

بررسی اثرات حفاظتی عصاره گیاه آویشن بر استرس اکسایشی ایجاد شده توسط پپتید بتا

آمیلوئید (۲۵-۳۵) در سلول

N2A(neuro-2A)

ستایش داودی^{۱*}، آتنا بابایی^۲، میترا غلامی^۲

۱- پیشبرد آزمایش ها ، تحلیل داده ها

۲- جست و جو و یافتن مراجع ، ویرایش نهایی و تدوین

خلاصه

بیماری آلزایمر با تجمع پلاک‌های پپتید بتا آمیلوئید و استرس اکسیداتیو سلول‌های عصبی مشخص می‌شود، از این رو، محافظت عصبی با آنتی‌اکسیدان‌ها یک رویکرد درمانی امیدوارکننده است. این مطالعه با هدف بررسی اثرات محافظت‌کننده عصبی عصاره اتانولی گیاه آویشن در برابر سمیت ناشی از بتا آمیلوئید و تأثیر آن بر مارکرهای استرس اکسایشی، بر روی رده سلولی N2A انجام شد. با استفاده از روش MTT، بقای سلولی، میزان مالون دی آلدئید (MDA)، فعالیت گلووتاتیون پراکسیداز (GPx) و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) پس از مواجهه با بتا آمیلوئید ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که عصاره تام آویشن در غلظت‌های بالاتر از ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر، اثر حفاظتی کاملی داشته و بقای سلولی N2A را به میزان قابل توجهی افزایش می‌دهد؛ همچنین، این عصاره باعث کاهش تولید ROS و جبران افت فعالیت GPx ناشی از بتا آمیلوئید می‌گردد. در نهایت، این یافته‌ها حاکی از آن است که عصاره آویشن با تقویت توان دفاعی آنتی‌اکسیدانی سلول و پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن، از سلول‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو، که با کاهش پراکسیداسیون لیپیدها مشهود است، محافظت می‌نماید و پتانسیل بالایی به عنوان یک عامل نروپروتکتیو دارد.

واژه‌های کلیدی: آلزایمر، آویشن، استرس اکسایشی، بتا آمیلوئید، سلول‌های N2A

بیان مسئله

بیماری آلزایمر (AD) شایع ترین اختلال عصبی پیشرونده مرتبط با سن است که به عنوان یک عامل ایجاد کننده زوال عقلی در سالخوردهگی مورد توجه قرار می گیرد. زوال عقل با کاهش شدید تواناییهای هوشی و شناختی اختلال در حافظه تفکر انتزاعی و تغییر شخصیت همراه است (۱). تخمین زده میشود که ۳۵ میلیون نفر در سراسر جهان به بیماری آلزایمر مبتلا شده اند و انتظار میرود تا سال ۲۰۵۰ این میزان به ۱۱۵ میلیون نفر افزایش یابد (۲). مشخصه آسیب شناسی این بیماری پلاک های پیری و کلاف های تروفیبریلار^۱ می باشد. عنصر اصلی پلاک های پیری پپتید بتا آمیلوئید تجمع یافته است و بررسی میکروسکوپی بافت مغز این بیماران بعد از مرگ نشان می دهد که تجمع فزاینده پپتید بتا آمیلوئید در مغز مشخصه و ویژگی اصلی بیماری آلزایمر می باشد. بینیدینا آمیلوئید^۲ از شکسته شدن پروتئین پیش ساز بتا آمیلوئید (APP) به وسیله آنزیمهای بتا سکریتاز و گاما سکریتاز ایجاد می شود. متابولیسم غیرطبیعی پروتئین پیشساز بتا آمیلوئید و تولید غیرطبیعی بینیدینا آمیلوئید تجمع و رسوب آن باعث مرگ سلول های عصبی در بیماران می شود. همچنین مطالعات نشان داده است که اضافه کردن پپتید بتا آمیلوئید تجمع یافته به کشت سلول های عصبی باعث مرگ آن ها میشود. مکانیسم های آسیب عصبی القا شده به وسیله پپتید بتا آمیلوئید شامل تولید گونه های فعال اکسیژن و ایجاد استرس اکسایشی افزایش کلسیم داخل سلولی، آسیب میتوکندری و تخلیه انرژی سلول تغییرات اسکلت سلولی از طریق هیپرفسفریله شدن پروتئین تا^۳ و القای پاسخ های التهابی می باشند. این مکانیسم ها منجر به تخریب سیناپس و در نهایت باعث از بین رفتن نورونها از طریق فعال شدن مسیرهای مرگ سلولی آپاتوتیک یا نکروتیک می شوند (۳). استرس اکسایشی نقش پراهمیتی در ایجاد و پیشرفت پاتولوژی بیماری آلزایمر ایفا می کند. شواهد گسترده ای پیشنهاد می کند که آسیب اکسایشی به واسطه گونه های فعال اکسیژن (ROS) در چربیها پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک در بیماری آلزایمر رخ می دهد به عنوان بخشی از اثرات نورو توکسیک سمیت پپتید بتا آمیلوئید حداقل در قسمت هایی به واسطه رادیکال های آزاد ایجاد می شود (۴). از این رو تلاش های درمانی که به حذف رادیکال های آزاد یا جلوگیری از تولید آن ها کمک می کند می تواند در بیماری آلزایمر مفید باشد. در نتیجه ترکیبات پاد اکساینده به عنوان یک راه کار درمانی در درمان سمیت عصبی القا شده به وسیله پپتید بتا آمیلوئید و بهبود نتایج عصبی در بیماری آلزایمر معرفی شده است (۵). همچنین در بیماری آلزایمر نورون های کولینرژیک^۴ در ناحیه Basal forebrain به تدریج از بین می روند که منجر به اختلال حافظه در این بیماران می شود (۶). به همین علت داروهای تأیید شده که هم اکنون برای کنترل این بیماری استفاده می شوند داروهای مهارکننده آنزیم کولین استراز هستند (۷). این داروها باعث بهبودی علایم بیماری می شوند ولی از پیشرفت بیماری جلوگیری نمی کنند. بنابراین ترکیباتی که بتوانند از چند مسیر مانع سمیت بتا آمیلوئید شوند تأثیر بهتری در کنترل این بیماری می توانند داشته باشند (۸).

¹ Alzheimer

² Neurofibrillary tangles

³ Amyloid binedida

⁴ Tau protein

⁵ Cholinergic

در حال حاضر، چندین عامل درمانی طبیعی و مصنوعی امیدوارکننده بخشی از مطالعات بالینی برای AD هستند. با این حال، در میان داروهای مختلف، تنها چند مهارکننده کولین استراز نشان داده شده است که محافظت عصبی رضایت بخشی در برابر AD، از جمله تاکرین^۱، دونپزیل^۲، و ریواستیگمین^۳ ارائه می دهند. این داروها عمدتاً برای تسکین کوتاه مدت نقص شناختی در بیماران مبتلا به AD استفاده می شوند (۹). اگرچه علت اصلی AD به دلیل علت پیچیده ناشناخته باقی مانده است، اعتقاد بر این است که تشکیل پلاک β -آمیلوئید در درجه اول مسئول بدتر شدن اثر پاتولوژیک AD است. از این رو، محافظت از سلولهای عصبی در برابر آسیب اکسیداتیو می تواند در پیشگیری از علائم اولیه AD موفق باشد. آنتی اکسیدانهای مانند عصاره جینکو بیلوبا، هوپرزین A، اسید فرولیک و کورکومین در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از پیتید بتا آمیلوئید محافظت می کنند و درمانهای امیدوارکننده ای برای AD هستند (۱۰).

