بررسی اثر آنتی استیل کولین استرازی و توکسیسیتی عصاره آبی اسطوخدوس روی رده سلولی HepG2 کبدی انسانی

مسعود سهیلی [۱](Ph.D)، مصطفی رضایی طاویرانی [۲](Ph.D)، محمود سلامی [*۳](Ph.D)

۱- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

چکیده

هدف: اسطوخدوس از جمله گیاهان عطری خانواده نعناییان می‌باشد که دارای اثرات درمانی مختلف می‌باشد. نقش عصاره آبی این گیاه دارویی در بهبود یادگیری و حافظه موش‌های صحرایی آلزایمری به اثبات رسیده است. در بیماری آلزایمر کاهش میزان استیل‌کولین در نتیجه فعالیت زیاد آنزیم استیل‌کولین استراز از جمله عوامل ایجاد بیماری می‌باشد. در این مطالعه اثر آنتی استیل‌کولین استرازی عصاره آبی اسطوخدوس و نیز توکسیسیتی آن روی رده سلولی HepG2 کبدی به منظور یافتن روش احتمالی درمانی برای بیماری آلزایمر مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: عصاره آبی گیاه با استفاده از قرار دادن سرشاخه‌های خشک گیاه درون آب جوش و تغلیظ به روش بن‌ماری تهیه شد. اثر مهاری عصاره بر آنزیم استیل‌کولین استراز با استفاده از روش المان در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه و با اندازه‌گیری جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر بررسی شد. هم‌چنین توکسیسیتی عصاره مذکور روی رده سلولی HepG2 مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: مقایسه نمودار تغییر جذب محلول‌های مختلف در حضور یا عدم حضور عصاره نشان می‌دهد که عصاره آبی اسطوخدوس هیچ‌گونه اثر مهاری بر فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز ندارد. در ضمن بررسی مورفولوژی سلول‌ها زیر میکروسکوپ در حضور و عدم حضور عصاره و نیز چسبندگی سلول‌ها به فلاسک و عدم تشکیل گرانولاسیون، نشان می‌دهد که عصاره آبی اسطوخدوس در غلظت‌های مختلف هیچ‌گونه اثر سیتوتوکسیسیته‌ای ندارد.

نتیجه‌گیری: عصاره آبی اسطوخدوس فاقد هر گونه اثر سیتوتوکسیسیته و مهارکنندگی آنزیم استیل‌کولین استراز می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آلزایمر، اسطوخدوس، سیتوتوکسیسیته، استیل‌کولین استراز

مقدمه

اسطوخدوس گیاهی درختچه‌ای، خوشبو و با طعم تلخ است که در عطر درمانی مورد استفاده گسترده قرار گرفته است [۱]. این گیاه از نظر فیتوشیمی به‌طور وسیع مورد مطالعه قرار گرفته است، اما جنبه‌های درمانی آن هنوز کامل مورد بررسی قرار نگرفته است. این گیاه می‌تواند در درمان برخی بیماری‌های وابسته به دستگاه عصبی مرکزی مثل آلزایمر در مدل‌های حیوانی موثر باشد [۳،۲]. لینالول از جمله ترکیبات

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۳۶۱۲۹۲۰

Email: salami-m@kaums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۷/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۱۸

