بررسی سمیت مخلوط عصاره های گیاهی در مدل سلولی PC12 در شرایط عادی و اثر حفاظتی آن در محیط حاوی گلوکز بالا

علیرضا مومیوند[۱]، بهاره توکلی فر[۲،۳]، گلاره وهاب زاده[۴]، سعیده ممتاز[۵،۶]، ملیحه فرید[۷]، حسین رفیع منش[۸]، مهدی گودرزوند*[۳،۹]

۱. دکتری حرفه ای پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران.
۲. دانشیار فارماکولوژی، مرکز تحقیقات پروبیوتیک و مکمل های غذایی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران.
۳. گروه فیزیولوژی- فارماکولوژی- فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران.
۴. استادیار فارماکولوژی، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
۵. استادیار زیست شناسی سلولی- مولکولی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی، جهاد دانشگاهی، کرج، ایران.
۶. گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی و گروه سم شناسی و بیماری ها، مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشگاه علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران ایران.
۷. دانشیار پزشکی اجتماعی، مرکز تحقیقات بیماریهای غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران.
۸. استادیار اپیدمیولوژی، مرکز تحقیقات بیماریهای غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران.
۹. دانشیار فیزیولوژی، مرکز تحقیقات بیماریهای غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران.

عنوان مکرر

بررسی سمیت عصاره گیاهان در مدل سلولی

تعداد شکل ها: ۳

*** نویسنده مسئول**

دکتر مهدی گودرزوند، دانشیار فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی البرز

آدرس پستی

کرج، بلوار موذن، انتهای خیابان بوعلی غربی، پردیس دانشگاه علوم پزشکی البرز، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی- فارماکولوژی- فیزیک پزشکی

کد پستی: تلفن: ۰۲۶۳۴۱۹۸۳۰۲ **نمابر:** ---

ایمیل: m.godarzvand@abzums.ac.ir Orcid Code: 0000-0002-4229-5148

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-03-28]

چکیده

مقدمه: بیماری دیابت یکی از شایعترین اختلالات غدد آندوکرین می باشد که مشخصه اصلی آن افزایش غلظت گلوکز در سرم بیماران است. داروهای گیاهی به دلیل عوارض کمتر دارای مقبولیت زیادی در نزد مردم هستند. هدف این مطالعه بررسی اثر محافظتی مخلوط عصاره گیاهان شنبلیله، قره‌قاط، خارمریم، گزنه، بادرنجبویه و هندوانه ابوجهل در مدل سلولی PC12 در محیط حاوی گلوکز بالا.

مواد و روش‌ها: پس از زمان‌های ۲۴ ، ۴۸ و۷۲ ساعت از مجاور دادن غلظت های مختلف عصاره های گیاهی (شنبلیله، قره قاط، خارمریم، گزنه، بادرنجبویه و هندوانه ابوجهل) در محیط کشت نرمالِ سلول‌هایِ PC12 و محیط کشت با گلوکز بالا (۲۵ mg/ml، ۱۳/۵)، میزان حیات سلولی از طریق روش MTT بررسی شد.

یافته‌ها: میزان زنده مانی سلول های PC12 در۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار کردن با مخلوط عصاره های گیاهی تغییری در حیات سلولی ایجاد نکرد. میزان زنده مانی سلول ها در گروه دوز بالای گلوکز، نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشته و مخلوط عصاره های گیاهی دردوزهای بالا به طور معنی داری منجر به کاهش مرگ سلولی در این شرایط گردید.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های موجود، گلوکز با غلظت (۲۵ mg/ml، ۱۳/۵)، موجب مرگ سلول‌های PC12 گردیده و مخلوط عصاره های گیاهی توانست در غلظت های بالا منجر به کاهش مرگ سلولی ناشی از گلوکز بالا بعد از مواجهه با سلول‌های عصبی شود.

کلمات کلیدی: سلول‌های عصبی PC12 ، عصاره های گیاهی، دیابت، کشت سلولی.

پذیرفته شده

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-03-28]

In-vitro studying toxicity of herbal extracts mixture in normal environment and protective effect of mixtures in High-glucose environment

Alireza Moumivand[1], Bahareh Tavakoli-far[2,3], Gelareh Vahabzadeh[4], Saeideh Momtaz[5,6], Maliheh Farid[7], Hosein Rafiemanesh[8], Mahdi Goudarzvand*[3,9]

1. Medical Doctor, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran.
2. Associate Professor of Pharmacology, Dietary Supplements and Probiotic Research Center, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran.
3. Department of Physiology - Pharmacology - Medical Physics, School of Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran.
4. Assistant Professor of Pharmacology, Department of Pharmacology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
5. Assistant Professor of Cellular and Molecular Biology, Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran.
6. Department of Toxicology and Pharmacology, School of Pharmacy, and Toxicology and diseases Group, Pharmaceutical Sciences Research Centre, The Institute of Pharmaceutical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
7. Assistant Professor of Social Medicine, Non-communicable Diseases Research Centre, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran.
8. Assistance Professor of Epidemiology, Non-communicable Diseases Research Centre, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran.
9. Associate Professor of Physiology, Non-communicable Diseases Research Centre, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran.

Running title

In-vitro studying toxicity of herbal extracts

Figure numbers: 3

*** Correspoding author**

Mahdi Goudarzvand, Associate Professor of Physiology

Postal Address

Alborz University of Medical Sciences Campus, Western Bu-Ali, Moazan Blvd, Karaj, Alborz Province, Iran.

Postal code: 3149969415 **Tel:** +982634198302 **Fax:** ----

Email: m.godarzvand@abzums.ac.ir Orcid Code: 0000-0002-4229-5148

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-03-28]

ABSTRACT

Introduction: Diabetes is one of the most common disorders of the endocrine glands, the main characteristic of which is an increase in the concentration of glucose in the serum of patients. Herbal medicines are widely accepted by people due to less side effects. The purpose of this study is to investigate the protective effect of the silybum marianum, melissa officinalis, vaccinium arctostaphylos, trigonella foenum, urtica dioica and citrullus colocynthis extracts mixtures in the PC12 cell model in a high glucose environment.

Methods and Methods: After 24, 48, and 72 hours of adding different concentrations of plant extracts (silybum marianum, melissa officinalis, vaccinium arctostaphylos, trigonella foenum, urtica dioica and citrullus colocynthis) in the normal culture medium of PC12 cells and the medium with high glucose (25 mg/ml, 13/5), cell viability was measured by MTT method.

Results: The results showed that the viability of PC12 cells did not change in 24, 48 and 72 hours after treatment with a mixture of plant extracts. The survival rate of cells in the high dose glucose group was significantly reduced compared to the control group, and the mixture of plant extracts in high doses significantly reduced cell death in these conditions.