گیاه آویشن از تیره نعنائیان^۴ است که به استفاده گسترده از آن در کتب (Historia plantarum) استناد شده است (۱۰). این گیاه اثر حفاظتی بر روی سیستم عصبی دارد و به طور سنتی برای افزایش حافظه استفاده می شود. همچنین عصاره نام و فراکسیونهای مختلف گیاه دارای اثر مهارکنندگی آنزیم کولین استراز می باشند (۱۱). عصاره آبی گیاه آویشن فعالیتهای یاد اکسایشی خوبی نشان می دهد و به عنوان یک عامل احیاکننده پر قدرت شناخته شده است. عصاره این گیاه دارای اثر حفاظتی در برابر استرس اکسایشی ایجاد شده توسط عوامل اکسیدان که از طریق فرآیندهای مختلف باعث ایجاد پراکسیداسیون لیپید می شوند، می باشد (۱۲). مصرف عصاره این گیاه در بیماران مبتلا به آلزایمر باعث بهبودی علایم شده است (۱۳). با توجه به اینکه اثرات نروپروتکتیو برای این گیاه ذکر شده است، مکانیسم اثر آن ناشناخته است و هدف این مطالعه بررسی اثرات نروپروتکتیو عصاره اتانولی این گیاه در برابر سمیت بتا آمیلوئید و تأثیر آن بر مارکرهای استرس اکسایشی می باشد.

جنبه نوآورانه طرح:

این مطالعه با بررسی اثرات حفاظتی عصاره گیاه آویشن بر استرس اکسایشی ایجاد شده توسط پیتید بتا آمیلوئید در سلول های N2A در حوزه پژوهش های علوم اعصاب و داروسازی نوآورانه و پیشرفته قرار دارد. این تحقیق اثرات محافظتی و نروپروتکتیو عصاره این گیاه را در برابر سمیت بتا آمیلوئید بررسی کرده و اثرات آن بر مارکرهای استرس اکسایشی مورد بررسی قرار داده است. از جنبه های نوآوری این مطالعه می توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱. بررسی تأثیرات حفاظتی عصاره گیاهی بر سمیت بتا آمیلوئید در حوزه بیماری آلزایمر و استفاده از عصاره گیاهی به عنوان یک روش درمانی پتانسیل دار به عنوان یک نوآوری مهم در این تحقیق محسوب می شود.

¹ Tacrine

² Donepezil

³ Rivastigmine

⁴ Lamiaceae

۲. استفاده از روش‌های آزمایشگاهی برای بررسی میزان بقای سلولی، میزان مالون دی آلدئید، فعالیت آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز و مولکول‌های واکنش دهنده مشتق از اکسیژن به عنوان مارکرهای استرس اکسایشی، به عنوان یک روش نوآورانه برای ارزیابی اثرات حفاظتی عصاره گیاهی محسوب می‌شود.

۳. یافته‌های مطالعه نشان می‌دهند که عصاره آویشن به عنوان یک محافظ طبیعی می‌تواند اثرات حفاظتی مهمی را در برابر استرس اکسایشی ناشی از پیتید بتا آمیلوئید ارائه کند.

بنابراین، این تحقیق از جنبه‌های نوآوری، موضوع پژوهش انتخابی، روش‌های استفاده شده و یافته‌های به دست آمده، به عنوان یک تحقیق پیشرفته و ارزشمند در زمینه بیماری آلزایمر و حفاظت از سلول‌های عصبی، توانمندی بالقوه به عنوان یک روش درمانی نوآورانه را ارائه می‌دهد و ارزش بالقوه بسیاری را برای پژوهش‌های آینده در این زمینه ایجاد می‌کند.

پیشینه تحقیق

Yuan و همکاران در سال ۲۰۲۱ بر روی موضوع اثرات و مکانیسم‌های حفاظتی *Dendrobium * Lindl* آلکالوئیدها در آسیب سلولی PC۱۲ ناشی از $25-35\beta A$ مطالعه کردند. آن‌ها دریافتند که *Dendrobium nobile Lindl* آلکالوئیدها (DNLA) در برابر آسیب سلولی PC۱۲ ناشی از $25\beta A$ محافظت می‌کنند. همچنین DNLA استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد و مسیر آپوپتوز با واسطه میتوکندری را مهار می‌کند.

Liangjing و همکاران در سال ۲۰۲۲ بر روی موضوع کوثرستین از طریق تحریک گیرنده استروژن α ، فعال کردن ERK1/۲ و مهار آپوپتوز، سمیت سلولی سلول‌های PC۱۲ ناشی از آمیلوئید بتا (۲۵-۳۵) را مهار می‌کند مطالعه کردند. آن‌ها دریافتند که کوثرستین سمیت سلولی سلول‌های PC۱۲ ناشی از آمیلوئید بتا (۲۵-۳۵) را مهار می‌کند. همچنین کوثرستین^۱ گیرنده استروژن α را تحریک می‌کند، ERK1/۲ را فعال می‌کند و آپوپتوز را مهار می‌کند.

Kumju و همکاران در سال ۲۰۲۰ بر روی موضوع ژرانیین^۲ از سلول‌های PC۱۲ در برابر آسیب عصبی ناشی از $25-35\beta A$ محافظت می‌کند: درگیر شدن مسیرهای سیگنالینگ Bk-NF و MAPK مطالعه کردند. آن‌ها دریافتند که ژرانیین از سلول‌های PC۱۲ در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از $25-35\beta A$ و التهاب عصبی محافظت می‌کند. همچنین ژرانیین از طریق سرکوب مسیرهای سیگنالینگ MAPK از فعالیت NF-kB جلوگیری می‌کند.

Xue-Lian و همکاران در سال ۲۰۲۲ بر روی موضوع اثرات حفاظتی Liensinine، Isoliensinine و Neferine بر روی سلول‌های PC۱۲ آسیب دیده توسط آمیلوئید- β مطالعه کردند. آن‌ها دریافتند که Liensinine، Isoliensinine و Neferine از سلول‌های PC۱۲

¹ Quercetin

² Geranin

آسیب دیده توسط آمیلوئید بتا محافظت می کنند. همچنین این آلکالوئیدها هیپرفسفوریلاسیون پروتئین تاو را مهار می کنند و باعث کاهش آپوپتوز و مرگ می شوند.