موجود در اسانس اسطوخدوس است که دارای خواص بیولوژیکی متفاوت از جمله اثر آرام‌بخشی می‌باشد [۵،۴]. ما در مطالعات قبلی خود نشان دادیم که عصاره آبی اسطوخدوس سبب بهبود یادگیری و حافظه حیوانات آلزایمری می‌شود [۶]. از جمله علائم بیماری آلزایمر که در مطالعات مختلف انجام شده بر روی انسان [۷] و مدل‌های حیوانی نشان داده شده است اختلال یادگیری و تشکیل حافظه [۹،۸] و نیز ناتوانی در حرکت و عدم کنترل فرد می‌باشد [۱۰]. Younghee Kim و همکارانش اثر اسانس اسطوخدوس بر افزایش قدرت حرکتی و تعادلی حیوانات در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند [۱۱]. دکتر حاج هاشمی و همکارانش اثر ضدالتهابی عصاره‌های آبی- الکلی و پلی‌فنولی و نیز اسانس این گیاه را اثبات کردند [۱۲]. هم‌چنین مطالعات نشان می‌دهد که اسطوخدوس سبب پاک‌سازی پلاک‌های آمیلوئیدی- که از مهم‌ترین عوامل ایجاد بیماری آلزایمر می‌باشند- از بافت مغز می‌شود [۱۳]. عوامل مختلفی در بروز آلزایمر دخالت دارند از جمله عوامل التهابی، استرس‌های اکسیداتیو و کاهش استیل‌کولین [۱۵،۱۴]. آنالیز محتوای نوروترانسمیترها در کورتکس مغز مبتلایان به آلزایمر نشان داد که محتوای استیل‌کولین کاهش پیدا کرده است [۱۷،۱۶]. استیل‌کولین از جمله نوروترانسمیترهای موجود در مغز می‌باشد که در انتقال پیام دخالت دارد [۱۸]. کاهش میزان این نوروترانسمیتر در نتیجه فعالیت زیاد آنزیم استیل‌کولین استراز و یا کاهش میزان گیرنده‌های آن می‌تواند در بیماری آلزایمر نقش داشته باشد [۲۰،۱۹]. در حال حاضر از جمله درمان‌های موثر در جلوگیری از پیشرفت بیماری آلزایمر داروهای ممانعت‌کننده از فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز می‌باشند. دونپزیل و ریواستیگمین از جمله مهارکننده‌های انتخابی استیل‌کولین استراز در سیستم اعصاب مرکزی هستند که روی بافت‌های محیطی اثر کمی دارند [۲۱] و در درمان بیماری آلزایمر و تقویت حافظه اثر دارند [۲۳،۲۲]. داروهای مذکور علاوه بر کارایی آن‌ها در ممانعت از پیشرفت بیماری، به‌دلیل ماهیت شیمیایی که دارند عوارض جانبی زیادی به‌دنبال خواهند داشت. گیاهان با دارا بودن اثر چندگانه و نیز اثرات جانبی کم‌تر می‌تواند در درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرد. در مطالعه حاضر قصد داریم تا امکان وجود مهارکننده‌های آنزیم استیل‌کولین استراز در عصاره آبی اسطوخدوس را با استفاده از روش المان به منظور یافتن مکانیسم اثر احتمالی آن مورد بررسی قرار دهیم. به‌دلیل آن‌که کبد جایگاه اصلی متابولیسم داروها به‌شمار می‌رود و آثار سمیت عوامل اگزوژن در این اندام حیاتی نمود بیش‌تری دارد در ادامه نقش سمیتی عصاره آبی اسطوخدوس بر سلول‌های رده HepG2 کبدی مربوط به کاسینومای انسانی نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی و استخراج عصاره. اسطوخدوس از پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهیه شد. این گونه از گیاه مورد تایید دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بوده و دارای کد هرباریوم ۱۰۹۲ می‌باشد. بعد از جداسازی، شستشو و خشک کردن سرشاخه‌های گیاه، ۲۵۰ گرم از سرشاخه‌های خشک شده گیاه درون ظرف محتوی ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب جوش ریخته شد و درب ظرف برای مدت ۴ ساعت محکم بسته شد. در مرحله بعد محتوای ظرف فیلتر شد و مایع باقی‌مانده به روش بن‌ماری تغلیظ شد. در نهایت ماده‌ی به‌دست آمده را با استفاده از فریز درایر به پودر تبدیل کردیم.

مواد شیمیایی. استیل تیو کولین یداید و آنزیم استیل کولین استراز به‌دست آمده از اریتروسیت‌های گاوی از شرکت سیگما خریداری شد. اتانول، دی متیل سولفوکساید (DMSO) و دیگر محلول‌های آلی نیز از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

رده سلولی. رده سلولی مورد استفاده در این آزمایش مربوط به سلول‌های کارسینومای کبد انسانی و با نام اختصاری HepG2 بود که از انستیتوپاستور تهیه شد. در این مطالعه رده سلولیHepG2 در محیط مناسب دارای FBS، دمای ۳۷ درجه به‌همراه رطوبت و فشار اتمسفر ۵ درصد برای

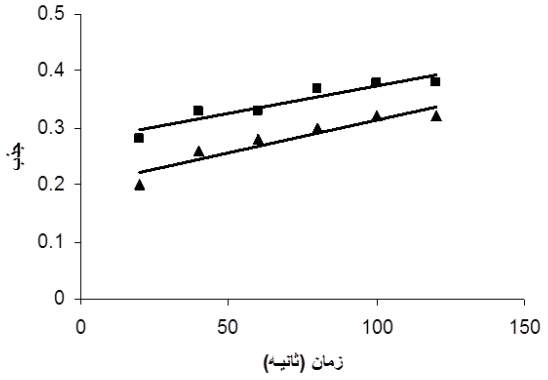
رشد قرار داده شد. عصاره آبی اسطوخدوس در غلظت‌های مختلف از ۳/۱۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای مدت ۲۴ ساعت روی سلول‌ها اثر داده شد و در نهایت منحنی رشد سلول‌های دریافت‌کننده عصاره در مقایسه با گروه سالم رسم شد.