Conclusion: Based on the available findings, glucose with a concentration of 25, 13.5 mg/ml caused the death of PC12 cells and the mixture of plant extracts was able to reduce the cell death caused by high glucose after exposure with nerve cells.

Keywords: PC12 neurons, herbal extracts, diabetes, cell culture.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-03-28]

۱. مقدمه

بیماری دیابت یکی از شایعترین اختلالات غدد اندوکرین می باشد و سالیانه بیش از ۱۰۰ میلیون نفر را مبتلا می کند. تخمین زده شده است که میزان ابتلا به دیابت از ۴۱۵ میلیون نفر در سال ۲۰۱۵ به ۶۴۲ میلیون نفر در سال ۲۰۴۰ افزایش خواهد یافت. گزارش ها حاکی از آن است که خاورمیانه و شمال آفریقا بیشترین شیوع دیابت در دنیا را دارند (۱). مطالعات نشان داده است که دیابت موجب اختلال در متابولیسم کربوهیدرات، چربی و پروتئین میشود و مشخصه اصلی آن افزایش غلظت گلوکز در سرم بیماران است (۲). نارسایی قلبی- عروقی، کلیوی، اختلالات سلول های شبکیه، اعصاب محیطی و کاهش فعالیت عصبی از جمله عوارض طولانی مدت این بیماری است. عوارض نامبرده، از علل اصلی کاهش کیفیت زندگی در بیماران مبتلا به دیابت می باشد که در ادامه منجر به مرگ این بیماران نیز می شود (۲). در طول تاریخ روش های متعدد طبیعی و شیمیایی برای کنترل قند و عوارض بیماری دیابت ابداع شده است. در حال حاضر داروهای شیمیایی مختلفی جهت کاهش قند خون بیماران در دسترس می باشد. این دارو ها مکانیسم عمل متمایزی دارند و باعث بهبود کنترل سطح گلوکز خون می‌شوند. سولفونیل اوره، متفورمین و انسولین‌های پایه سطح قند ناشتا خون، مهارکننده‌های آلفاگلوکوزیداز، مگلیتینایدها، پراملینیتاید، اگزناتاید و انسولین‌های مخصوص هنگام غذا سطح قند خون ۲ ساعت بعد از غذا و تیازولیدیندیون، مهارکننده های DPP4، لیراگلوتاید و انسولینهای ترکیبی، سطح هم قند خون ناشتا و هم بعد از غذا را کاهش می دهند (۳). اما اثرات جانبی این دسته از داروها مانند چاقی، نارسایی قلبی، مشکلات دستگاه گوارش، اسیدوز متابولیک و افزایش یا کاهش قند خون می تواند باعث محدودیت استفاده از آنها شود (۴).

در طی ۱۰ الی ۲۰ سال گذشته تحقیقات آزمایشگاهی و همچنین بالینی متعددی روی گیاهان دارویی مورد استفاده در درمان دیابت انجام گرفت که در تعدادی از آنها اثرات قابل ملاحظه‌ای در کاهش گلوکز خون بیماران دیابتی مشاهده شد (۵). با توجه سابقه پیشینه کشور ما در درمان امراض با استفاده از داروهای گیاهی، این دسته از داروها مقبولیت بیشتری در نزد مردم دارند. از طرفی دسترسی به منابع گیاهی، عوارض کمتر گیاه درمانی، پذیرش آن توسط اکثر بیماران و عدم محدودیت تولید یا واردات مواد اولیه دارویی، تحقیق جهت دستیابی به منبع داروی گیاهی موثر ضروری به نظر می‌رسد. از گیاهان دارویی که به نظر می رسد در درمان و کنترل دیابت نقش موثری ایفا کنند، می توان شنبلیله، قره قاط، خارمریم، گزنه، بادرنجبویه و هندوانه ابوجهل را نام برد (۹-۶). اثرات مثبت هر کدام از گیاهان نامبرده در حفاظت از سلول ها به شکل منفرد بررسی شده است اما هنوز گزارشی از ترکیب این دسته از گیاهان با هم برای کاهش قند خون مورد بررسی قرار نگرفته است. لذا در این مطالعه به بررسی میزان اثر حفاظتی ترکیب عصاره این ۶ گیاه در محیط کشت سلول‌های PC12 در محیط با و بدون گلوکز و همچنین اثبات عدم آسیب سلولی عصاره گیاهی پرداخته شده است. هدف ما از این فرمولاسیون دارویی، رسیدن به ترکیبی با بازدهی بیشتر و مصرف راحت تر برای بیماران دیابتی می باشد.

۲. مواد و روش ها

۲-۱. نوع مطالعه

این مطالعه از نوع مورد - شاهد می باشد که بعد از طرح در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی البرز مورد تصویب قرار گرفت.

۲-۲. مخلوط عصاره گیاهی

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-03-28]

بذر گیاه شنبلیله، برگ گیاه قره قاط، بذر گیاه خارمریم، بذر گیاه گزنه، برگ گیاه بادرنجبویه و میوه هندوانه ابوجهل خریداری شد. سپس گونه گیاهان توسط کارشناس گیاه شناسی پژوهشکده گیاهان دارویی تایید و کد هرباریمی از آنها تهیه شد.

۳-۲. کد هرباریوم گیاهان مورد استفاده

بخش های هوایی گیاه M. officinalis، تهیه شده از اراک (IMPH) 1494، برگ و میوه V. arctostaphylos تهیه شده از گیلان (IMPH) 1439، دانه T. foenum-graecum تهیه شده از فروشگاه های شهر تهران، بخش هوایی گیاه U. dioica تهیه شده از قزوین (IMPH) 744، گیاه C. colocynthis تهیه شده از فروشگاه های شهر یزد، و دانه گیاه S. Marianum تهیه شده از فروشگاه های شهر تهران.

۴-۲. آماده سازی مخلوط عصاره گیاهی

۱-۴-۲. عصاره گیری

ابتدا گیاهان تهیه شده تحت دمای ۱۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت قرار می گیرند. جهت افزایش بازدهی فرایند عصاره گیری، گیاهان خشک شده باید آسیاب شده و تبدیل به پودر شوند. پودر حاصل با اتانول ۹۵٪ ترکیب شده و به مدت ۲۴ ساعت در فریزر و در دمای خیلی پایین ۸۵- درجه سانتیگراد قرار می گیرد. در طی این مدت تمامی مواد محلول در حلال غیر قطبی اتانول از پودر گیاه خارج می شود. سپس جهت خالص سازی با استفاده از پمپ خلع و قیف بوخنر، از کاغذ صافی عبور داده شده سپس توسط دستگاه Spray-Dryer، اتانول از محلول جدا شده و فقط پودر عصاره باقی می ماند (۱۰).

