**IranJPP**
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران
سال ۱۳۹۸، دوره ۳، شماره ۳، پیاپی ۱۱، صفحه ۱۵۸-۱۵۰

**مقاله پژوهشی**

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

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

بخش فیزیولوژی و فارماکولوژی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

دریافت: ۲۶ آذر ۱۳۹۸ پذیرش: ۷ دی 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 ایجادشده توسط بتا آمیلوئید در سلول‌های PC12 به عنوان مدل سلولی آلزایمر ارزیابی گردید.

**روش ها:** 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 ($p < ۰/۰۰۱$). همچنین رقت‌های ۱۸/۷۵ ($p < ۰/۰۵$)، ۳۷/۵ و ۷۵ ($p < ۰/۰۰۱$) 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 کارآیی احتمالی آن‌ها در درمان بیماری آلزایمر باشد. با این حال، بررسی‌های بیشتری جهت تعیین کارآیی بالینی آن ضروری به نظر می‌رسد.

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

## مقدمه

در حال حاضر بیش از ۲۵ میلیون نفر در جهان مبتلا به دمانس هستند و پیش‌بینی می شود 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 تحت‌تأثیر قرار گرفته و در پی آن تغییرات خلق‌وخو و رفتار بروز می‌کند [۲]. تغییرات اولیه بیماری آلزایمر شامل آتروفی هیپوکامپ و کورتکس انتورایnal و از بین رفتن نورون‌های کولینرژیک در ناحیه سپتوم می‌باشد. از علائم نوروپاتولوژیک این بیماری شامل پلاک‌های آمیلوئیدی خارج‌سلولی با یک مرکز متشکل از پروتئین بتا آمیلوئید[1] و همچنین کلافه‌های نوروفیبریلاری داخل سلولی متشکل از پروتئین تاو می‌باشند [۳]. ازطرف‌دیگر، 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[2] دارد. مقادیر بالای رادیکال‌های آزاد

[1] Amyloid β (Aβ)
[2] Reactive oxygen species (ROS)

* نویسنده مسئول مکاتبات: naghdi@pasteur.ac.ir (ORCID ID: 0000-0002-3315-372X)

[ Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-15 ]

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 استیل‌کولین‌استراز شامل دونپزیل، ریواستیگمین، گالانتامین، ممانتین و آنتاگونیست غیررقابتی گیرنده NMDA[3]. این داروها عملکرد ادراکی بیماران را بهبود بخشیده و بدین‌ترتیب کیفیت زندگی آنان را ارتقاء می‌دهند [۵] ولی ازطرف‌دیگر، مصرف این داروها غالباً توأم با بروز عوارض جانبی می‌باشد. با درنظرگرفتن عوارض جانبی داروهای فوق و این‌که این داروها قادر به ایجاد تغییر در روند پاتولوژی بیماری نیستند استراتژی‌های جدید درمانی از قبیل داروهای ضدالتهاب، آنتی‌اکسیدان و آنتی آمیلوئید مطرح شده‌اند. اخیراً داروهای گیاهی به میزان قابل‌توجهی 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[4] در طب سنتی ایران به منظور اثرات مفیدش بر توانایی‌های ذهنی انسان مورد استفاده قرار می‌گرفته است و از آن به عنوان مفتح سدد و محلل ریاح 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 پاراسیمن، لینالول و گاماترپینن می‌باشد [۸]. مطالعات انجام شده بر روی آویشن شیرازی نشان داده‌اند که خواص فارماکولوژیک و بیولوژیک متنوعی از جمله خاصیت مهارکنندگی استیل‌کولین‌استراز [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 $A\beta_{25-35}$ در هیپوکامپ موش صحرایی به عنوان مدل حیوانی بیماری آلزایمر مشاهده شد. در ادامه کار، به منظور بررسی مکانیسم‌های مولکولی و سلولی اسانس آویشن شیرازی از سلول‌های PC12 با منشأ فئوکروموسیتومای رات به عنوان مدل سلولی آلزایمر استفاده شد. این رده سلولی رفتار نورون‌ها نظیر تمایز و تشکیل سیناپس را تقلید می‌کند [۱۳]. بنابراین، این رده سلولی محیطی می‌تواند یک مدل آزمایشگاهی مناسب جهت مطالعات نورولوژیک و به‌ویژه مطالعه پاتوفیزیولوژی سلولی بیماری آلزایمر باشد. نشان داده شده است که افزودن بتا آمیلوئید به این سلول‌ها سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، اختلال عملکرد میتوکندری، آپوپتوز و مرگ سلولی می‌گردد [۱۴]. بتا آمیلوئید یک پپتید ۴۲ اسیدآمینه‌ای چهار کیلودالتونی است که آنالوگ‌های سنتتیک آن اغلب برای مدل‌سازی جنبه‌های متفاوت بیماری آلزایمر مورد استفاده قرار می‌گیرند. قطعه ۱۱ اسیدآمینه‌ای $A\beta_{25-35}$، یک پپتید C-ترمینال از $A\beta_{1-42}$ واقع در ناحیهٔ عملکردی هیدروفوب آن است که خواص نوروتوکسیک آن مشابه ترکیب مادر بوده و ابزار مفیدی برای بررسی مکانیسم‌های مرتبط با بیماری آلزایمر در مدل‌های حیوانی و سلولی است [۱۵]. در این مطالعه، تاثیر اسانس آویشن شیرازی بر سمیت سلولی و تولید رادیکال‌های آزاد ناشی از $A\beta_{25-35}$ در مدل سلولی آلزایمر مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### تهیه اسانس