آنالیز مهارکنندگی آنزیم استیل‌کولین استراز. فعالیت مهارکنندگی آنزیم استیل‌کولین استراز به روش المان و با استفاده از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه سنجیده شد. در این روش آنزیم استیل‌کولین استراز با هیدرولیز سوبسترای خود که همان استیل‌کولین می‌باشد سبب تشکیل تیوکولین می‌شود. تیوکولین نیز با ماده شاخص المان واکنش داده و موادی به نام ۵-تیو ۲-نیترو بنزوات و ۲-نیتروبنزوآت ۵-مرکاپتوتیوکولین تولید می‌شود که در طول موج ۴۰۵ نانومتر قابل مشاهده می‌باشد. درون خانه‌های میکروپلیت مقدار ۲۵ میکرولیتر استیل‌کولین یودید، ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات با pH برابر ۸ و ۲۵ میکرولیتر عصاره حل شده در اتانول (۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) ریخته شد. سپس جذب چاهک‌ها هر ۱۳ثانیه و برای مدت ۶۵ ثانیه در ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس ۲۵ میکرولیتر از آنزیم استیل‌کولین استراز به میزان ۰/۲۲ واحد در میلی‌لیتر به خانه‌های میکروپلیت اضافه شد و مجدداً جذب هر خانه هر ۱۳ ثانیه و به مدت ۱۰۴ ثانیه اندازه‌گیری شد. منحنی جذب در مقابل زمان رسم شد و میزان فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز با استفاده از شیب خط محاسبه شد. هر گونه افزایش در جذب به سبب هیدرولیز غیر آنزیماتیکی سوبسترا با استفاده از فرمول (میزان واکنش قبل از اضافه کردن آنزیم) تصحیح شد.

آنالیز آماری. در این مطالعه از آزمون آماری ANOVA یک‌طرفه به‌همراه تست تکمیلی LSD جهت آنالیز داده‌های به‌دست آمده استفاده شد و مقدار P-value کم‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

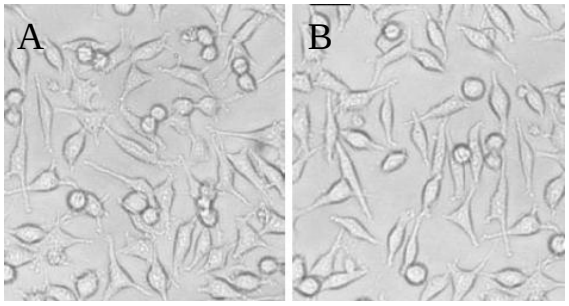
فعالیت مهارکنندگی آنزیم استیل‌کولین استراز. جهت بررسی میزان اثربخشی عصاره اسطوخدوس بر فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز از کیت اختصاصی در محیط In vitro استفاده گردید. بر پایه نتایج حاصل مشخص گردید که ترکیبات موجود در عصاره آبی سرشاخه‌های اسطوخدوس در غلظت ppm ۳۰۰ اثر قابل توجهی روی مهار فعالیت آنزیم متابولیزه‌کننده استیل‌کولین از خود نشان نمی‌دهد ($P=0/21$، $F_{(3,11)}=0/368$). به‌علاوه نمودار تغییر جذب عصاره در برابر زمان جهت بررسی میزان اثربخشی عصاره رسم گردید. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است منحنی تغییرات جذبی در حضور و عدم حضور عصاره در طول زمان به موازات هم و با اختلاف ناچیز پیش رفته است. این موضوع بیانگر آن است که عصاره آبی گیاه دارویی اسطوخدوس در غلظت مورد استفاده بر فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز اثری نداشته است.