۲-۴-۲. آماده سازی محلول عصاره جهت آزمایش

جهت استفاده از عصاره گیاهان شنبلیله، قره قاط، خارمریم، بادرنجبویه، گزنه و هندوانه ابوجهل، عصاره خشک آنها را ابتدا باید با استفاده از دستگاه Heater Stirrer مخلوط و سپس در حلال مورد نظر (اتانول ۹۵٪) حل کرد. نسبت مورد استفاده از عصاره هر گیاه با توجه مطالعات پیشین که سمیت و دوزی که بیشینه اثر حفاظتی و آنتی اکسیدانی هر گیاه دیده شده است تعیین می شود. دوزهای بهینه مصرف هر گیاه: دوز مصرفی شنبلیله ۱۰۰۰ میلی‌گرم در روز، دوز مصرفی قره قاط ۷۵۰ میلی‌گرم در روز، دوز مصرفی خارمریم ۶۰۰ میلیگرم در روز، دوز مصرفی بادرنجبویه ۷۰۰ میلیگرم در روز، دوز مصرفی گزنه ۱۵۰۰ میلیگرم در روز و دوز مصرفی هندوانه ابوجهل ۳۰۰ میلیگرم در روز می باشد. با توجه به مستندات دوز مصرف بالینی گیاهان فوق، در این مطالعه از مخلوط گیاهان به میزان ۱۰۰۰ میلی‌گرم در روز تهیه میشود. این مخلوط شامل ۲۲۰ میلی‌گرم عصاره شنبلیله، ۱۶۵ میلی‌گرم عصاره قره قاط، ۱۳۲ میلی‌گرم عصاره خارمریم، ۸۸ میلی‌گرم عصاره بادرنجبویه ۳۳۰ میلی‌گرم عصاره گزنه و ۶۵ میلی‌گرم عصاره هندوانه ابوجهل خواهد بود. سپس نیمی از محلول فوق به لوله آزمایش دیگری منتقل شده و ۵ میلی‌لیتر از حلال مجدد به محلول افزوده میشود تا محلول با غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تولید شود. این کار را ۸ بار دیگر تکرار کرده تا در نهایت غلظت های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲۵، ۷/۸۱۳، ۳/۹۰۶ و ۱/۹۵۳ تولید شود که در این آزمایش مورد استفاده قرار می‌گیرند.

۵-۲. کشت و تیمار سلولی

رده سلولی مورد استفاده در این مطالعه مدل سلولی PC12 می باشد که از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول های PC12 بطور برگشت پذیری به فاکتورهای تمایزی عصبی از جمله فاکتورهای نوروتروفیک مثل NGF پاسخ داده و فنوتیپ عصبی ایجاد می کنند. این رده سلولی سالیان سال است که به عنوان یک مدل بسیار مناسب برای مطالعات نوروبیولوژیک و نوروشیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. بعد از شمارش سلولی و تعیین غلظت مورد نیاز سلولی (۱۰۰۰۰) سلول، آنها را درپلیت‌های ۹۶ تایی کشت

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-03-28]

داده و بعد از ۲۴ ساعت حجم های مورد نظر از محلول دارویی را داخل پلیت ریخته و پلیت‌ها درون انکوباتور ۳۷ درجه برای مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت قرار گرفتند. در آزمایش دوم، مانند آزمایش اول می باشد و فقط جهت بررسی اثر حفاظتی مخلوط عصاره گیاهی در محیط حاوی گلوکز بالا، محیط کشت اضافه شده به سلول‌ها شامل محلول گلوکز با غلظت ۱۳/۵ و ۲۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر می باشد (۶).

۲-۶. بررسی زنده مانی سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT

فعالیت متابولیکی سلول‌های انکوبه شده در حضور غلظت‌های مختلف از دارو با استفاده از تست MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تهیه استوک MTT، ۵ میلی‌گرم از این ترکیب در ۱ میلی‌لیتر بافر نمکی فسفات حل گردید. پس از انکوباسیون، ۵ میکرولیتر از استوک MTT به هر چاهک اضافه گردید. پس از چهار ساعت نگهداری در انکوباتور ۳۷ درجه، به دنبال خروج محیط کشت رویی، واکنش با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO متوقف گردید. این محلول باعث حل شدن رسوب کروموفور فورمازان بنفش رنگ در سلول‌ها شده و میزان جذب توسط دستگاه الایزا پلیت ریدر در طول موج۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج حاصله به صورت درصد مقادیر حاصل از کنترل بیان می‌گردد(۶).

۲-۷. بررسی تعیین IC-50 (Half Maximal Inhibitory Concentration)

به منظور تعیین IC-50، یعنی غلظتی از دارو که در حضور آن ۵۰ درصد از رشد سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل مهار شده

$$\text{درصد مهار تکثیر سلولی} = \frac{\text{میانگین جذب (۵۷۰ نانومتر) در چاهک های دارو گرفته}}{\text{میانگین جذب (۵۷۰ نانومتر) در چاهک های کنترل}} \times ۱۰۰$$

باشد. بنابراین برای یافتن دوز مناسب جهت آزمایشات بعدی، سلول‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در پلیت ۹۶ خانه ای، با غلظت‌های مختلفی از دارو تیمار گردیدند. سپس به دنبال سنجش مهار احیاء MTT مقدار IC-50 با استفاده از رابطه زیر تعیین شد:

۲-۸. آنالیز آماری

در این مطالعه، به منظور آنالیز آماری از نرم افزار گراف پد ورژن ۸ استفاده شد. برای تایید نرمال بودن توزیع داده ها از آزمون کولموگراف- سیمرنوف استفاده شد. برای آنالیز داده های اثر عصاره در محیط بدون گلوکز و حاوی گلوکز در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از آنالیز واریانس با اندازه گیری مکرر (Repeated Measures) و تست تعقیبی Tukey استفاده شد. P-Value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان مقادیر دارای ارزش آماری در نظر گرفته شد. سپس نمودارها با استفاده از نرم افزار گراف پد رسم گردید.

