

In-Vitro Studying Toxicity of Herbal Extracts Mixture in Normal Environment and Protective Effect of Mixtures in High-Glucose Environment

Alireza Moumivand¹, Bahareh Tavakoli-far^{2,3}, Gelareh Vahabzadeh⁴, Saeideh Momtaz^{5,6}, Maliheh Farid⁷,
Hosein Rafiemanesh⁷, Mahdi Goudarzvand^{*3,7}

1. Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

2. 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. Department of Pharmacology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5. 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. Non-communicable Diseases Research Centre, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

Abstract

Background: 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: 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

Please cite this article as:

Moumivand A, Tavakoli-far B, Vahabzadeh G, Momtaz S, Farid M, Rafiemanesh H, Goudarzvand M. In-Vitro Studying Toxicity of Herbal Extracts Mixture in Normal Environment and Protective Effect of Mixtures in High-Glucose Environment. *ijldl*. 2025; 25(3):263-272.

*Corresponding Author: Mahdi Goudarzvand; Email: m.goudarzvand@abzums.ac.ir

Alborz University of Medical Sciences Campus, Western Bu-Ali, Moazan Blvd, Karaj, Alborz Province, Iran. Postal code: 3149969415, Tel: +982634198302

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

علیرضا مومیوند^۱، بهاره توکلی‌فر^{۲،۳}، گلاره وهاب زاده^۴، سعیده ممتاز^{۵،۶}، ملیحه فرید^۷، حسین رفیع منش^۷، مهدی گودرزوند^{۳،۷*}

- ۱- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
- ۲- مرکز تحقیقات پروبیوتیک و مکمل‌های غذایی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
- ۳- گروه فیزیولوژی- فارماکولوژی- فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
- ۴- گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
- ۵- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی، جهاد دانشگاهی، کرج، ایران
- ۶- گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی و گروه سم‌شناسی و بیماری‌ها، مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشگاه علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۷- مرکز تحقیقات بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

چکیده

مقدمه: بیماری دیابت یکی از شایع‌ترین اختلالات غدد آندوکراین است 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 شنبلله، قره قاط، خارمریم، گزنه، بادرنجبویه و هندوانه ابوجهل در مدل سلولی PC12 در محیط حاوی گلوکز بالا. **روش‌ها:** پس از زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از مجاور دادن غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی (شنبلله، قره قاط، خارمریم، گزنه، بادرنجبویه و هندوانه ابوجهل) در محیط کشت نرمال سلول‌های PC12 و محیط کشت با گلوکز بالا (۲۵ mg/ml، ۱۳/۵)، میزان حیات سلولی از طریق روش MTT بررسی شد.

یافته‌ها: میزان زنده‌مانی سلول‌های PC12 در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار کردن با مخلوط عصاره‌های گیاهی تغییری در حیات سلولی ایجاد نکرد. میزان زنده‌مانی سلول‌ها در گروه دوز بالای گلوکز، نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشته و مخلوط عصاره‌های گیاهی در دوزهای بالا به‌طور معنی‌داری منجر به کاهش مرگ سلولی در این شرایط گردید.

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

واژگان کلیدی: سلول‌های عصبی PC12، عصاره‌های گیاهی، دیابت، کشت سلولی

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۰۹

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Moumivand A, Tavakoli-far B, Vahabzadeh G, Momtaz S, Farid M, Rafiemanesh H, Goudarzvand M. In-Vitro Studying Toxicity of Herbal Extracts Mixture in Normal Environment and Protective Effect of Mixtures in High-Glucose Environment. *ijldl*. 2025; 25(3):263-272.

* **نویسنده مسئول:** مهدی گودرزوند، آدرس: کرج، بلوار مؤذن، انتهای خیابان بوعلی غربی، پردیس دانشگاه علوم پزشکی البرز، دانشکده پزشکی، کد پستی: ۳۱۴۹۹۶۹۴۱۵، تلفن: ۰۲۶۳۴۱۹۸۳۰۲، پست الکترونیک: m.godarzvand@abzums.ac.ir

مقدمه

بیماری دیابت یکی از شایع‌ترین اختلالات غدد اندوکراین است و سالیانه بیش از ۱۰۰ میلیون نفر را مبتلا می‌کند. 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. گزارش‌ها 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 سلول‌های 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 است که در ادامه منجر به مرگ این بیماران نیز می‌شود [۲]. در طول تاریخ روش‌های 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 است. این داروها سازگار عمل متمایزی دارند و باعث بهبود کنترل سطح گلوکز خون می‌شوند. سولفونیل اوره، متفورمین، مهارکننده‌های آلفاگلوکوزیداز، مگلیتینایدها، پراملینتاید، اگزاناتاید، انسولین‌های مخصوص هنگام غذا، تیزولیدیندیون، مهارکننده‌های DPP4، لیراگلتاید و انسولین‌های ترکیبی سطح هم قند خون ناشتا و هم بعد از غذا را کاهش می‌دهند [۳]. اما اثرات جانبی این دسته از داروها مانند چاقی، نارسایی قلبی، مشکلات دستگاه گوارش، اسیدوز متابولیک و افزایش یا کاهش قند خون می‌تواند 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 مؤثر ضروری به نظر می‌رسد. از گیاهان

دارویی که به نظر می‌رسد در درمان و کنترل دیابت نقش مؤثری ایفا کنند، می‌توان شنبلیله، قره‌قاپ، خارمریم، گزنه، بادرنجبویه و هندوانه ابوجهل را نام برد [۹-۶]. اثرات مثبت هر کدام از گیاهان نامبرده در حفاظت از سلول‌ها 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 راحت‌تر برای بیماران دیابتی است.