شکل ۱. بررسی اثر آنتی استیل کولین استرازی عصاره آبی اسطوخدوس در غلظت ppm ۳۰۰ بر پایه جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر. عصاره آبی اسطوخدوس بر مهار فعالیت آنزیم استیل کولین استراز اثر معنی داری نداشته است.

فعالیت سیتوتوکسیسیتی. به‌منظور بررسی اثر سیتوتوکسیسیتی عصاره آبی اسطوخدوس بر سلول‌های رده HepG2 کبدی، ارزیابی مورفولوژیکی سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در این روش سلول‌ها در محیط کشت مناسب به

همراه رطوبت و CO2 لازم کشت داده شدند و غلظت‌های مختلف عصاره اسطوخدوس از ۳/۱۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای مدت ۲۴ ساعت به چاهک‌های حاوی سلول اضافه شد. در نهایت سلول‌های تیمار شده با عصاره گیاه به‌صورت چشمی و با استفاده از میکروسکوپ با سلول‌های تیمار نشده مقایسه شدند. نتیجه این بررسی نشان می‌دهد که غلظت‌های مختلف عصاره آبی اسطوخدوس تغییر محسوسی را در شکل ظاهری سلول‌های تیمار شده با عصاره در مقایسه با گروه شاهد ایجاد نکرده‌اند. هم‌چنین بررسی مورفولوژیکی آن‌ها نشان می‌دهد که سلول‌های تیمار شده مانند سلول‌های گروه کنترل به طور کامل و طبیعی به بستر فلاسک چسبیده‌اند. هم‌چنین این سلول‌ها شکل طبیعی خود را حفظ کرده و گرانولاسیون سلولی نیز در آن‌ها مشاهده نشد (شکل ۲). نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که عصاره آبی اسطوخدوس هیچ‌گونه فعالیت سیتوتوکسیسیتی روی رده سلولی HepG2 کبدی ندارد.



شکل ۲. A سلول های رده سلولی HepG2 گروه شاهد و B سلول های رده سلولی HepG2 تیمار شده با عصاره آبی اسطوخدوس. سلول های تیمار شده با عصاره در مقایسه با گروه شاهد از نظر مورفولوژیکی هیچ تغییری نکرده اند و عصاره اثر سیتوتوکسیکی نداشته است.

بحث و نتیجه‌گیری

با افزایش سن بروز بیماری‌های نورودژنراتیو به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد. یکی از پدیده‌های شایع در سنین کهنسالی دمانس است که در برخی افراد مسن به‌صورت بیماری آلزایمر بروز می‌یابد [۲۴]. با توجه به نقش مدارهای عصبی کولینرژیک در پدیده‌های شناختی توجه محققین روی عمل‌کرد استیل‌کولین و عوامل کاهنده و افزاینده سیناپسی آن معطوف شده است. به همین دلیل نقش داروهای مهارکننده آنزیم استیل‌کولین استراز در ممانعت از پیشرفت این بیماری و یافتن داروهای جدید و موثر در مهار این آنزیم از اهمیت زیادی برخوردار است [۲۵،۲۰]. از جمله گیاهان دارویی که اثرات موثر بیولوژیکی آن به اثبات رسیده است اسطوخدوس می‌باشد. از آن‌جا که کبد یکی از اندام‌های مهم و جایگاه اصلی متابولیسم داروهای شیمیایی در بدن می‌باشد در بیش‌تر مطالعات برای سنجش فعالیت توکسیسیتی عوامل مختلف از رده سلولی HepG2 که مربوط به کارسینومای کبد انسانی می‌باشد استفاده شده است. مطالعات مختلفی به منظور بررسی اثر سیتوتوکسیسیتی عوامل مختلف روی رده سلول HepG2 انجام شده است [۲۷،۲۶]. دانشمندان تایوانی با اثر دادن عصاره برگ زیتون روی این رده سلولی دریافتند که عصاره برگ درخت زیتون اثر مهارکنندگی روی رشد سلول‌ها داشته است [۲۸]. در این مطالعه نیز ابتدا اثر سمیتی عصاره بر رده سولی کبدی HepG2 مورد بررسی قرار گرفت. ما یافتیم که عصاره آبی این گیاه داروئی اثر سمیتی روی سلول‌های رده HepG2 نداشته است و تغییر مورفولوژیکی در سلول‌ها دیده نمی‌شود. این یافته می‌تواند تضمین کند که حداقل در دوزهای مورد استفاده در این تحقیق مشکلی در استفاده از عصاره اسطوخدوس به‌عنوان گیاه داروئی وجود ندارد. با توجه به یافته‌های قبلی مبنی بر اثر بهبوددهنده اسطوخدوس در یادگیری و حافظه و نیز اثر بر بیان پروتئین‌ها، برای یافتن مکانیسم اثر احتمالی عصاره روی مهار آنزیم استیل‌کولین استراز مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات مختلفی برای بررسی عوامل مختلف بر مهار این آنزیم از طریق انجام تست DPPH انجام شده است. Lehrner و همکارانش در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که اسانس پرتقال و اسطوخدوس به‌عنوان یک مهارکننده قوی آنزیم استیل‌کولین استراز عمل می‌کند [۲۹]. هم‌چنین Adserson و همکارانش اثر مهارکنندگی اسانس اسطوخدوس در غلظت‌های مختلف روی آنزیم استیل‌کولین استراز را از طریق انجام تست‌های مختلف به اثبات رساندند [۳۰]. در مطالعه دیگری روی گیاهان معطر