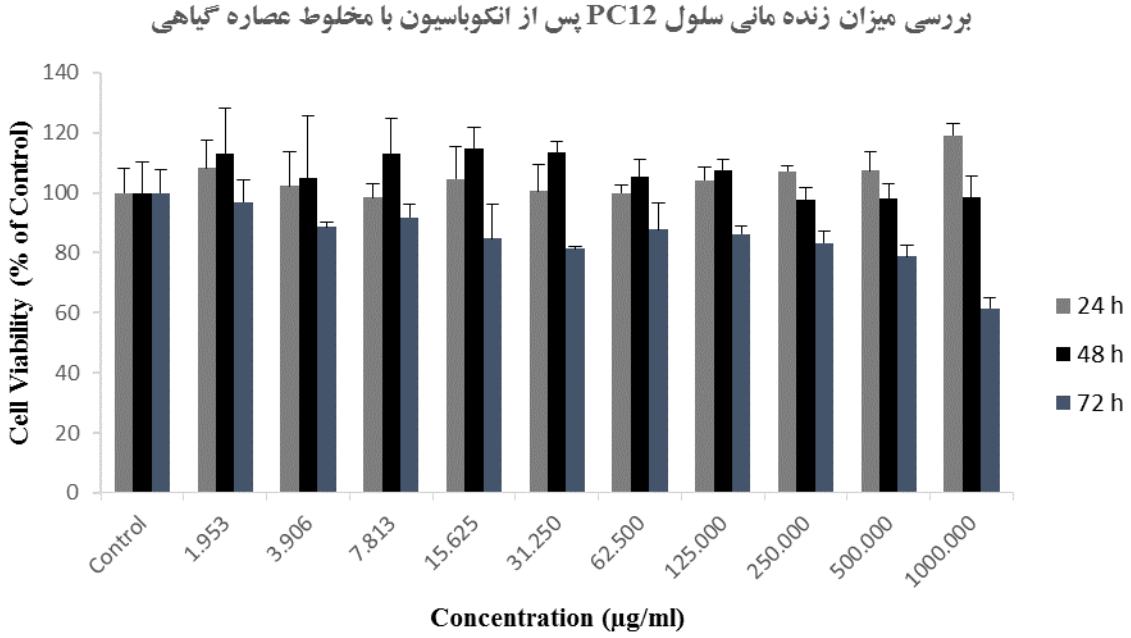
۳. یافته ها

۳-۱. بررسی سمیت مخلوط عصاره گیاهی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از کشت رده سلولی PC12

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-03-28]

به منظور بررسی سمیت مخلوط عصاره گیاهی، سلول‌های PC12 در محیط کشت بدون افزودن گلوکز اضافی، در معرض دوزهای مختلف مخلوط عصاره قرار گرفتند. زنده مانی سلول در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از آغاز انکوباسیون با مخلوط عصاره گیاهی، مورد بررسی قرار گرفت. سپس IC-50 (غلظتی از دارو که در حضور آن ۵۰ درصد از رشد سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل مهار شده باشد) محاسبه گردید

نتایج آزمون آنالیز واریانس با اندازه گیری تکراری (RM) با تست تعقیبی Tukey مربوط به زنده مانی سلول PC12 پس از انکوباسیون با مخلوط عصاره گیاهی برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد که میزان زنده مانی سلولی در هیچ یک از دوزهای عصاره مورد نظر، بدون حضور گلوکز، کمتر از ۵۰٪ نبوده است و کاهش معنی داری مشاهده نشد (شکل ۱). در این مطالعه IC-50 بیشتر از ۱۰۰۰ میلی گرم/میلی لیتر تعیین شد که موید این مطلب است که بیشترین دوز مخلوط عصاره های ۶ گیاه، خطر سمی ندارد (IC-50 > 1000 µg/ml).



شکل ۱- اثرات انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعتِ مخلوط عصاره گیاهی بر میزان زنده مانی سلول PC12. زنده مانی سلولی در هیچ یک از دوزهای عصاره مورد نظر کمتر از ۵۰٪ نبوده است و کاهش معنی داری مشاهده نشد. داده ها به صورت Mean ± SD ارایه شده است.

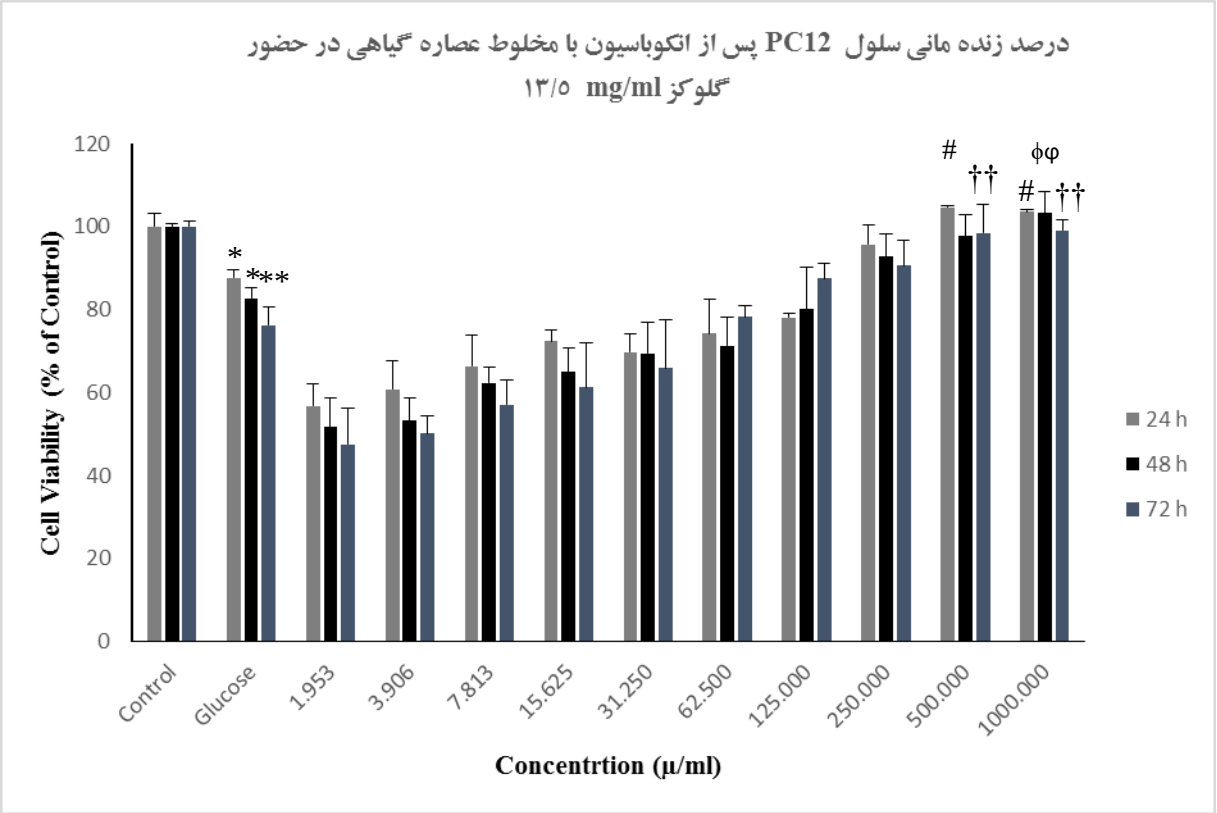
۲-۳. بررسی اثر حفاظتی مخلوط عصاره گیاهی پس از انکوباسیون برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در محیط کشت سلول PC12 در حضور گلوکز با غلظت ۱۳/۵ میلیگرم بر میلی‌لیتر

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-03-28]

نتایج آزمون آنالیز واریانس با اندازه گیری تکراری (RM) با تست تعقیبی Tukey مربوط به زنده مانی سلول PC12 پس از انکوباسیون با مخلوط عصاره گیاهی برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، در حضور گلوکز نشان داد که میزان زنده مانی سلولی (**Cell Viability**) در گروه کنترل مثبت (گروه حاوی گلوکز ۱۳/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل داشته است (P-Value < 0.05 برای ۲۴ و ۴۸ ساعت و برای ۷۲ ساعت P-Value < 0.01) اما میزان زنده مانی سلولی در گروه های دریافت کننده عصاره گیاهی با دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای هر سه زمان به صورت معنی داری در مقایسه با گروه کنترل مثبت افزایش داشته است (برای دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم/میلی لیتر در زمان ۲۴ ساعت P-Value < 0.05، برای دوز ۱۰۰۰ میلی گرم/میلی لیتر در زمان ۴۸ ساعت P-Value < 0.01 و برای دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم/میلی لیتر در زمان ۷۲ ساعت P-Value < 0.01). ضمنا افزایش زنده مانی سلولی برای دوز ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نیز مشاهده شد، هرچند این افزایش معنی دار نبود (شکل ۲).