Jeyakumar و همکاران در سال ۲۰۲۲ بر روی موضوع α -بیزابولول β -D-fucopyranoside از طریق رویکردهای آنتی اکسیدانی استرس اکسیداتیو ناشی از β -آمیلوئید (BA) ۲۵-۳۵ را در سلول های عصبی-2a مهار می کند تحقیق کردند. نتایج بدین گونه شد که α -بیزابولول β -D-fucopyranoside (ABFP) در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از β -آمیلوئید در سلول های Neuro-2a محافظت می کند. ABFP استیل کولین استراز را مهار می کند، پراکسیدهای لیپیدی را کاهش می دهد و از آسیب میتوکندری جلوگیری می کند.

محسنی و همکاران بر روی موضوع اثر تمرین هوازی و عصاره هیدرومتانلی مریم گلی (*Salvia officinalis*) بر حافظه، بیان CREB و BDNF در آلزایمر القا شده با بتا آمیلوئید مطالعه کردند. آنها دریافتند که عصاره مریم گلی و دویدن روی تردمیل، سبب بهبود یادگیری و حافظه شد، تمرین هوازی و عصاره مریم گلی اثر هم افزایی بر بهبود حافظه، نقص عصبی و چگالی سلول های عصبی در شرایط آلزایمر القا شده با بتا آمیلوئید دارد. لذا استفاده همزمان این دو مداخله پیشنهاد می شود.

عمرانی و همکاران بر روی موضوع سنجش اثرات آنتیاکسیدانی و محافظتی گیاه بادرشبو^۱ بر سمیت القاء شده توسط پپتید بتا آمیلوئید در سلول های PC۱۲ تحقیق کردند. آنها دریافتند که در سه غلظت ۰/۱، ۰/۰۱، ۱ میکروگرم بر میلیلیتر فعالیت ضد رادیکالی بالاتری نسبت به عصاره بادرشبو داشت، عصاره گیاه در غلظت های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلیلیتر سلول ها را در برابر سمیت بتا آمیلوئید محافظت نمودند و در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلیلیتر توانست از تغییرات نشانگرهای زیستی استرس اکسیداتیو القاء شده توسط بتا آمیلوئید جلوگیری نماید. در نهایت عصاره گیاه بادرشبو از سمیت پپتید بتا آمیلوئید از طریق مهار مسیرهای استرس اکسیداتیو جلوگیری می کند و شاید در درمان بیماری آلزایمر مفید باشد.

مواد و روش ها:

مواد

رده سلولی N2A از انیستیتو پاستور ایران خریداری شد. پپتید بتا آمیلوئید (۲۵-۳۵)، دیکلوروفلوروسین دی استات

(DCFH۲-DA) (۲،۵- (۴،۵-dimethyl thiazol-۲-yl) -۳-diphenyltetrazolium bromide (MMT)، نیوباربیتوریک اسید پلی -

D- لیزین (PDL) و کیت اندازه گیری فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز خریداری شد. محیط کشت RPMI، پنی سیلین -

استرپتومایسین و سرم جنین گاوی (FBS) استفاده شد.

¹ Dracocephalu moldavica

روش عصاره گیری از گیاه

عصاره برگ‌های خشک شده گیاه آویشن با روش ماسراسیون با استفاده از حلال اتانول: آب ۸۰:۲۰ و نسبت گیاه به حلال ۱:۱۰ به مدت چهار روز تهیه شد. بعد از گذشت هر ۲۴ ساعت مخلوط حلال و عصاره صاف شده و حلال جدید به تفاله گیاه اضافه می شد. عصاره به دست آمده با دستگاه تقطیر در خلأ در دمای کمتر از ۴۰ تا حد خشک شدن تغلیظ شد (۱۴).

کشت سلول

سلول‌های N2A (Neuro-2A) در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) پنسیلین ۱۰۰ واحد بین‌المللی و استرپتومایسین ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در فلاسک استریل کشت سلول کوت شده با پلی D-لایزین (PDL) و در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و فشار ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند (۱۵).

بررسی اثر عصاره تام بر روی سلول‌های N2A (Neuro-2A)

سلول‌ها با غلظت ۱۰۴ cell/well در پلیتهای ۹۶ خانه کوت شده با PDL کشت داده شدند و ۲۴ ساعت بعد محیط کشت سلول‌ها با محیط حاوی عصاره تام در رنج غلظتی ۱۰۰-۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌گرم تعویض شد و به مدت ۲۴ ساعت دیگر با محیط حاوی تام انکوبه شدند. غلظتهای مورد نظر، از استوک ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌گرم عصاره حل شده در بافر PBS تهیه شد. میزان بقای سلول‌ها بعد از سپری شدن زمان انکوباسیون به وسیله سنجش فورمازان تولید شده از احیای MTT مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۶).

بررسی اثر حفاظتی عصاره تام بر سمیت القا شده توسط بتا آمیلوئید

سلول‌ها با غلظت ۱۰۴ cell/well در پلیتهای ۹۶ خانه کویت شده با PDL کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت پپتید بتا آمیلوئید با غلظت نهایی ۲۰ میکرومول به محیط کشت اضافه شد. محلول استوک پپتید آمیلوئید با غلظت ۱ میکرومول در آب مقطر تهیه شد. محلول استوک قبل از اضافه شدن به محیط به مدت سه روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد تا فرم تجمع یافته آن تشکیل شود. در گروه‌های تیمار سلول‌ها یک ساعت قبل از اضافه کردن پپتید بتا آمیلوئید با عصاره تام در رنج غلظتی ۱۰۰-۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر انکوبه شدند. میزان بقای سلولی ۲۴ ساعت بعد از اضافه کردن پپتید بتا آمیلوئید مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۷).

سنجش MTT

بعد از اتمام زمان انکوباسیون محیط کشت سلول‌ها با محیط تازه تهیه شده تعویض شد و به هر خانه پلیت ۱۰ میکرولیتر از محلول استوک MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور انکوبه شد. بلورهای فورمازان تولید شده با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) به هر چاهک حل شد. جذب نوری توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۴۰ نانومتر در برابر طول موج رفرانس ۶۳۰ نانومتر خوانده شد (۱۶).

اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید

برای بررسی میزان پراکسیداسیون لیپید جهت ارزیابی استرس اکسایشی از اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدئید (MDA) تولید شده در فرایند لیپید پراکسیداسیون استفاده می‌شود. در این آزمایش سوسپانسیون سلولی حاوی 1×10^6 سلول به هر چاهک از پلیت ۶ خانه‌ای کوت شده به وسیله PDL انتقال داده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط کشت ذکر شده پپتید بتا آمیلوئید اضافه شد. عصاره گیاهی با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلیلیتر یک ساعت قبل از اضافه کردن پپتید بتا آمیلوئید به محیط اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند. برای جدا کردن سلول‌ها از پلیت از محلول ۱۰ EDTA میکرومولار استفاده شد. سپس سلول‌ها به مدت ۲۰ ثانیه در ۴۰ ولت سونیکه شدند. ۱۰ میکرولیتر از هموژنیت سلولی برای تعیین مقدار پروتئین به روش برادفورد برداشته شد (۱۸). به ۱۰۰ میکرولیتر از هموژنیت سلولی ۲۰۰ میکرولیتر واکنشگر تیوباربیتوریک اسید (حاوی ۰/۰۹۲۵ درصد تیوباربیتوریک اسید و ۳/۷۵ درصد تری کلرواستیک اسید) اضافه شد و به مدت ۶۰ دقیقه در دما ۹۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شد تا پیوند بین MDA-TBA ایجاد شود. سپس نمونه‌ها روی یخ قرار داده شدند تا واکنش خاتمه یابد. بعد از سانتریفوژ نمودن نمونه‌ها در ۱۰۰۰ g شدت جذب محلول رویی در طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر اندازه‌گیری شد (۱۹).