گیاه آویشن شیرازی توسط گیاه‌شناس گروه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی علوم پزشکی شهید بهشتی شناسایی و نام علمی آن تایید گردید. علاوه‌براین، نمونه استاندارد هرباریومی از گیاه تهیه و در هرباریوم 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 ۲-۱٪ وزنی-حجمی می‌باشد. اسانس حاصل تا زمان استفاده، در شیشه‌های تیره و در دمای $^{o}C$ ۴ در یخچال نگهداری شد.

[3] N-methyl-D-aspartate (NMDA)
[4] Lamiaceae



[ Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-15 ]

## کشت سلول PC12 و انتخاب شرایط بهینه جهت آزمایشات

سلول‌های PC12 از نوع شناور در دو محیط کشت DMEM[5] و RPMI-1640[6] تکثیر شدند و محیط کشت RPMI به همراه PBS[7] 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 $^{o}C$ ۳۷ 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 $^{o}C$ ۳۷ به مدت چهار روز انکوبه شد تا ساختمان شبه فیبریلی و توده ای[8] پیدا کند. غلظت‌های مختلف ۳۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار بتا آمیلوئید اگریگیت‌شده با سلول‌های PC12به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد، سپس با استفاده از آزمون MTT[9] 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 میلی‌گرمی ریخته و تا زمان استفاده در فریزر $^{o}C$ ۷۰- نگهداری شد.

## آزمون MTT و تعیین توانایی زیستی سلول‌ها

جهت تعیین توانایی زیستی سلول ها[10]، 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 پلیت ها، 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 پلیت های ۹۶ تایی پلیت شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور $^{o}C$ ۳۷ 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 $^{o}C$ ۳۷ 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 حل‌شدن کریستال‌ها ۱۰۰ میکرولیتر DMSO[11] 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

[5] Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)
[6] Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640)
[7] Phosphate buffered saline (PBS)
[8] Aggregate
[9] MTT, (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)
[10] Cell viability
[11] Dimethyl sulfoxide (DMSO)



[ Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-15 ]

شیرازی تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس بر سلول‌های PC12 با استفاده از آزمون MTT بررسی شد و بر اساس آن سه غلظت۱۸/۷۵، 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 غلطت‌های 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[12] با دوز ۵۰ میکرومولار به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

### اندازه گیری میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن

برای تعیین رادیکال‌های آزاد اکسیژن داخل‌سلولی، از رنگ DCF-DA[13] 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[14] 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 عدم‌حضور اسانس گیاهی آویشن شیرازی، سلول‌های PC12 با ۵ میکرومولار رنگ DCF-DA به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ $^{o}$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[15] ۴۸۵ نانومتر و بازتابش[16] ۵۲۸ نانومتر سنجیده شد. ویتامین E با دوز ۵۰ میکرومولار به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