پذیرفته شده

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-03-28]



شکل ۲- اثر حفاظتی مخلوط عصاره گیاهی پس از انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر میزان زنده مانی سلول PC12 در محیط حاوی گلوکز ۱۳/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر. زنده مانی سلول PC12 پس از انکوباسیون با مخلوط عصاره گیاهی برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در حضور گلوکز نشان داد که میزان زنده مانی سلولی در گروه حاوی گلوکز، کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل داشته است (P-Value < 0.05 برای ۲۴ و ۴۸ ساعت و برای ۷۲ ساعت P-Value < 0.01) اما میزان زنده مانی سلولی در گروه های دریافت کننده عصاره گیاهی با دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای هر سه زمان به صورت معنی داری در مقایسه با گروه کنترل مثبت (حاوی گلوکز ۱۳/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) افزایش داشته داده است (برای دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم/میلی لیتر در زمان ۲۴ ساعت P-Value < 0.05، برای دوز ۱۰۰۰ میلی گرم/میلی لیتر در زمان ۴۸ ساعت P-Value < 0.01 و برای دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم/میلی لیتر در زمان ۷۲ ساعت P-Value < 0.01). ** P-Value < 0.01 و * P-Value < 0.05 اختلاف معنی دای نسبت به گروه کنترل. # P-Value < 0.01 و ϕϕ P-Value < 0.01 †† اختلاف معنی داری) نسبت به گروه کنترل مثبت به ترتیب برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. داده ها به صورت Mean ± SD ارایه شده است.

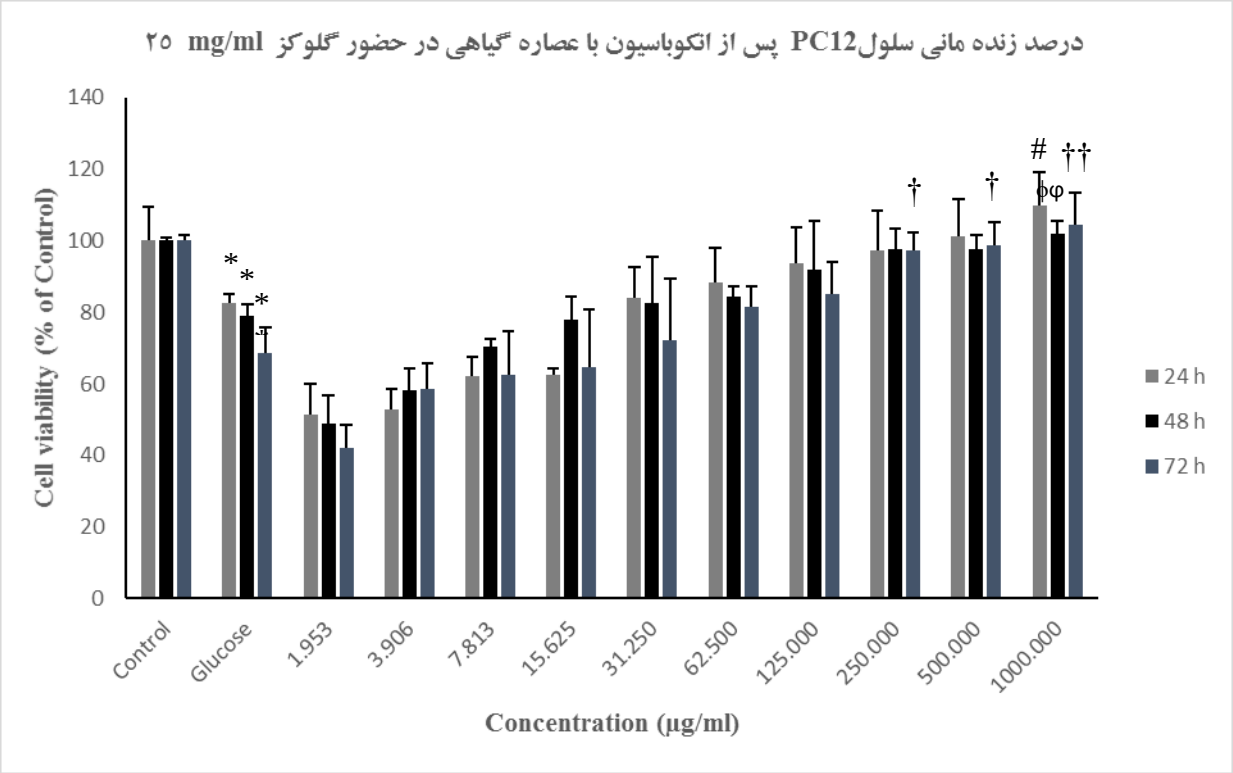
[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-03-28]

۳-۳. بررسی اثر حفاظتی مخلوط عصاره گیاهی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از کشت رده سلولی PC12 در محیط با گلوکز با غلظت ۲۵ میلیگرم بر میلی‌لیتر

نتایج آزمون آنالیز واریانس با اندازه گیری تکراری (RM) با تست تعقیبی Tukey مربوط به زنده مانی سلول PC12 پس از انکوباسیون با مخلوط عصاره گیاهی برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، در حضور گلوکز نشان داد که میزان زنده مانی سلولی (Cell Viability) در گروه کنترل مثبت (گروه حاوی گلوکز ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل داشته است (P-Value < 0.05 برای ۲۴ و ۴۸ ساعت و P-Value < 0.001 برای ۷۲ ساعت) اما میزان زنده مانی سلولی در گروه های دریافت کننده عصاره گیاهی با دوز ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به صورت معنی داری در مقایسه با گروه کنترل مثبت (حاوی گلوکز ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) افزایش داشته داده است. دوزهای ۵۰۰ و ۲۵۰ میلی گرم/میلی لیتر عصاره گیاهی نیز در زمان ۷۲ ساعت افزایش معنی داری را نشان دادند. P-Value < 0.01 ** و P-Value < 0.05 * اختلاف معنی داری نسبت به گروه کنترل. P-Value < 0.05 # نسبت به گروه کنترل مثبت برای زمان ۲۴ ساعت، P-Value < 0.01 ϕϕ نسبت به گروه کنترل مثبت برای زمان ۴۸ ساعت و P-Value < 0.01 †† و P-Value < 0.05 † نسبت به گروه کنترل مثبت برای زمان ۷۲ ساعت. داده ها به صورت Mean ± SD ارایه شده است. ضمنا بهبود یا افزایش زنده مانی سلولی برای دوزهای ۱۲۵، ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و دوز ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای زمان ۲۴ ساعت مشاهده شد هرچندکه این افزایش معنی دار نبود (شکل ۳).