اندازه گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز

گلوتاتیون پراکسیداز یکی از اعضای خانواده آنزیم‌های با فعالیت پراکسیدازی می باشد که نقش پراهمیتی در حفاظت موجود زنده از آسیب‌های اکسایشی ایفا میکند. فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز به وسیله کیت اندازه‌گیری شد. این کیت براساس اندازه‌گیری میزان NADPH مصرف شده توسط آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (GR) می‌باشد. آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز باعث اکسید شدن گلوتاتیون احیا (GSH) به گلوتاتیون اکسید (GSSG) می‌شود. گلوتاتیون ردوکتاز به حالت احیا تبدیل می‌شود. در این واکنش میزان مصرف NADPH با فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز متناسب است و میزان NADPH را میتوان از طریق جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری نمود. سلول‌ها با غلظت 1×10^6 سلول به هر چاهک از پلیت ۶ خانه‌ای کوت شده به وسیله PDL انتقال داده شدند و مشابه روش توضیح داده شده برای اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدئید با بتا آمیلوئید و عصاره انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون سلول‌ها با تریپسین از پلیت جدا شده و در ۳۰۰ میکرولیتر بافر PBS حاوی ۱ درصد تریتون X منتقل شدند و هموژنیت سلولی بعد از یک دوره فریز کردن و ذوب نمودن سلول‌ها در دوره ۳۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده شد (۲۰).

اندازه گیری مولکول‌های واکنش دهنده مشتق از اکسیژن

تجمع درون سلولی مولکول‌های واکنش دهنده مشتق از اکسیژن با استفاده از روش ۲'، ۷' دی کلروفلوروسین دیاستات (DA۲-DCFH) اندازه گیری شد. دی کلرو فلوروسین دی استات یک ترکیب غیرفلورسنت میباشد که به راحتی می‌تواند از غشای سلولی عبور کند. این ترکیب به وسیله استرازهای سلولی به ترکیب دی کلروفلوروسین (DCFH) هیدرولیز شده و سپس می‌تواند در حضور گونه‌های فعال اکسیژن به ترکیب دی کلروفلوروسین (DCF) که خاصیت فلورسنت بالایی دارد تبدیل شود. ترکیب دی کلروفلوروسین توانایی خروج از سلول را نداشته و می‌توان این ماده فلورسنت را با استفاده از دستگاه فلوسایتمتری در طول موج تحریکی ۴۸۵ نانومتری و طول موج نشری ۵۲۰ نانومتری اندازه گیری نمود (۲۱). بعد از سپری شدن زمان انکوباسیون سلول‌ها با بتا آمیلوئید و عصاره سلول‌ها توسط تریپسین از پلیت جدا شده به بافر PBS حاوی گلوکز ۵. mM و ۲'، ۷' دی کلروفلوروسین دی استات با غلظت نهایی ۱۰ M منتقل شدند و به مدت ۴۵ دقیقه در این شرایط انکوبه شدند. سپس نمونه‌ها سانتریفوژ شدند و رسوب سلولی در ۱ میلیلیتر بافر PBS معلق شدند. شدت فلورسنت با استفاده از دستگاه فلوسایتمتری اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها:

میانگین آزمایشها به صورت سه بار تکرار انجام شده است و نتایج به صورت درصد کنترل بیان شده است. تجزیه و تحلیل دادهها با استفاده از نرم افزار **Spss** نسخه ۱۶ صورت گرفته و برای مقایسه میانگینهای گروههای مورد مطالعه از تست آماری **one-way ANOVA** استفاده شد.

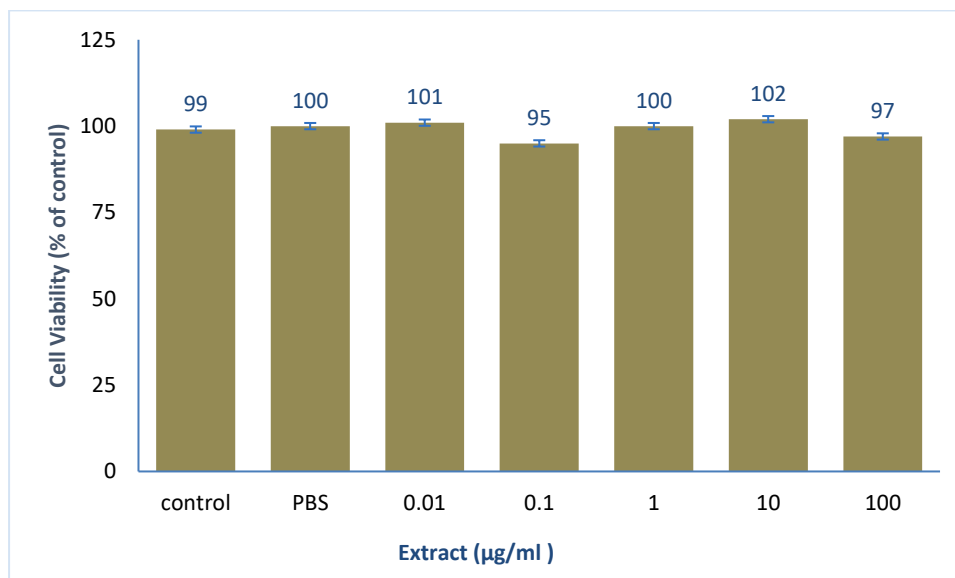
اثر عصاره تام بر روی سلول‌های N2A (Neuro-2A)

نتایج بررسی میزان بقای سلول‌ها بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون با عصاره تام در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. بررسی آماری نشان می‌دهد که هیچ یک از غلظت‌های به کار رفته به طور معنی داری ($p < 0.05$) اثر سمی بر روی سلول‌ها ندارند.