منطقه مدیترانه مشخص شد که برخی گونه‌ها دارای اثر مهارکنندگی روی آنزیم و در نتیجه افزایش میزان استیل‌کولین می‌باشند [۳۱]. نتایج حاصل از تست المان در این مطالعه بیانگر آن است که عصاره آبی اسطوخدوس اثر مهارکنندگی معنی‌داری بر آنزیم استیل‌کولین استراز نداشته است. به‌نظر می‌آید تفاوت در اثربخشی اسطوخدوس روی عملکرد سیستم کولینرژیک حداقل بخشی به‌دلیل نحوه عصاره‌گیری باشد زیرا مطالعاتی که این گیاه را موثر دانسته‌اند از عصاره‌های کلروفرمی، اتیل استاتی و متانولی آن استفاده کرده‌اند که در مورد برخی دیگر از گیاهان موثر بر عملکرد سیستم کولینرژیک نیز صدق می‌کند [۳۳،۳۲]. این‌که چه ترکیباتی در اسانس وجود دارد که در عصاره آبی نیست نیاز به انجام آزمایشات کروماتوگرافی و مقایسه ترکیبات آن‌ها دارد.

به‌نظر می‌آید که نوع عصاره مورد استفاده در تحقیقات مختلف به‌طور قابل توجهی اثربخشی آن را تحت تاثیر قرار می‌دهد و تفاوت در اثرات آنتی کولین استرازی عصاره این داروی گیاهی نتیجه همین اختلاف در عصاره‌گیری است. با توجه به اثرات گزارش شده تقویت‌کنندگی حافظه توسط اسطوخدوس به‌نظر می‌رسد که مکانیسم عملکردی عصاره آبی آن متفاوت با سایر عصاره‌ها و از مسیری غیر از مسیر سیستم کولینرژیک باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از طرح تحقیقاتی مصوب شورای پژوهشی کمیته پژوهشی دانشجویان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به شماره ثبت ۴۴۲۳۴/ص/۱۳۹۴ مورخ ۹۴/۱۲/۱۷ بوده است. هم‌چنین نویسندگان مقاله از خانم مهندس عبایی به خاطر همکاری‌های ایشان در انجام این پروژه تحقیقاتی کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

منابع

[1] Lin PW, Chan WC, Ng BF, Lam LC. Efficacy of aromatherapy (Lavandula angustifolia) as an intervention for agitated behaviours in Chinese older persons with dementia: a cross-over randomized trial. Int J Geriatr Psychiatry 2007; 22: 405-10.

[2] Soheili M, Salami M, Haghir A, Zali H, Rezaei Tavirani M. Aqueous Extract of Lavandula Angustifolia Alter Protein Expression in Alzheimer Rats. J Rep Pharm Sci 2014; 3: 1-9.

[3] Soheili M, Rezaei Tavirany M, Salami M. Lavandula angustifolia extract improves deteriorated synaptic plasticity in an animal model of Alzheimer's disease. Iranian Journal of Basic Medical Sciences 2015; 18: 1147-52.

[4] Adam JN SA, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antifungal activities of Origarnum vulgare subsp. Hirtum, Mentah spicata, Lavandula angustifolia and Salvia fruticose essential oils against human pathogenic fungi. J Agric Food Chem 1998; 46: 1739-45.

[5] Dorman HJP DS, Noble RC. Evaluation in vitro of plant essential oils as natural antioxidants. J Essent Oil Res 1995; 7: 645- 51.