### آنالیز آماری

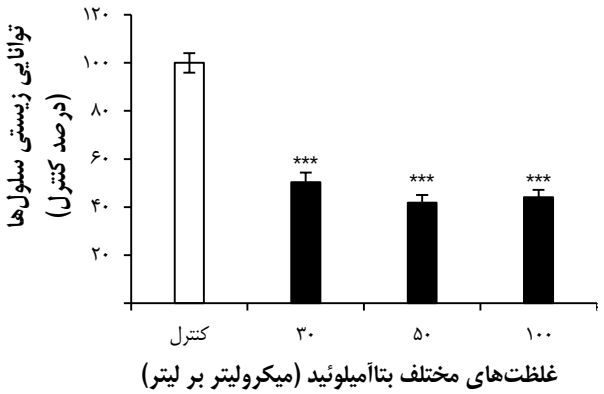
جهت مقایسه داده‌های به‌دست‌آمده، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه[17] و در موارد وجود اختلاف معنی دار، از تست توکی[18] استفاده گردید. $p < ۰/۰۵$ به عنوان معیار معنی‌دار بودن اختلاف در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

### ارزیابی سمیت سلولی پپتید بتا آمیلوئید

آنالیز آماری نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار 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 ($p < ۰/۰۰۱$). بنابراین غلظت‌های ۱۸/۷۵، ۳۷/۵ و ۷۵ میکرولیتر بر لیتر اسانس آویشن شیرازی برای دیگر آزمون‌ها انتخاب شدند (نمودار ۲).



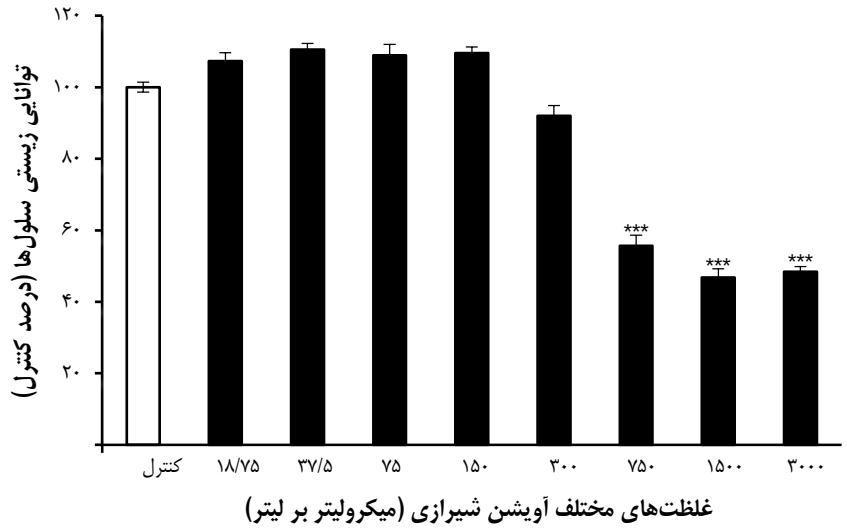

**نمودار ۱**– اثر غلظت‌های مختلف بتا آمیلوئید بر بقای سلول‌های PC12 که با آزمون MTT سنجیده شده است. نتایج به صورت میانگین ± خطای

[12] Vitamin E
[13] 2′,7′-dichlorodihydrofluorescin diacetate (DCF-DA)
[14] 2′,7′-dichlorodihydrofluorescin (DCF)
[15] Excitation
[16] Emission
[17] One-way ANOVA
[18] Tukey's Honestly Significant Difference



[ Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-15 ]