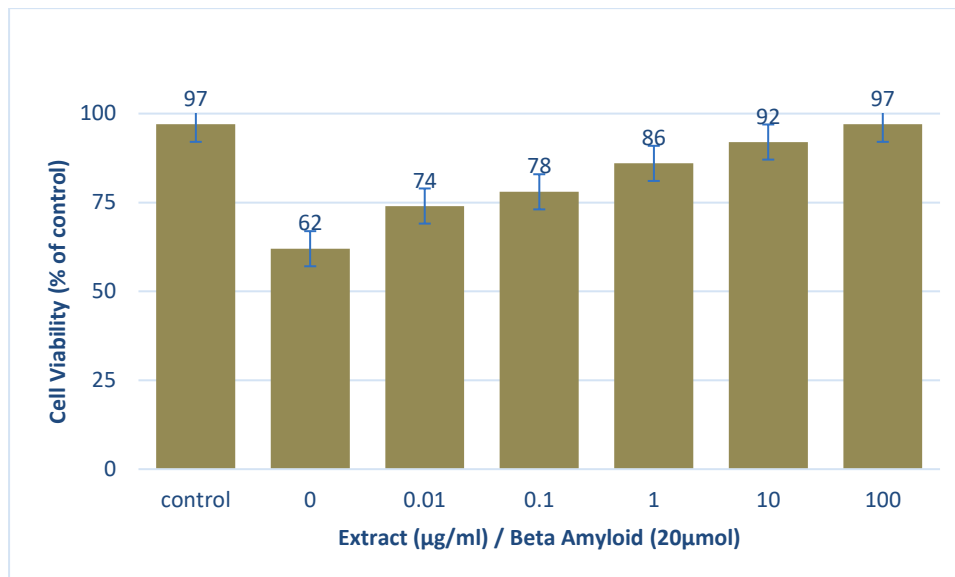
بررسی اثرات حفاظتی عصاره آویشن بر سمیت سلولی ناشی از پپتید بتا آمیلوئید (۲۵-۳۵) در سلول‌های N2A (Neuro-2A) نتایج آزمایشات نشان می‌دهد که پپتید بتا آمیلوئید می‌تواند باعث سمیت بالایی در سلول‌ها شود و میزان زنده‌مانی سلول‌ها را تحت تأثیر آن به طور معنیداری کاهش دهد. با این حال با اضافه کردن عصاره اثر محافظتی آن مشاهده شده است. در غلظت‌های ۱ و ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلیلیتر اختلاف معنیداری نشان نمی‌دهد ولی همگی توانستند کاملاً سلول را در برابر سمیت پپتید بتا آمیلوئید محافظت می‌نماید. EC_{50} محاسبه شده برای این اثر حفاظتی عصاره معادل 0.4 میکروگرم بر میلیلیتر می‌باشد.

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

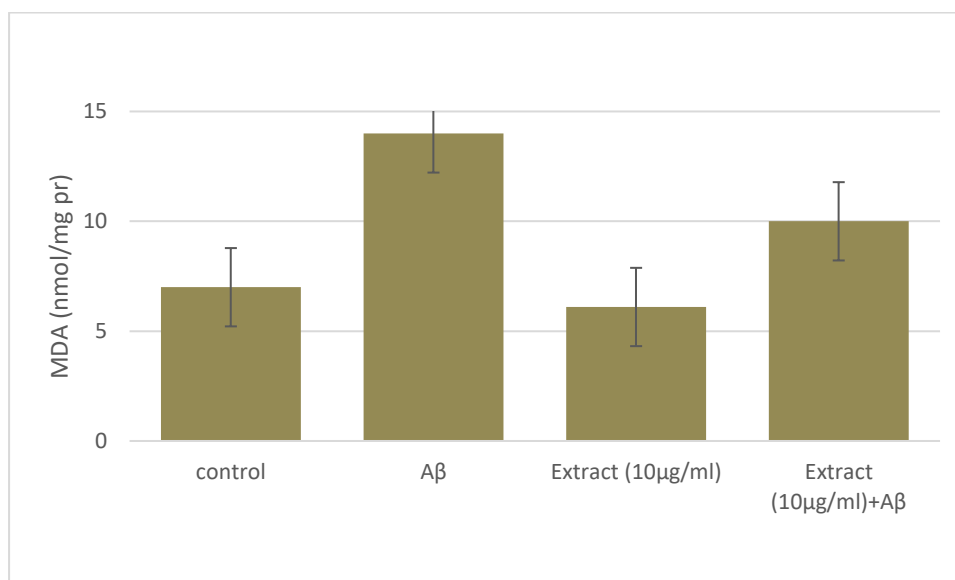
با توجه به نتایج به دست آمده از میزان مالون دی آلدئید میزان پروتئین نمونه‌ها مشخص شد که مالون دی آلدئید در گروهی که در معرض بتا آمیلوئید بودند نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری ($p < 0.001$) دارد و در این گروه نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است. همچنین میزان مالون دی آلدئید در گروهی که فقط در معرض عصاره تام بودند با گروه کنترل تفاوت معنیداری ندارد. این نتایج نشان می‌دهد که عصاره باعث پراکسیداسیون لیپید نمی‌شود و هنگامی که به همراه بتا آمیلوئید به کار می‌رود این توانایی را دارد که از پراکسیداسیون لیپید تولید شده به وسیله بتا آمیلوئید جلوگیری نماید.



نمودار شماره ۱: میزان سمیت عصاره تام گیاه آویشن در سلول‌های N2A (Neuro-2A)



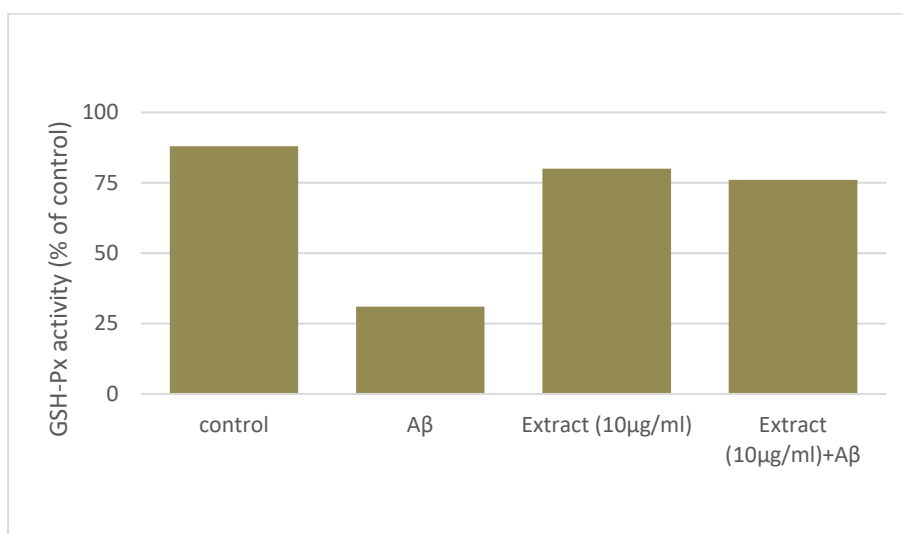
نمودار ۲: اثر عصاره تام آویشن بر سمیت پپتید بتا آمیلوئید در سلولهای N2A (Neuro-2A)



نمودار ۳: اثر عصاره تام آویشن بر پراکسیداسیون لیپید ناشی از پپتید بتا آمیلوئید

بررسی فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در گروه‌های مورد مطالعه