بازنویسی شده

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-03-28]



شکل ۳- اثر حفاظتی مخلوط عصاره گیاهی پس از انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر میزان زنده مانی سلول PC12 در محیط حاوی گلوکز ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر. زنده مانی سلول PC12 پس از انکوباسیون با مخلوط عصاره گیاهی برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در حضور گلوکز نشان داد که میزان زنده مانی سلولی در گروه حاوی گلوکز، کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل داشته است (P-Value < 0.05 برای ۲۴ و ۴۸ ساعت و P-Value < 0.001 برای ۷۲ ساعت) اما میزان زنده مانی سلولی در گروه دریافت کننده عصاره گیاهی با دوز ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به صورت معنی داری در مقایسه با گروه کنترل مثبت (حاوی گلوکز ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) افزایش داشته داده است. دوزهای ۵۰۰ و ۲۵۰ میلی گرم/میلی لیتر عصاره گیاهی نیز در زمان ۷۲ ساعت افزایش معنی داری را نشان دادند.. P-Value < 0.01 ** و P-Value < 0.05 * اختلاف معنی داری نسبت به گروه کنترل. P-Value < 0.05 ♯ نسبت به گروه کنترل مثبت برای زمان ۲۴ ساعت، P-Value < 0.01 ϕϕ نسبت به گروه کنترل مثبت برای زمان ۴۸ ساعت و P-Value < 0.01 †† و P-Value < 0.05 † نسبت به گروه کنترل مثبت برای زمان ۷۲ ساعت. داده ها به صورت Mean ± SD ارایه شده است.

۴. بحث

دیابت یکی از بیماری‌های متابولیک شایع در سطح جهان است. این بیماری با توجه به تغییر عادات غذایی و سبک زندگی مردم، به طور روز افزونی افراد بیشتری را درگیر میکند (۲، ۳). میزان ابتلا به این بیماری در کشور ما نیز به شیب زیادی در حال پیشرفت است. این بیماری دامنه عوارض و اثرات گسترده‌ای دارد که کیفیت زندگی و امید به زندگی مبتلایان را تحت تاثیر قرار می دهد. نابینایی، نارسایی کلیوی، بیماری های قلبی و عروقی و آسیب به اعصاب مرکزی و محیطی (نوروپاتی) می توان نام برد (۲).

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-03-28]

مدیریت و کنترل عوارض این بیماری هزینه سرسام آوری بر دوش جامعه و سیستم درمانی میگذارد. تا به امروز داروها و روش های درمانی بسیاری برای کنترل این بیماری و عوارض آن معرفی شده است و هنوز جست و جو برای یافتن روش های بهتر و موثرتر و با عوارض کمتر ادامه دارد (۲, ۴, ۱۱).

در این مطالعه با تمرکز بر عارضه مربوط به سیستم عصبی این بیماری، سعی بر اثبات اثرات پیشگیری کننده و حفاظت کننده مخلوطی از عصاره های گیاهان ارزان و در دسترس در داخل کشور، از جمله شنبلیله، قره‌قاط، خارمریم، گزنه، بادرنجبویه و هندوانه ابوجهل اسفاده شده است. در قدم اول ابتدا باید از عدم آسیب رسان بودن ترکیب مذکور اطمینان حاصل کرد و سپس سایر اثرات آن مورد بررسی قرار گیرد.

یکی از معیارهای تحقیق در زمینه بررسی سمیت یک ماده در تحقیقات کشت سلولی، حداکثر غلظت بازدارندگی یا مهار ۵۰ درصد (IC-50) است. تعیین دوز بازدارنده محصول دارویی، تعیین کننده میزان حداکثر دوز مجاز برای استفاده از آن ماده در پژوهش هایی در شرایط آزمایشی مشابه است. به طور مثال در پژوهشی که توسط .B. Auddy al در سال ۲۰۰۳ انجام شد، با استفاده از روش مشابه آزمون MTT، به تعیین میزان IC-50 چند عصاره از گیاه بومی هند جهت درمان بیماریهای تخریب کننده سیستم عصبی پرداختند. در این مطالعه مشخص شد که گیاه شب‌بو با IC-50=16.07 µg/ml بیشترین میزان سمیت را بین گیاهان پژوهش داشت (۱۲). طی پژوهش دیگری که در سال ۲۰۱۳ به انجام رسید، عصاره متانولی۲۰ گیاه با فعالیت آنتی اکسیدانی شناخته شده که به طور سنتی در بیماران با اختلالات شناختی استفاده می شدند، با هدف بررسی علمی اثرات آنها مورد بررسی قرار گرفت. یکی از گیاهان مورد استفاده در این مطالعه شنبلیله بود که میزان IC-50 آن بیش از مقادیر مورد پژوهش بود و بیش از ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شد. در این مطالعه شنبلیله را گیاهی امن جهت استفاده با دوزهای بالا معرفی می کند (۱۳). مطالعه مشابه در زمینه تعیین سمیت برای گیاه خارمریم در سال ۲۰۱۶، انجام شد. از ماده موثره اصلی این گیاه که سیلیمارین نام دارد، طی ۲۴ ساعت حضور در محیط کشت PC12، میزان IC-50 > 1000 µg/ml گزارش شد. در همین مطالعه یکی از اجزای اصلی سیلیمارین، یعنی سیلیبین هم مورد بررسی قرار گرفت که IC-50 = 210 µg/ml داشت (۱۴).

هندوانه ابوجهل نیازمند احتیاط بیشتری است. در بررسی‌های تاکنون صورت گرفته، میزان سمیت عصاره میوه این گیاه به نسبت سایر گیاهان در غلظت های پایین‌تری ظاهر می شود. از عوارض مصرف بیش از حد این میوه می توان به ناراحتی‌های گوارشی شدید و اختلال عملکرد کبد و کلیه اشاره کرد. به طوری که در پژوهش انجام شده توسط ممتاز و همکاران، میزان IC-50 عصاره اتیل استات این میوه ۴۹۷ میکروگرم در میلیلیتر گزارش شده است (۱۵).

با توجه به در دسترس نبودن میزان سمیت مشخص برای ترکیب عصاره گیاهان مورد استفاده در این پژوهش، تعیین سمیت این ترکیب در اولویت کار قرار گرفت. همان گونه که در نتایج مشاهده شد، ترکیب عصاره گیاهی مورد استفاده در بازه دوزهای استفاده شده، در محیط کشت PC12 ایجاد سمیت نکردند.

