی در تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارد و در ضمن مقادیر بالای رادیکال‌های آزاد اکسیژن سبب استرس اکسیداتیو و نهایتاً بیماری آرایمر می‌گردد [۴]، می‌توان چنین عنوان کرد که بخشی از اثرات آویشن شیرازی در بهبود علائم بیماری آرایمر، به علت توانایی این گیاه در کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد. در تحقیقات اخیر توسط دیگر محققان نیز خاصیت آنتی‌اکسیدان آویشن شیرازی به اثبات رسیده است. به عنوان نمونه، در سال ۲۰۱۸، حاجی هاشمی و همکارانش گزارش کردند آویشن شیرازی از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد اکسیژن، باعث بهبود سمیت کلیوی ایجادشده با جنتامایسین در موش‌های صحرایی می‌شود [۱۷]. در مطالعه دیگری مشخص شد عصاره آویشن شیرازی و کارواکول به

### اثر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی بر میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن ایجاد شده توسط بتا آمیلوئید

آنالیز آماری نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان گروه‌ها بود. همانطور که در نمودار ۴ مشاهده می‌گردد، غلظت ۵۰ میکرومولار بتا آمیلوئید توانست افزایش معنی‌داری در میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در مقایسه با گروه کنترل ایجاد کند ( $p < 0/01$ ). در ضمن، ویتامین E با غلظت ۵۰ میکرومولار توانست سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن را در مقایسه با گروه بتا آمیلوئید کاهش دهد ( $p < 0/01$ ). غلظت‌های ۱۸/۷۵ ( $p < 0/05$ ) و ۳۷/۵ ( $p < 0/001$ ) و ۷۵ میکرولیتر بر لیتر اسانس آویشن شیرازی نیز میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن را در مقایسه با بتا آمیلوئید به صورت معنی‌داری کاهش دادند. بنابراین نتایج نشان دادند اسانس آویشن شیرازی مشابه ویتامین E توانایی کاهش سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن را دارد (نمودار ۴).

### بحث

در این مطالعه اثر اسانس گیاه آویشن شیرازی بر سمیت

مبتلایان به آلزایمر نشان داده شده است [۲۰]. بنابراین، استفاده از عوامل آنتی‌اکسیدان نظیر ویتامین E می‌تواند به عنوان استراتژی‌های درمانی در جهت کاهش سمیت بتا آمیلوئید به کار روند و پیشرفت بیماری آلزایمر را آهسته کند [۴]. در این مطالعه مشاهده شد مقدار رادیکال‌های آزاد اکسیژن به میزان قابل توجهی در سلول‌های PC12 که در مجاورت بتا آمیلوئید قرار داشتند، افزایش یافت. در صورتی که اسانس آویشن شیرازی توانست سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن را کاهش دهد. بنابراین آویشن شیرازی دارای فعالیت قابل توجه آنتی‌اکسیدانی برای مقابله با رادیکال‌های آزاد اکسیژن ایجاد شده توسط بتا آمیلوئید می‌باشد. با توجه به این که پپتید بتا آمیلوئید جزء اصلی تشکیل‌دهنده پلاک‌های پیری است و از مهمترین علائم نوروپاتولوژیک بیماری آلزایمر به شمار می‌رود، اسانس مورد مطالعه احتمالاً می‌تواند به عنوان یک عامل درمانی در درمان این بیماری مطرح باشد.

### نتیجه گیری

در مطالعه قبلی اثرات مفید اسانس آویشن شیرازی در بهبود عملکرد ادراکی در مدل‌های حیوانی بیماری آلزایمر مشاهده شد. این مطالعه که به صورت برون‌تنی بر روی سلول‌های PC12 انجام گرفت، نتایج قبلی را تأیید کرده و نشان داد اسانس آویشن شیرازی دارای فعالیت قابل توجه آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. در مجموع، نتایج به‌دست‌آمده نشان‌دهنده تأثیر قابل توجه آویشن شیرازی در کاهش سمیت بتا آمیلوئید و میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سطح سلولی می‌باشد. این مطالعات، شواهد اولیه را در مورد کارایی اسانس آویشن شیرازی در مقابله با اثرات بتا آمیلوئید فراهم می‌کند. نتایج این تحقیق خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی و پتانسیل این گیاه به منظور مصرف در بیماری آلزایمر را تأیید می‌کند. با این حال، بررسی‌های بیشتری جهت تعیین کارایی بالینی آن ضروری به نظر می‌رسد.

### سپاسگزاری

مطالعه حاضر بخشی از پایان‌نامه دکترای تخصصی مصوب انستیتو پاستور ایران می‌باشد و از آن انستیتو بابت تامین هزینه مالی قدردانی می‌گردد. در ضمن از آقایان دکتر محمد کمالی‌نژاد (دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید

علت داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی، اثرات سمی کبدی ایجادشده توسط آدریاماسین را در موش‌های صحرایی مهار می‌کنند [۱۸].