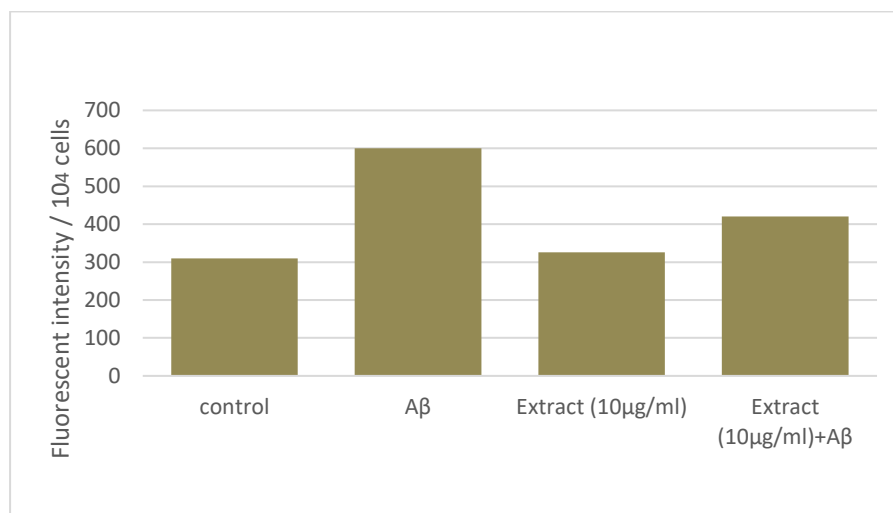
براساس نتایج به دست آمده پپتید بتا آمیلوئید باعث کاهش چشمگیری در فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در سلولهای N2A (Neuro-2A) نسبت به گروه کنترل می‌شود. در حالی که در سلول‌هایی که در معرض عصاره تنها و یا سلول‌های انکوبه شده با بتا آمیلوئید و عصاره بودند میزان فعالیت این آنزیم تفاوت معنی‌داری ندارد. این بدین معناست که عصاره تام گیاه آویشن به تنهایی تاثیری در فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز القا شده به وسیله بتا آمیلوئید ندارد.



نمودار ۴: میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز

نتایج آزمایش اندازه‌گیری گونه‌های فعال اکسیژن

براساس نتایج بدست آمده از آزمایش اندازه‌گیری گونه‌های فعال اکسیژنی، پپتید بتا آمیلوئید باعث افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود. به این ترتیب که مواجهه قبلی با عصاره تام قبل از اضافه کردن پپتید بتا آمیلوئید می‌تواند از افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن القا شده به وسیله این پپتید جلوگیری نماید.



نمودار ۵: مقدار گونه‌های فعال اکسیژن

بحث و نتیجه گیری:

اثر حفاظتی عصاره تام گیاه آویشن در برابر سمیت سلولی القا شده به وسیله پپتید بتا آمیلوئید مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد. عصاره تام این گیاه با غلظت‌های بالاتر از ۱ میکروگرم بر میلیلیتر اثر حفاظتی کاملی ایجاد می‌نماید. پپتید بتا آمیلوئید (۱-۴۱). هسته اصلی پلاک‌های پیری در مغز بیماران آلزایمری می‌باشد و نشان داده شده است که این پپتید در حیوانات آزمایشگاهی و در کشت سلول‌های عصبی سمی است (۲۲). همچنین پپتید بتا آمیلوئید (۲۵-۳۵) (بتا آمیلوئیدی که محتوی محدوده هیدروفیلیک و هیدروفوبیک می باشد) که یک قطعه کوچک‌تر از پپتید بتا آمیلوئید (۱-۴۱) می‌باشد. اثرات سمی مشابه دارد و در مطالعات زیادی از پپتید بتا آمیلوئید (۲۵-۳۵) برای القاء سمیت استفاده شده است (۲۳-۲۱).

یکی از مکانیسم‌های سمیت سلولی پپتید بتا آمیلوئید (۲۵-۳۵) از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو می‌باشد که این مساله در این آزمایش به خوبی نشان داده شده است و با مطالعات قبلی که در این زمینه انجام شده است مطابقت دارد (۲۴، ۲۲). پپتید بتا آمیلوئید (۲۵-۳۵) باعث افزایش گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های N2A می‌شود و فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز را کاهش می‌دهد که نشان دهنده آسیب آنزیم‌های پاد اکسایشی می‌باشد و در نتیجه رادیکال‌های آزاد تولید شده باعث پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود که در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شود. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که میتوان از چندین تغییر آسپیزای القا شده به وسیله پپتید بتا آمیلوئید (۲۵-۳۵) از طریق مواجهه با عصاره تام گیاه آویشن جلوگیری نمود. اگر چنانچه قبل از اضافه کردن پتید بتا آمیلوئید (۳۵-۲۵)، سلول‌های N2A یک ساعت با عصاره تام گیاه مواجهه شده باشند، میزان بقای سلولی آن‌ها در مقایسه با گروه مواجهه شده با پپتید بتا آمیلوئید (۲۵-۳۵) افزایش خواهد یافت. همچنین تولید افزایش یافته گونه‌های فعال اکسیژن ایجاد شده به وسیله پپتید بتا آمیلوئید در پاسخ به مواجهه با عصاره تام گیاهی کاهش می‌یابد. همچنین کاهش فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز ایجاد شده به وسیله پپتید بتا آمیلوئید با مواجهه سلول‌ها با عصاره تام گیاهی قابل جبران است. در نتیجه عصاره گیاه آویشن می‌تواند از طریق جبران توان دفاع پاد اکسایشی سلول و پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن ایجاد شده از آسیب‌های اکسایشی سلول را حفظ نماید که این مسأله با کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدها در گروهی که با پپتید بتا آمیلوئید و عصاره مواجه بودند، نمایان است. این یافته بیانگر این می‌باشد که توانایی حفاظت سلولی مشاهده شده را میتوان به خصوصیت پاداکسایشی این گیاه نسبت داد (۱۲).

این نتایج نشان می‌دهد که عصاره تام گیاه می‌تواند به طور مؤثر از استرس اکسایشی ایجاد شده به وسیله پپتید بتا آمیلوئید (۲۵-۳۵) جلوگیری کرده و نقش مهمی در مسیرهای دفاع سلولی بر علیه استرس اکسایشی در طول فرآیندهای نروژنریتو در بیماری آلزایمر داشته باشد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که عصاره گیاه آویشن خاصیت پاد اکسایشی قوی دارد و قابلیت پاکسازی رادیکال‌های آزاد آنیون سوپر اکسید و نیتریک اکساید را می‌باشد. خاصیت پاداکسایشی این گیاه به ترکیبات فنلی آن نسبت داده می‌شود. ترکیبات فنلی موجود در این گیاه از مشتقات هیدروکسی سینامیک اسید و فلاونوئیدها می‌باشند.

بیشترین ترکیب شناخته شده در این گیاه روزمارینیک اسید و بعد از آن کوماریک اسید و کافئیک اسید می‌باشند. ترکیبات فلاونوئیدی گیاه شامل hesperidin, hesperetin, naringenin, naringin می‌باشد. برای همه این ترکیبات خاصیت پاداکسایشی ذکر شده است (۲۵). برای عصاره این گیاه علاوه بر اثر پاداکسایشی خواص دیگری ذکر شده است که می‌تواند در اثرات نروپروتکتیو این گیاه نقش داشته باشند. عصاره به دست آمده از سر شاخه هوایی این گیاه دارای خصوصیات مهارکنندگی آنزیم استیلکولین استراز می‌باشد (۱۱).