هدف دوم این مطالعه بررسی وجود یا عدم وجود خواص حفاظتی در برابر استرس ایجاد شده ناشی از غلظت بالای گلوکز در سلول‌های عصبی است. در این مرحله از غلظت‌های مختلف گلوکز برای اعمال استرس بر سلول‌ها استفاده می شود. برای انجام این کار به طور معمول غلظت‌های مختلف گلوکز استفاده می‌شود. این مقدار بر اساس شرایط طراحی آزمایش متغیر می باشد. در این مطالعه از غلظت های ۱۳/۵ و ۲۵ میلیگرم بر میلی‌لیتر برای اعمال استرس بر سلول های عصبی استفاده شد. سپس قرار دادن ترکیب حاصل با عصاره گیاهی، اثرات آن ثبت و در صورت مشاهده بهبود معنی دار در زنده مانی سلول‌ها مقدار و دوز آن گزارش می‌شود. از مکانیسم اصلی تخریب سلول‌های عصبی توسط گلوکز اطلاعات کاملی در دسترس نیست. اما در مطالعات دیده شده است، که مقدار زیاد گلوکز موجب تولید رادیکال‌های آزاد درون سلول شده و در نهایت منجر به آپوپتوز و کاهش زنده مانی نورون-ها می شود (۱۶).

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-03-28]

در مطالعه کویرانساز و همکاران، اثر آنتی اکسیدانی عصاره بذر شنبلیله را بر روی سلول های کبد موش صحرایی مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه مشخص شد که بذر شنبلیله حاوی مواد آنتی اکسیدان است و از ساختار سلولی را در برابر استرس اکسیداتیو حفاظت می کند (۱۷). در مطالعه دیگری که از عصاره شنبلیله در موش‌های مبتلا به نوروپاتی انجام شد، مشاهده شده است که عصاره گیاه نه تنها خواص درمانی برای دیابت موش داشته و موجب کاهش قند خون و افزایش ترشح انسولین شده و همچنین ترمیم و بهبود نورون‌های آسیب دیده را هم داشته است (۹).

از طرفی در مطالعه‌ای که خلیلی و همکاران در سال ۲۰۱۰ با هدف بررسی عوارض احتمالی استفاده طولانی مدت از این گیاه در موش انجام شد، مشخص گردید مصرف بالای این گیاه برای موش اثرات مخرب، از جمله مرگ یا تغییرات میکروسکوپی نداشته است. با اینحال در نوزادان متولد شده از این موش ها، اختلالات تولید مثلی و اثرات احتمالی تراتوژنیک مشاهده شده است (۱۸).

در مورد گیاه گزنه، مطالعات متعددی انجام شده است که در بعضی از آنها به بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی گزنه پرداخته شده است. و نشان دادند که گزنه فعالیت آنتی اکسیدانی کمتری نسبت به ویتامین C دارد ولی با این حال اثرات آن در بهبود شرایط عصبی و اثرات حفاظتی روی دستگاه عصبی، غیر قابل انکار است (۱۱, ۱۹). در مطالعه دیگری که هم به صورت درون تنی (*In-vivo*) و هم برون تنی (*In-vitro*) در سال ۲۰۱۲ انجام شد، علاوه بر اثبات خواص کاهنده قند خون و ضد التهابی، عارضه قابل توجه و سمیتی از آن مشاهده نشد (۲۰).

در مورد گیاه قره‌قاط نیز مطالعات بسیاری از خواص آنتی اکسیدانی آن در دسترس است. در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۳ در پژوهشکده گیاهان دارویی، مشاهده شد که مصرف عصاره این گیاه در افراد دیابتی از افزایش قند خون جلوگیری کرده و سطح انسولین خون را افزایش می دهد. همچنین در این مطالعه سمیت در کبد و کلیه موش‌های مورد آزمایش مشاهده نشد (۷).

بادرنجبویه از آن دسته از گیاهانی است که به علت اثرات وسیعی که از آن مشاهده شده است، بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته بوده است. در مطالعه که شاکری در سال ۲۰۱۶ انجام داد نشان داد که این گیاه سرشار از ترکیبات فلاونوئید و فنولیک اسید است (۲۱). اثرات آنتی اکسیدانی و حفاظت سیستم عصبی این گیاه در استرس اکسیداتیو ناشی از آب اکسیژنه و همچنین اثرات حفاظتی آن در برابر Aβ که در بیماران مبتلا به آلزایمر موجب آسیب به غشاء نورون‌ها می شود، مورد بررسی قرار گرفته است (۲۲, ۲۳).

در مطالعه ایی که در مورد هندوانه ابوجهل توسط فلاح حسینی و همکاران انجام شد مشخص گردید که عصاره متانولی این گیاه میزان زنده مانی سلول های PC12 را در شرایطی که این سلول‌ها تحت تاثیر غلظت بالای گلوکز بودند بطور معنی داری افزایش داد (۶). با این حال عوارض مصرف دوز بالای این گیاه غیر قابل انکار است. از طرفی در مطالعه دیگری، اثرات مخلوطی از هندوانه ابوجهل و خرزهره به میزان ۱۰٪ از رژیم غذایی موش ها منجر به کاهش وزن و آسیب به کلیه و کبد گردید (۲۴).

در سال ۲۰۱۳ قربانی و گروهی از پژوهشگران با ترکیب عصاره های ۱۲ گیاه که از میان آنها می توان به هندوانه ابوجهل، بادرنجبویه، شنبلیله، قره قاط و گزنه اشاره کرد، سعی بر کنترل اختلالات چربی خون در موش های صحرایی مبتلا به دیابت بودند، پرداختند. نتایج این پژوهش مشخص کرد که این ترکیب گیاهی اثر قابل ملاحظه بر آنزیم های کبدی نداشته است. اما در نتیجه مصرف این ترکیب گیاهی نه تنها وضعیت چربی خون در موش های صحرایی مورد آزمایش بهبود یافته، بلکه سطح قند خون ناشتا، میزان مصرف آب و دفع ادرار نیز کاهش قابل توجه داشته است (۸).

در مطالعه مشابه دیگری با ترکیب ۷ گیاه از زیر مجموعه خانواده نعناعیان از جمله مرزنگوش، مریم گلی و بادرنجبویه برای توانایی این ترکیب در کنترل دیابت و فشار خون ناشی از آن انجام شد. یکی از معیارهای مورد بررسی این مطالعه میزان توانایی این

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-03-28]

گیاهان در مهار آنزیم آلفا گلیکوزیداز است. مشخص شد که میزان مهار این آنزیم رابطه مستقیم با میزان ترکیبات فنل و فعالیت آنتی اکسیدانی این ترکیبات دارد (۲۵).