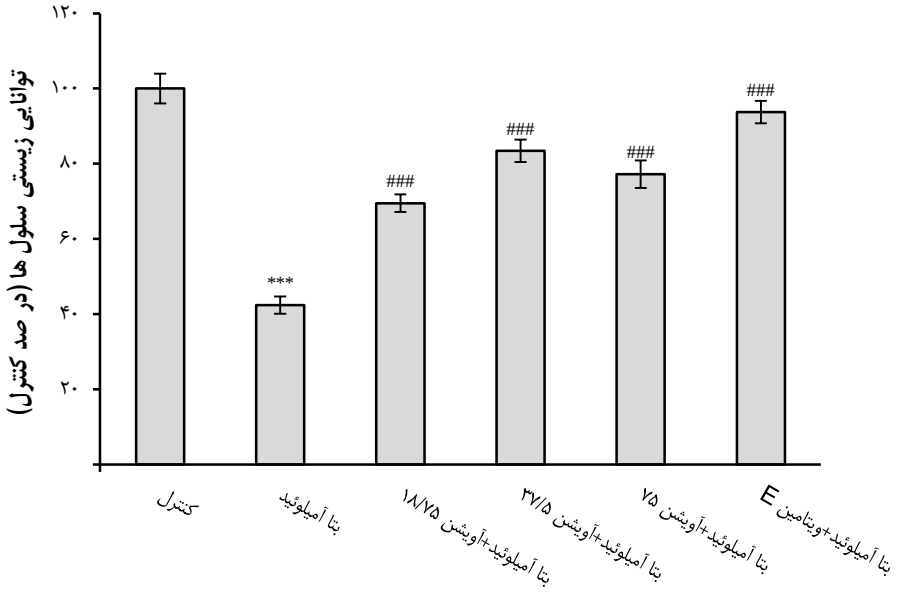
معیار میانگین بیان شده است. ***: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < ۰/۰۰۱$.




**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 $p < ۰/۰۰۱$.

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

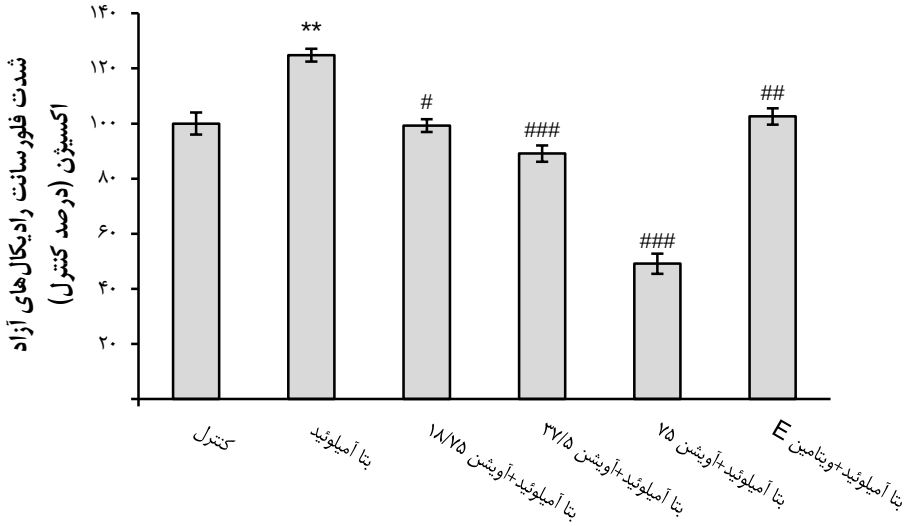
آنالیز آماری نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان گروه‌ها بود. بتا آمیلوئید با غلظت ۵۰ میکرومولار کاهش معنی‌داری در درصد زنده‌بودن سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل ایجاد کرد ($p < ۰/۰۰۱$). درحالی‌که ویتامین E با غلظت ۵۰ میکرومولار به عنوان کنترل مثبت، توانست سمیت سلولی ایجادشده توسط بتا آمیلوئید را به طور معنی‌داری کاهش دهد ($p < ۰/۰۰۱$). 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 ($p < ۰/۰۰۱$). 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 ($p < ۰/۰۰۱$) (نمودار ۳).






[ Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-15 ]

**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 $p<$ ۰/۰۰۱، ###: اختلاف معن دار با گروه بتا آمیلوئید با $p <$ ۰/۰۰۱.




**نمودار ٤**- اثر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی بر میزان رادیکال های آزاد اکسیژن. ایجاد شده توسط بتا آمیلوئید در سلول‌های PC12 که با فلوریمتری سنجیده شده است. **: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p$ ۰/۰۱، #: اختلاف معنی‌دار با گروه بتا آمیلوئید با $p <$ ۰/۰۵، ##: اختلاف معنی‌دار با گروه بتا آمیلوئید با $p <$ ۰/۰۱، ###: اختلاف معنی‌دار با گروه بتا آمیلوئید با $p <$ ۰/۰۰۱.