همچنین عصاره این گیاه حاوی اجزایی می باشد که تمایل به اتصال به رسپتورهای نیکوتینی را دارند (۲۶-۲۷). گیرنده های نیکوتینی استیل کولین با بسیاری از عملکردهای مغزی به خصوص فعالیت های ادراکی پیچیده از قبیل دقت، یادگیری، یکپارچگی حافظه، دریافت حواس، کنترل فعالیت های حرکتی، دریافت درد و تنظیم حرارت بدن در ارتباط می باشند (۲۸،۲۹). نقش پاتولوژیک گیرنده های نیکوتینی استیل کولین در بیماری آلزایمر که با از بین رفتن تعداد زیادی از گیرنده ها همراه می باشد به خوبی به اثبات رسیده است (۳۰). مواجهه با آگونیستهای گیرنده نیکوتینی ممکن است نه تنها از طریق تکمیل انتقال بلکه همچنین از طریق حفاظت در برابر سمیت القا شده توسط بتا آمیلوئید باعث بهبود ادراکی شود (۳۱). مطالعات بالینی نشان می دهد که تجویز نیکوتین در بیماران مبتلا به آلزایمر باعث بهبود حافظه و درک می شود (۳۲). در مطالعات *in vitro* دیده شده که نیکوتین اثر محافظتی بر سمیت ناشی از پپتید آمیلوئید بتا دارد. پیش درمانی با نیکوتین باعث کاهش سمیت پپتید آمیلوئید بتا بر روی نورون های کورتیکال کشت داده شده رت می شود و انکوباسیون توأم سلول ها با نیکوتین و آنتاگونیست رسپتورهای نیکوتینی-اثرات حفاظتی نیکوتین بر سمیت ناشی از پپتید آمیلوئید بتا در نورون های کورتیکال کشت داده شده رت را از بین می برد و نشان می دهد که اثرات حفاظتی نیکوتین از طریق رسپتورهای نیکوتینی اعمال می شود (۳۳). پپتید آمیلوئید بتا در نورون های هیپوکامپ کشت داده شده رت باعث القا آپاپتوز از طریق افزایش میزان تولید گونه های فعال اکسیژن و فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ می شود. این مطالعه نشان می دهد تحریک رسپتورهای نیکوتینی باعث مهار استرس اکسایشی و القا آپاپتوز توسط پپتید آمیلوئید بتا در نورون های هیپوکامپ کشت داده شده رت می شود (۳۴). با توجه به مطالعات ذکر شده میتوان فرض کرد که عصاره گیاه آویشن با داشتن ترکیباتی که آگونیست گیرنده نیکوتینی هستند. اثرات حفاظتی خود را اعمال می کند که البته این فرضیه نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

همانطور که ذکر شد مهم ترین ترکیبی که در عصاره گیاه وجود دارد رزمارینیک اسید می باشد. رزمارینیک اسید یک ترکیب فنلی ساده است که فعالیت پاد اکسایشی دارد. این ترکیب خاصیت پاکسازی رادیکال های اکسیژن و رادیکال بسیار فعال پروکسی نیتريت را دارد و در مطالعه صورت گرفته مشخص شده است که رزمارینیک اسید اثر محافظی در برابر سمیت سلولی ناشی از پپتید بتا آمیلوئید ایجاد می کند. از جمله ترکیبات فنلی دیگر که در گیاه یافت می گردد ترکیب کافیک اسید می باشد. این ترکیب دارای اثرات پاداکسایشی بوده و قادر است که از اثرات سمی بتا آمیلوئید جلوگیری می نماید. به علاوه در تحقیقات صورت گرفته مشخص شده است. مهار ورود کلسیم یکی از مکانیسم های اصلی است که در حفاظت از سلول توسط شده القا سمیت برابر در عصبی های پپتید بتا آمیلوئید اعمال می کند. همچنین به خوبی مشخص شده است که این ترکیب قادر است که از فسفوریلاسیون جلوگیری نماید (۳۶). علاوه بر ترکیبات ذکر شده فوق که اثرات نروپروتکتیوی آنها مطالعه شده است عصاره گیاه بادرنجبویه حاوی ترکیبات متعددی می باشد که اثرات نروپروتکتیوی آنها مطالعه نشده است و هر کدام می توانند در اثر حفاظتی دیده شده از عصاره این گیاه در این مطالعه نقش داشته باشند. گرچه اثرات سینرژیکی احتمالی این ترکیبات هم دور از انتظار نمی باشد و نیاز به مطالعه بیشتر در این زمینه می باشد.

پیشنهادهات:

در ادامه این مطالعه پیشنهاد میشود بر روی موضوع تأثیرات عصاره آویشن بر بهبود علائم بیماری آلزایمر در مدل های موشی مطالعه ادامه یابد و همچنین میتوان دیگر شاخصهای بیوشیمیایی خون را در ارتباط با آلزایمر مورد بررسی قرار داد.

فهرست منابع:

۱. محسنی، ایمان، پیری، مقصود، & آذربایجانی. (۲۰۲۰). اثر تمرین هوازی و عصاره هیدرومتانلی مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) بر حافظه، بیان CREB و BDNF در آلزایمر القا شده با بتا آمیلوئید. فصلنامه علمی پژوهشی گیاهان دارویی (119-132)
۲. عمرانی شکوفه، ژبانی راحله، & دولت آبادی سمانه. (۲۰۱۵). سنجش اثرات آنتی اکسیدانی و محافظتی گیاه بادرشبو (*Dracocephalum moldavica*) بر سمیت القاء شده توسط پپتید بتا آمیلوئید در سلول‌های PC12
3. Dastmalchia K, Damien Dormana HJ, Pa"ivi P. Oiononena, Darwisd Y, Into Laaksoa, Hiltunena R. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract, LWT, 2008; 41: 391 – 400.
4. Lucio G. Costa, Ernest Hodgson, David A. Lawrence; Terence R. Ozolins, Reed DJ and Greenlee WF. Assessment of Cell Toxicity, Measurement of Lipid Peroxidation, Current Protocols in Toxicol. John Wiley & Sons Inc. 1999, Chapter 2, Section 4, pp: 3 – 5.
5. Pereira RP, Fachinetto R, de Souza Prestes A, Puntel RL, Santos da Silva GN, Heinzmann BM, Boschetti TK, Athayde ML, Bürger ME, Morel AF, Morsch VM, Rocha JB. Antioxidant Effects of Different Extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citrates*. Neurochem. Res. 2008; 34: 973 - 83.
6. Akhondzadeh S, Noroozian M, Mohammadi M, Ohadinia S, Jamshidi AH and Khani M. *Melissa officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and disease brain. A Review. Free Radic Res. 2002; 36: 1307 - 13.
7. Aliev G, Obrenovich ME, Reddy VP, Shenk JC, Moreira PI, Nunomura A, Zhu X, Smith MA, Perry G. Antioxidant therapy in Alzheimer's disease: theory and practice. Mini Rev Med Chem. 2008; 8 (13): 1395 - 406.
8. Blennow K, de Leon MJ and Zetterberg H. Alzheimer's disease. Lancet 2006; 368: 387 – 403.
9. Blumenthal M, Lemon Balm Monograph. The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines. 1st ed. American Botanical Council, 1998, pp: 160 – 1.
10. Butterfield AD, Drake J, Pocernich C and Castegna A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid β -peptide. TRENDS in Molecular Medicine 2001; 7: (12): 548 - 54.
11. Butterfield DA. Beta-Amyloid-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. Chem. Res. Toxicol. 1997; 10: 495 – 506.
12. Carreiras MC and Marco JL. Recent approaches to novel anti-Alzheimer therapy. Curr Pharm Des. 2004; 10: 3167 - 75.
13. Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. Am. J. Clin. Nutr. 2000; 71: 621 – 9.
14. Committee of Iranian Herbal Pharmacopoeia. Iranian Herbal Pharmacopoeia. Ministry of Health and Medical Education. Tehran, 2002, p: 24.
15. Dan Qiao, Frederic J. Seidler, Theodore A. Slotkin, Oxidative mechanisms contributing to the developmental neurotoxicity of nicotine and chlorpyrifos. Toxicology and Applied Pharmacology 2005; 206: 17 – 26.
16. Dastmalchi K, Ollilainen V, Lackman P, af Gennäs BG, Dorman HJ, Järvinen PP, YliKauhaluoma J, Hiltunen R. Acetylcholinesterase inhibitory guided fractionation of *Melissa officinalis* L. Bio. & Med. Chem. 2009; 17: 867 – 71.
17. Glutathione Peroxidase Assay Kit, BioVision Research Products.