در بخش دوم مطالعه انجام شده به بررسی اثر حفاظتی ترکیب عصاره ۶ گیاه ذکر شده در برابر استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط غلظت بالای گلوکز پرداخته شد. با توجه به نتایج به دست آمده، دوزهای بالای این عصاره در کمک به سلول های PC12 عملکرد موفقیت آمیز دارد؛ که این نتیجه خود همسو با نتایج سایر مطالعاتی است که هر کدام از این گیاهان را از نظر خواص آنتی اکسیدانی و سمیت آنها بررسی کرده اند. به طور کلی می توان نتیجه گرفت که مخلوط گیاهان شنبلیله، قره‌قاط، خارمریم، گزنه، بادرنجبویه و هندوانه ابوجهل در دوزهای استفاده شده در این مطالعه، اثر کاهش زنده مانی در محیط کشت PC12 نداشته است. همچنین با استفاده از این مخلوط عصاره‌های گیاهان می توان از آسیب ناشی استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط غلظت‌های بالای گلوکز، تا حدودی جلوگیری کرد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با کد اخلاق IR.ABZUMS.REC.1400.250 در دانشگاه علوم پزشکی البرز مورد تصویب قرار گرفت. نویسندگان مقاله از معاونت تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی البرز برای تامین مالی پروژه کمال تشکر و قدردانی را دارند. ضمنا نویسندگان مقاله هیچ گونه تعارض منافع برای انتشار این مقاله ندارند.

منابع

1. Li F, Zhang J, Luo L, Hu J. Protective effects of Xanthohumol against diabetic nephropathy in a mouse model. Kidney and Blood Pressure Research. 2023;48(1):92-101.
2. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care. 2010;33(Supplement_1):S62-S9.
3. Shintani H, Shintani T. Effects of antidiabetic drugs that cause glucose excretion directly from the body on mortality. Medicine in Drug Discovery. 2020;8:100062.
4. Padhi S, Nayak AK, Behera A. Type II diabetes mellitus: a review on recent drug based therapeutics. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2020;131:110708.
5. Hinad I, S'hih Y, Elhessni A, Mesfioui A, laarbi Ouahidi M. Medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes in Ksar Elkebir Region (North-Western Morocco). The Pan African Medical Journal. 2022;42.
6. Fallah Huseini H, Andalib S, Jasemi E, Khalighi-Sigaroodi F, Momtaz S, Mohammadi Savadroodbari R, et al. Protective effect of Citrullus colocynthis (L.) Schard. fruit extract on high glucose-induced neurotoxicity in PC-12 cells. Journal of Medicinal Plants. 2021;20(80):60-8.
7. Kianbakht S, Abasi B, Dabaghian FH. Anti-hyperglycemic effect of Vaccinium arctostaphylos in type 2 diabetic patients: A randomized controlled trial. Forschende Komplementärmedizin/Research in Complementary Medicine. 2013;20(1):17-22.
8. Ghorbani A, Shafiee-Nick R, Rakhshandeh H, Borji A. Antihyperlipidemic effect of a polyherbal mixture in streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of lipids. 2013;2013.
9. Moghadam FH, Vakili-Zarch B, Shafiee M, Mirjalili A. Fenugreek seed extract treats peripheral neuropathy in pyridoxine induced neuropathic mice. EXCLI journal. 2013;12:282.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-03-28]

10. Ahangarpour A, Oroojan A. Effect of Crust and Seed's Aqueous Extract and hydro-alcoholic extracts of crust, seed and pulp of citrullus colocynthis on lipid's factors and hepatic enzyme in fructose-fed male rats. Journal of Babol University of Medical Sciences. 2012;14(4):53-60.
11. Daneshmand P, Saliminejad K, Shasaltaneh MD, Kamali K, Riazi GH, Nazari R, et al. Neuroprotective effects of herbal extract (Rosa canina, Tanacetum vulgare and Urtica dioica) on rat model of sporadic Alzheimer's disease. Avicenna journal of medical biotechnology. 2016;8(3):120.
12. Auddy B, Ferreira M, Blasina F, Lafon L, Arredondo F, Dajas F, et al. Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. Journal of ethnopharmacology. 2003;84(2-3):131-8.
13. Mathew M, Subramanian S. In vitro screening for anti-cholinesterase and antioxidant activity of methanolic extracts of ayurvedic medicinal plants used for cognitive disorders. PloS one. 2014;9(1):e86804.
14. Jiang H-H, Yan F-S, Shen L, Ji H-F. Silymarin versus silibinin: differential antioxidant and neuroprotective effects against H2O2-induced oxidative stress in PC12 cells. Natural product communications. 2016;11(5):1934578X1601100520.
15. Ziaee M, Khorrami A, Khalighi-Sigaroudi F, Momtaz S. Study of the protective effects of Citrullus colocynthis against toxic effects of glucose in PC-12 cell line.
16. Nazarnezhad S, Rahmati M, Shayannia A, Abbasi Z, Salehi M, Khaksari M. Nesfatin-1 protects PC12 cells against high glucose-induced cytotoxicity via inhibiting oxidative stress, autophagy and apoptosis. Neurotoxicology. 2019;74:196-202.
17. Kaviarasan S, Naik G, Gangabhagirathi R, Anuradha C, Priyadarsini K. In vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (Trigonella foenum graecum) seeds. Food chemistry. 2007;103(1):31-7.
18. Khalki L, M'hamed SB, Bennis M, Chait A, Sokar Z. Evaluation of the developmental toxicity of the aqueous extract from Trigonella foenum-graecum (L.) in mice. Journal of ethnopharmacology. 2010;131(2):321-5.
19. Rahimi R, Nikfar S, Larijani B, Abdollahi M. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2005;59(7):365-73.
20. Dar SA, Ganai FA, Yousuf AR, Balkhi M-u-H, Bhat TM, Sharma P. Pharmacological and toxicological evaluation of Urtica dioica. Pharmaceutical Biology. 2013;51(2):170-80.
21. Shakeri A, Sahebkar A, Javadi B. Melissa officinalis L.–A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. Journal of ethnopharmacology. 2016;188:204-28.
22. López V, Martín S, Gómez-Serranillos MP, Carretero ME, Jäger AK, Calvo MI. Neuroprotective and neurological properties of Melissa officinalis. Neurochemical research. 2009;34:1955-61.
23. Sepand M, Soodi M, Soleimani M, Hajimehdipoor H. Protective effects of Melissa officinalis extract against beta-amyloid-induced oxidative stress in PC12 cells. Journal of Medicinal Plants. 2012;11(42):74-85.
24. Al-Yahya M, Al-Farhan A, Adam S. Preliminary toxicity study on the individual and combined effects of Citrullus colocynthis and Nerium oleander in rats. Fitoterapia. 2000;71(4):385-91.
25. Kwon Y-II, Vattem DA, Shetty K. Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. Asia pacific journal of clinical nutrition. 2006;15(1):107.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-03-28]