در سال‌های اخیر، مطالعاتی در ارتباط با اثر آویشن شیرازی بر بیماری آلزایمر و مکانیسم اثر آن نیز انجام شده است. در سال ۲۰۱۹، احمدی و همکارانش تاثیر آویشن شیرازی در بهبود یادگیری و حافظه فضایی در مدل حیوانی بیماری آلزایمر را به کاهش  $TNF-\alpha$ <sup>۱۹</sup> و پروتئین تاو هیپوکامپ موش سوری نسبت دادند [۱۹]. در مطالعه‌ای دیگر، اسکندری و همکارانش اثر اسانس آویشن شیرازی در بهبود عملکرد ادراکی در مدل حیوانی بیماری آلزایمر را به کاهش فعالیت استیل‌کولین‌استراز و افزایش سطح BDNF<sup>۲۰</sup> نسبت دادند [۹]. در مطالعه حاضر، مشاهده شد که اسانس گیاه آویشن شیرازی تأثیر قابل توجهی در کاهش سمیت ناشی از بتا آمیلوئید در سطح سلول PC12 دارد. پلاک‌های آمیلوئید در مرحله ابتدایی بیماری در نئوکورتکس تمپورال، کورتکس انتورینال و هیپوکامپ ظاهر می‌شوند. انباشته‌شدن بتا آمیلوئید در نواحی مغزی دخیل در عملکردهای ادراکی، یک آبخار پاتولوژیک را شروع می‌کند که منجر به اختلال عملکرد سیناپس‌ها، از بین رفتن آن‌ها و نهایتاً مرگ نورونها می‌شود [۳]. بنابراین، تحقیقات در زمینه یافتن عواملی با خاصیت مهاری بر تجمع بتا آمیلوئید و سمیت آن در درمان آلزایمر اهمیت ویژه‌ای دارند. با توجه به مطالب مذکور، توانایی اسانس گیاه آویشن شیرازی در کاهش سمیت بتا آمیلوئید و اثرات محافظت‌کننده آن‌ها در برابر آسیب سلولی ناشی از بتا آمیلوئید در سلول‌های PC12 می‌تواند نشان‌دهنده کارایی احتمالی آن‌ها در درمان بیماری آلزایمر باشد.

از عوامل مهمی که در پاتوژنز بیماری آلزایمر نقش دارند، می‌توان به التهاب نورونی اشاره کرد. روندی که به نظر می‌رسد نقشی کلیدی در ایجاد و پیشرفت بیماری بازی کند. استرس اکسیداتیو و اختلال عملکرد میتوکندری نیز روندهایی هستند که با ایجاد بیماری آلزایمر ارتباط دارند [۴]. دپوزیت‌های  $A\beta$  در مغز افراد مبتلا می‌تواند منجر به ایجاد رادیکال‌های سوپراکساید شود که در ترکیب با نیتریک اکساید، پراکسی نیتريت تشکیل داده و باعث صدمه سلولی می‌شود. در این رابطه چندین نشانه از آسیب اکسیداتیو مستقیماً در مغز

<sup>19</sup> Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )

<sup>20</sup> Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

## نقش نویسندگان

ز.ع: انجام مطالعه و جمع‌آوری و آنالیز داده‌ها، نگارش مقاله؛ م.س: مشاوره و راهنمایی در انجام مطالعه؛ ن.م: طراحی مطالعه، اصلاح مقاله؛ ن.ن: طراحی مطالعه، نظارت بر حسن اجرای مطالعه.

بهشتی) به منظور تهیه اسانس آویشن شیرازی و دکتر امیر امان‌زاده (بانک سلولی انستیتو پاستور ایران) بابت راهنمایی‌های ارزنده‌شان تشکر می‌شود.

## تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

## فهرست منابع

- [1] Alzheimer's Association, Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 12 (2016) 459-509.
- [2] Mott RT, Hulette CM, Neuropathology of Alzheimer's disease. *Neuroimaging Clin N Am* 15 (2005) 755-765.
- [3] Tönnies E, Trushina E, Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 57 (2017) 1105-1121.
- [4] Schmidt R, Hofer E, Bouwman FH, Buerger K, Cordonnier C, Fladby T, Galimberti D, Georges J, Heneka MT, Hort J, Laczó J, Molinuevo JL, O'Brien JT, Religa D, Scheltens P, Schott JM, Sorbi S, EFNS-ENS/EAN Guideline on concomitant use of cholinesterase inhibitors and memantine in moderate to severe Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 22 (2015) 889-898.
- [5] Anekonda TS, Reddy PH, Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease? *Brain Res Rev* 50 (2005) 361-376.
- [6] Hakim Momen MM, *Tohf tul momenin*, Tehran: The Parliament Library, 2009 [in Persian].
- [7] Shafiee A, Javidnia K, Composition of essential oil of *Zataria multiflora*. *Planta Med* 63 (1997) 371-372.
- [8] Eskandari-Roozbahani N, Shomali T, Taherianfard M, Neuroprotective effect of *Zataria multiflora* essential oil on rats with Alzheimer's disease: A mechanistic study. *Basic Clin Neurosci* 10 (2019) 85-97.
- [9] Sharififar F, Derakhshanfar A, Dehghan-Nudeh G, Abbasi N, Abbasi R, Gharaei RR, Koohpayeh A, Daneshpajouh M, In vivo antioxidant activity of *Zataria multiflora* Boiss essential oil. *Pak J Pharm Sci* 24 (2011) 221-225.
- [10] Khazdair MR, Ghorani V, Alavinezhad A, Boskabady MH, Pharmacological effects of *Zataria multiflora* Boiss L. and its constituents focus on their anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects. *Fundam Clin Pharmacol* 32 (2018) 26-50.
- [11] Majlessi N, Choopani S, Kamalinejad M, Azizi Z, Amelioration of amyloid  $\beta$ -induced cognitive deficits by *Zataria multiflora* Boiss. essential oil in a rat model of Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther* 18 (2012) 295-301.
- [12] Azizi Z, Ebrahimi S, Saadatfar E, Kamalinejad M, Majlessi N, Cognitive-enhancing activity of thymol and carvacrol in two rat models of dementia. *Behav Pharmacol* 23 (2012) 241-249.
- [13] Greene LA, Tischler AS, Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73 (1976) 2424-2428.
- [14] Shearman MS, Ragan CI, Iversen LL, Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 1470-1474.
- [15] Stéphan A, Phillips AG, A case for a non-transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav* 4 (2005) 157-172.
- [16] Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D, Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 69 (1997) 581-593.
- [17] LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC, Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* (1992) 227-231.
- [18] Hajihashemi S, Jafarian T, Ahmadi M, Rahbari A, Ghanbari F, Ameliorative effects of *Zataria multiflora* hydro-Alcoholic extract on gentamicin induced nephrotoxicity in rats. *Drug Res (Stuttg)* 68 (2018) 387-394.
- [19] Mohebbati R, Jalili-Nik M, Saghi H, Sadatfaraji H, Soukhtanloo M, *Zataria multiflora* and its main ingredient, carvacrol, affect on the renal function, histopathological, biochemical and antioxidant parameters in adriamycin-induced nephrotic rats. *Arch Physiol Biochem* 9 (2019) 1-9.
- [20] Ahmadi M, Taherianfard M, Shomali T, *Zataria multiflora* could improve hippocampal tau protein and TNF( $\alpha$ ) levels and cognitive behavior defects in a rat model of Alzheimer's disease. *Avicenna J Phytomed* 9 (2019) 465-473.



## Research paper

**The protective effect of *Zataria multiflora* on the amyloid  $\beta_{25-35}$ -induced cytotoxicity in PC12 Cells**

Zahra Azizi, Mona Salimi, Nahid Majelssi, Nasser Naghdi\*

*Department of Physiology and Pharmacology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*

Received: 17 December 2019

Accepted: 28 December 2019

**Abstract**

**Background and aims:** In the previous study, the effects of *Zataria multiflora* (ZM) and its main constituents carvacrol and thymol were evaluated and it was found that they could alleviate cognitive impairments caused by amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) in rodent model of Alzheimer's disease. In this study, the effect of ZM against  $A\beta_{25-35}$ -induced cytotoxicity and reactive oxygen species (ROS) accumulation in PC12 cells as a model of Alzheimer's disease was evaluated.

**Methods:** First, PC12 cells were exposed to  $A\beta_{25-35}$  and different concentrations of ZM for 48 h. Then, the cell viability was determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. Fluorospectrometer was employed to observe ROS production.

**Results:** The results indicated that concentrations of 18.75, 37.5 and 75  $\mu\text{L}$  of ZM could significantly rescue and protect PC12 cells against  $A\beta_{25-35}$ -induced cytotoxicity ( $p < 0.001$ ). Furthermore, the data demonstrate that  $A\beta_{25-35}$  induced intracellular ROS, while the concentrations of 18.75 ( $p < 0.05$ ), 37.5 and 75 ( $p < 0.001$ )  $\mu\text{L}$  of ZM could significantly reverse  $A\beta_{25-35}$  induction of ROS generation.

**Conclusion:** According to these findings, ZM could attenuate the level of intracellular ROS induced by  $A\beta$ . Therefore, ZM could have antioxidant activity. Ability of ZM to reduce ROS and its protective effects against  $A\beta$ -induced cellular damage in PC12 cells may indicate its potential for treatment of Alzheimer's disease. Further studies are required to determine its clinical efficacy.

**Keywords:** *Zataria multiflora*, Amyloid  $\beta$ , Alzheimer's disease, ROS, PC12 cell

**Please cite this article as follows:**

Azizi Z, Salimi M, Majlessi N, Naghdi N, The protective effect of *Zataria multiflora* on the amyloid  $\beta_{25-35}$ -induced cytotoxicity in PC12 Cells. *Iran J Physiol Pharmacol* 3 (2019) 150-158.

\*Corresponding author: naghdi@pasteur.ac.ir (ORCID ID: 0000-0002-3315-372X)