[6] Kashani MS, Tavirani MR, Talaei SA, Salami M. Aqueous extract of lavender (Lavandula angustifolia) improves the spatial performance of a rat model of Alzheimer's disease. Neurosci Bull 2011; 27: 99-106.

[7] Akbari E, Asemi Z, Daneshvar Kakhaki R, Bahmani F, Kouchaki E, Tamtaji OR, Hamidi GA, Salami M. Effect of Probiotic Supplementation on Cognitive Function and Metabolic Status in Alzheimer's Disease: A Randomized, Double-Blind and Controlled Trial. Frontiers in aging neuroscience 2016; 8: 256.

[8] Horner AJ, Gadian DG, Fuentemilla L, Jentschke S, Vargha-Khadem F, Duzel E. A Rapid, Hippocampus-Dependent, Item-Memory Signal that Initiates Context Memory in Humans. Curr Biol 2012; 22: 2369-2374.

[9] Taghizadeh M, Talaei SA, Djazayeri A, Salami M. Vitamin D supplementation restores suppressed synaptic plasticity in Alzheimer's disease. Nutritional Neuroscience 2014; 17: 172-177.

[10] Friedland RF, T. Smyth, K. Koss, E. Lerner, A. Chen, C. et al. Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in midlife compared with healthy control-group members. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2004; 98: 3440-5.

[11] Younghee Kim MK, Hyunji Kim, Kisok Kim. Effect of lavender oil on motor function and dopamine receptor expression in the olfactory bulb of mice. J Ethnopharmacol 2009; 125: 31-35.

[12] sharif VHAGB. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of Lavandula angustifolia Mill. J Ethnopharmacol 2003; 89: 67-71.

[13] Soheili M, Tavirani MR, Salami M. Clearance of Amyloid Beta Plaques from Brain of Alzheimeric Rats by Lavandula angustifolia. Neurosci Medicine 2012; 3: 362-367.

[14] Mathew A, Yoshida Y, Maekawa T, Sakthi Kumar D. Alzheimer's disease: Cholesterol a menace? Brain Res Bull 2011; 86: 1-12.

[15] Selkoe DJ. Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. Physiol Rev 2001; 81: 741-766.

[16] Wu MN, He YX, Guo F, Qi JS. Alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors are required for the amyloid beta protein-induced suppression of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 region in vivo. Brain Res Bull 2008; 77: 84-90.

[17] Kar S, Issa AM, Seto D, Auld DS, Collier B, Quirion R. Amyloid beta-peptide inhibits high-affinity choline uptake and acetylcholine release in rat hippocampal slices. J Neurochem 1998; 70: 2179-2187.

[18] Zali H, Seyyedi SS, Rashidy Pour A, Rezaei Tavirani M. Epidemiology and etiology of Alzheimer's disease. koomesh 2015; 16: 119-127.

[19] He YX, Wu MN, Zhang H, Qi JS. Amyloid beta-protein suppressed nicotinic acetylcholine receptor-mediated currents in acutely isolated rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. Synapse 2013; 67: 11-20.

[20] Maatuk N, Samson AO. Modeling the binding mechanism of Alzheimer's Abeta(1-42) to nicotinic acetylcholine receptors based on similarity with snake alpha-neurotoxins. Neurotoxicology 2012; 50: 2243-2248.

[21] Doost mohammad pour J, Hosseinmardi N, Janahmadi M, Ebrahimi S, Fathollahi Y, Motamedi F. Induction of a rat model of Alzheimer's disease by amyloid-β did not change short term synaptic plasticity in CA1 area of hippocampus. koomesh 2014; 16: 76-81.

[22] Winblad B, Engedal K, Soininen H, Verhey F, Waldemar G, Wimo A, Wetterholm AL, Zhang R, Haglund A, Subbiah P. A 1-year, randomized, placebo-controlled study of donepezil in patients with mild to moderate AD. Neurology 2001; 57: 489-495.

[23] Magdesian MH, Nery AA, Martins AH, Juliano MA, Juliano L, Ulrich H, Ferreira ST. Peptide blockers of the inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by amyloid beta. J Biol Chem 2005; 280: 31085-31090.

[24] Forestier A, Douki T, Sauvaigo S, Rosa VD, Demeilliers C, Rachidi W. Alzheimer's disease-associated neurotoxic Peptide amyloid-beta impairs base excision repair in human neuroblastoma cells. Int J Mol Sci 2012; 13: 14766-14787.