18. Hardy J and Dennis J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* 2002; 297 (5580): 353 - 6.
19. Jeyakumar, M., Sathya, S., Gandhi, S., Tharra, P., Aarthy, M., Balan, D. J., & Devi, K. P. (2022). α -bisabolol β -D-fucopyranoside inhibits β -amyloid (A β) 25–35 induced oxidative stress in Neuro-2a cells via antioxidant approaches. *Process Biochemistry*, 121, 493-503.
20. Kumju, Youn., Mira, Jun., Mira, Jun. (2020). Geraniin Protects PC12 Cells Against A β 25–35-Mediated Neuronal Damage: Involvement of NF- κ B and MAPK Signaling Pathways. *Journal of Medicinal Food*, doi: 10.1089/JMF.2019.4613
21. Lane RM, Kivipelto M and Greig NH. Acetylcholinesterase and its inhibition in Alzheimer disease. *Clin. Neuropharmacol.* 2004; 27: 141 - 9.
22. Liangjing, Liu., Yang, Liu., Ya-Qin, Zhen., Tonglin, Guo., Cuilan, Wang., Lixia, Shen., Wei, Li. (2022). Quercetin inhibits cytotoxicity of PC12 cells induced by amyloid-beta 25–35 via stimulating estrogen receptor α , activating ERK1/2, and inhibiting apoptosis. *Central European Journal of Biology*, doi: 10.1515/biol-2021-0014
23. Mrlanova MD. Tekelova M, Felklova J, Toth P Musil and Grancai D. Comparison of the quality of *Melissa officinalis* L. cultivar Citra with Mellissas of European origin. *Pharmacopsychiatry* 2001; 34: 20 - 21.
24. Qiu xiao X, Wang R, Fan Han Y, Tang XT. Protective effect of huperzine A on beta – amyloid25-35 induced oxidative injury in rat pheochromocytoma cells. *Neuroscience letters* 2005; 286: 155 - 58.
25. Schliebs R. Basal forebrain cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease: interrelationship with beta-amyloid, inflammation and neurotrophin signaling. *Neurochem. Res.* 2005; 30: 895 - 908.
26. Xiong, H.; Nie, X.; Zou, Y.; Gong, C.; Li, Y.; Wu, H.; Qiu, H.; Yang, L.; Zhuang, L.; Zhang, P.; et al. Twist1 enhances hypoxia induced radioresistance in cervical cancer cells by promoting nuclear EGFR localization. *J. Cancer* 2017, 8, 345–353.
27. Schmidtke, T.; White, D.; Woolard, C. Oxygen release kinetics from solid phase oxygen in Arctic Alaska. *J. Hazard. Mater.* 1999, 64, 157–165.
28. Shen, M.; Jiang, Y. Z.; Wei, Y.; Ell, B.; Sheng, X.; Esposito, M.; Kang, J.; Hang, X.; Zheng, H.; Rowicki, M.; et al. Tinagl1 suppresses triple-negative breast cancer progression and metastasis by simultaneously inhibiting integrin/FAK and EGFR signaling. *Cancer Cell* 2019, 35, 64–80.
29. Vaupel, P.; Mayer, A. Hypoxia in cancer: Significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* 2007, 26, 225–239.
30. Wang, R.; Zhang, P.; Li, J.; Guan, H.; Shi, G. Ubiquitination is absolutely required for the degradation of hypoxia-inducible factor-1 alpha protein in hypoxic conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016, 470, 117–122
31. Weihua, Zhuang., Ping, Tan., Shufen, Li., Chengming, Li., Jiapeng, Zhang., Jianzhong, Ai., Lu, Yang., Gaocan, Li., Qiang, Wei., Mao, Chen., Yunbing, Wang. (2021). A lipid droplet specific fluorescent probe for image-guided photodynamic therapy under hypoxia. *Journal of Materials Chemistry B*, doi: 10.1039/D1TB01995C
32. White, E. The role for autophagy in cancer. *J. Clin. Invest.* 2015, 125, 42–46
33. Xue-Lian, Meng., Song-Yao, Liu., Jingping, Xue., Jiang, Gou., Dan, Wang., Hongsheng, Liu., Chang-Lan, Chen., Cheng-Bin, Xu. (2022). Protective effects of Liensinine, Isoliensinine, and Neferine on PC12 cells injured by amyloid- β . *Journal of Food Biochemistry*, doi: 10.1111/jfbc.14303
34. Yang, Y.; Yang, Y.; Yang, X.; Zhu, H.; Guo, Q.; Chen, X.; Zhang, H.; Cheng, H.; Sun, X. Autophagy and its function in radiosensitivity. *Tumour Biol.* 2015, 36, 4079–4087[.

35. Yuan, Liu., Tingting, Pi., Xiaohui, Yang., Jingshan, Shi. (2021). Protective Effects and Mechanisms of *Dendrobium nobile* Lindl. Alkaloids on PC12 Cell Damage Induced by A β 25-35. Behavioural Neurology, doi: 10.1155/2021/9990375
36. Yu-song GE, Wei-ya T and Chao-dong Z. Protective effect of cyclophilin A against Alzheimer's amyloid beta-peptide (25-35) -induced oxidative stress in PC12 cells. Chin. Med. J. 2009; 122: 716 – 24.