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

آنالیز آماری نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان گروه‌ها بود. همانطورکه 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 ($p <$ ۰/۰۱). در ضمن، ویتامین E با غلظت ۵۰ میکرومولار توانست سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن را در مقایسه با گروه بتا آمیلوئید کاهش دهد ($p <$ ۰/۰۱). غلظت‌های ۱۸/۷۵ ($p <$ ۰/۰۵) ۳۷/۵ و ۷۵ ($p <$ ۰/۰۰۱) 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 سلولی و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن ناشی از بتا آمیلوئید در سلول‌های PC12 به‌عنوان یک مدل سلولی آلزایمر بررسی شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان دادند آویشن شیرازی سبب مهار آسیب سلولی القا شده توسط بتا آمیلوئید و کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن داخل‌سلولی 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 به‌این‌که بتا آمیلوئید نقش کلیدی در تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارد و در ضمن مقادیر بالای رادیکال‌های آزاد اکسیژن سبب استرس اکسیداتیو و نهایتاً بیماری آلزایمر می‌گردد [۴]، می‌توان چنین عنوان کرد که بخشی از اثرات آویشن شیرازی در بهبود علائم بیماری آلزایمر، 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 کارواکرول به



[ Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-15 ]

علت داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی، اثرات سمی کبدی ایجادشده توسط آدریامایسین 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-α [19] 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 [20] نسبت دادند [۹]. در مطالعه حاضر، مشاهده شد که اسانس گیاه آویشن شیرازی تأثیر قابل‌توجهی در کاهش سمیت ناشی از بتا آمیلوئید در سطح سلول PC12 دارد. پلاک‌های آمیلوئید در مرحله ابتدایی بیماری در نئوکورتکس تمپورال، کورتکس انتورایnال و هیپوکامپ ظاهر می‌شوند. انباشته‌شدن بتا آمیلوئید در نواحی مغزی دخیل در عملکردهای ادراکی، یک آبشار 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 کارآیی 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 Aβ در مغز افراد مبتلا می‌تواند منجر به ایجاد رادیکال‌های سوپراکساید شود که در ترکیب با نیتریک اکساید، پراکسی نیتریت تشکیل داده و باعث صدمهٔ سلولی می‌شود. در این رابطه چندین نشانه از آسیب اکسیداتیو مستقیماً در مغز مبتلایان به آلزایمر نشان داده شده است [۲۰]. بنابراین، استفاده از عوامل آنتی‌اکسیدان نظیر ویتامین E می‌توانند به عنوان استراژی‌های درمانی در جهت کاهش سمیت بتا آمیلوئید به‌کار روند و پیشرفت بیماری آلزایمر را آهسته کنند [۴]. در این مطالعه مشاهده شد مقدار رادیکال‌های آزاد اکسیژن به میزان قابل‌توجهی در سلول‌های PC12 که در مجاورت بتا آمیلوئید قرار داشتند، افزایش یافت. درصورتی‌که اسانس آویشن شیرازی توانست سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن را کاهش دهد. بنابراین آویشن شیرازی دارای فعالیت قابل‌توجه آنتی‌اکسیدانی برای مقابله با رادیکال‌های آزاد اکسیژن ایجاد شده توسط بتا آمیلوئید می‌باشد. با توجه به‌این‌که 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.

## نتیجه‌گیری

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 قابل‌توجه آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. در مجموع، نتایج به‌دست‌آمده نشان‌دهنده تأثیر قابل‌توجه آویشن شیرازی در کاهش سمیت بتا آمیلوئید و میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سطح سلولی می‌باشد. این مطالعات، شواهد اولیه را در مورد کارآیی 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 کارآیی 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

[19] Tumor necrosis factor alpha (TNF-α)
[20] Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)



[ Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-15 ]

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

## تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

## 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.

## 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 β-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 probe2',7'-dichlorofluorescin as an indicator of reactive oxygen species formation andoxidative 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(α) levels and cognitive behavior defects in a rat model of Alzheimer's disease. ***Avicenna J Phytomed*** 9 (2019) 465-473.


[ Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-15 ]

**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 β (Aβ) 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 µl/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 ($p <0.001$) µL 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 Aβ. Therefore, ZM could have antioxidant activity. Ability of ZM to reduce ROS and its protective effects against Aβ-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 β, 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)



[ Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-15 ]

[ Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-15 ]