[25] Ni R, Marutle A, Nordberg A. Modulation of alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor and Fibrillar Amyloid-beta Interactions in Alzheimer's Disease Brain. J Alzheimers Dis 2012; 33: 841-851.

[26] Wesam RK, Ghanya AN, Mizaton HH, Ilham M, Aishah A. Assessment of genotoxicity and cytotoxicity of standardized aqueous extract from leaves of Erythroxylum cuneatum in human HepG2 and WRL68 cells line. Asian Pacific journal of tropical medicine 2013; 6: 811-816.

[27] Abu Bakar MF, Ahmad NE, Suleiman M, Rahmat A, Isha A. Garcinia dulcis Fruit Extract Induced Cytotoxicity and Apoptosis in HepG2 Liver Cancer Cell Line. Biomed res int 2015; 2015: 1-10.

[28] Cheng JS, Chou CT, Liu YY, Sun WC, Shieh P, Kuo DH, Kuo CC, Jan CR, Liang WZ. The effect of oleuropein from olive leaf (Olea europaea) extract on Ca(2+) homeostasis, cytotoxicity, cell cycle distribution and ROS signaling in HepG2 human hepatoma cells. Food Chem Toxicol 2016; 91: 151-166.

[29] Lehrner J, Marwinski G, Lehr S, Johren P, Deecke L. Ambient odors of orange and lavender reduce anxiety and improve mood in a dental office. Physiol Behav 2005; 86: 92-95.

[30] Adsersen A, Gauguin B, Gudiksen L, Jager AK. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. J Ethnopharmacol 2006; 104: 418-422.

[31] Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Rosas-Romero A, Flerlage N, Burillo J, Codina C. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled mediterranean herbs and aromatic plants. J Agric Food Chem 2002; 50: 6882-6890.

[32] Carpinella MC, Andrione DG, Ruiz G, Palacios SM. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plant extracts from Argentina. Phytother Res 2010; 24: 259-263.

[33] Asaduzzaman M, Uddin MJ, Kader MA, Alam AH, Rahman AA, Rashid M, Kato K, Tanaka T, Takeda M, Sadik G. In vitro acetylcholinesterase inhibitory activity and the antioxidant properties of Aegle marmelos leaf extract: implications for the treatment of Alzheimer's disease. Psychogeriatrics 2014; 14: 1-10.

Anti-acetylcholine esterase activity of aqueous extract of lavandula angustifolia and its toxicity effect on HepG2 cell line

Masoud Soheili (Ph.D)[1], Mostafa Rezaei Tavirani (Ph.D)[2], Mahmoud Salami (Ph.D)[3*]
1- Student Research Committee, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Proteomics Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

(Received: 2 Nov 2015; Accepted: 6 Feb 2017)

Introduction*:* Lavandula angustifolia (lavender) is an aromatic evergreen of laminacea family with some medicinal characteristics. The effect of lavender aqueous extract on improving learning and memory in Alzheimeric model of animals has been proved. Reduced acetylcholine due to increased activity of acetylcholine esterase is one of the main symptoms of Alzheimer's disease. This research was accomplished in order to evaluate the anti-acetylcholine esterase activity of the aqueous extract of lavender. Meanwhile, the toxic effect of the herbal medicine on hepatic HepG2 cell line was considered.

Materials and Methods*:* The dried flowers of lavender were mixed with boiled water and then evaporated. In this experimental study the acetylcholine esterase inhibitory activity of lavender was assessed using Ellman's colorimetric method in 96 well microplates at 405 nm. Also the toxicity effect of lavender was evaluated on HepG2 cell line.

Results*:* Comparing the results taken from the treated and untreated solutions showed that the aqueous extract of lavender did not affect efficiently the acetylcholine esterase inhibitory activity. Also the microscopic evaluation of the HepG2 cells indicated no granulation of the treated cells compared with the untreated cells; confirming that the aqueous extract of lavender has no toxic effect on the HepG2 cell line.

Conclusion*:* The aqueous extract of lavender is not affected impressively the acetylcholine esterase activity and also is not toxic to the hepatic cells.

Keywords*:* Alzheimer's Disease, *Lavandula angustifolia*, Cytotoxicity, Acetylcholine Esterase

* Corresponding author. Tel: +98 9133612920
salami-m@kaums.ac.ir