روش‌ها

نوع مطالعه

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

مخلوط عصاره گیاهی

بذر گیاه شنبلیله، برگ گیاه قره‌قاپ، بذر گیاه خارمریم، بذر گیاه گزنه، برگ گیاه بادرنجبویه و میوه هندوانه ابوجهل خریداری شد. سپس گونه گیاهان توسط کارشناس گیاه‌شناسی پژوهشکده گیاهان دارویی تأیید و کد هرباری می از آنها تهیه شد.

کد هرباریوم گیاهان مورد استفاده

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

آماده‌سازی مخلوط عصاره گیاهی

عصاره‌گیری

ابتدا گیاهان تهیه شده تحت دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت قرار می‌گیرند. جهت افزایش بازدهی فرایند

ایجاد می‌کنند. این رده سلولی سالیان سال است که به‌عنوان 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 در پلیت‌های ۹۶ تایی کشت داده و بعد از ۲۴ ساعت حجم‌های 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 است 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 است [۶].

بررسی زنده‌مانی 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، به‌دنبال خروج محیط کشت رویی، واکنش با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر^۱ DMSO متوقف گردید. این محلول باعث حل شدن رسوب کروموفور فورمازان بنفش رنگ در سلول‌ها شده و میزان جذب توسط دستگاه الیزا پلیت ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج حاصله به‌صورت درصد مقادیر حاصل از کنترل بیان می‌گردد [۶].

بررسی تعیین IC-50 (Half Maximal Inhibitory Concentration) به‌منظور تعیین IC-50، یعنی غلظتی از دارو که در حضور آن ۵۰ درصد از رشد سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل مهار شده باشد. بنابراین برای یافتن دوز مناسب جهت آزمایشات بعدی، سلول‌ها به‌مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در پلیت ۹۶ خانه‌ای، با غلظت‌های مختلفی از دارو تیمار گردیدند. سپس به‌دنبال سنجش مهار احیاء MTT مقدار IC-50 با استفاده از رابطه زیر تعیین شد:

عصاره‌گیری، گیاهان خشک شده باید آسیاب شده و تبدیل به پودر شوند. پودر حاصل با اتانول ۹۵٪ ترکیب شده و به‌مدت ۲۴ ساعت در فریزر و در دمای خیلی پایین ۸۵- درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد. در طی این مدت تمامی مواد محلول در حلال غیر قطبی اتانول از پودر گیاه خارج می‌شود. سپس جهت خالص‌سازی با استفاده از پمپ خلغ و قیف بوخنر، از کاغذ صافی عبور داده شده سپس توسط دستگاه Spray-Dryer، اتانول از محلول جدا شده و فقط پودر عصاره باقی می‌ماند [۱۰].

آماده‌سازی محلول عصاره جهت آزمایش

جهت استفاده از عصاره گیاهان شنبلیله، قره‌قاپ، 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 آنتی‌اکسیدانی هر گیاه دیده شده است تعیین می‌شود. دوزهای بهینه مصرف هر گیاه: دوز مصرفی شنبلیله ۱۰۰۰ میلی‌گرم در روز، دوز مصرفی قره‌قاپ 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 است. 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 قره‌قاپ، 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 غلظت‌های 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.

کشت و تیمار سلولی

رده سلولی مورد استفاده در این مطالعه مدل سلولی PC12 است که از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌های PC12 به‌طور برگشت‌پذیری به فاکتورهای تمایزی عصبی از جمله فاکتورهای نوروتروفیک مثل NGF پاسخ داده و فنوتیپ عصبی

¹ Dimethyl sulfoxide

= درصد مهار تکثیر سلولی

$$100 \times \frac{\text{میانگین جذب (} 570 \text{ نانومتر) در چاهک های دارو گرفته}}{\text{میانگین جذب (} 570 \text{ نانومتر) در چاهک های کنترل}}$$

آنالیز آماری

در این مطالعه، به منظور آنالیز آماری از نرم‌افزار گراف پد ورژن ۸ استفاده شد. برای تأیید نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگراف-سیمنوف استفاده شد. برای آنالیز داده‌های اثر عصاره در محیط بدون گلوکز و حاوی گلوکز در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از آنالیز واریانس با اندازه‌گیری 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 نرم‌افزار گراف پد رسم گردید.

یافته‌ها

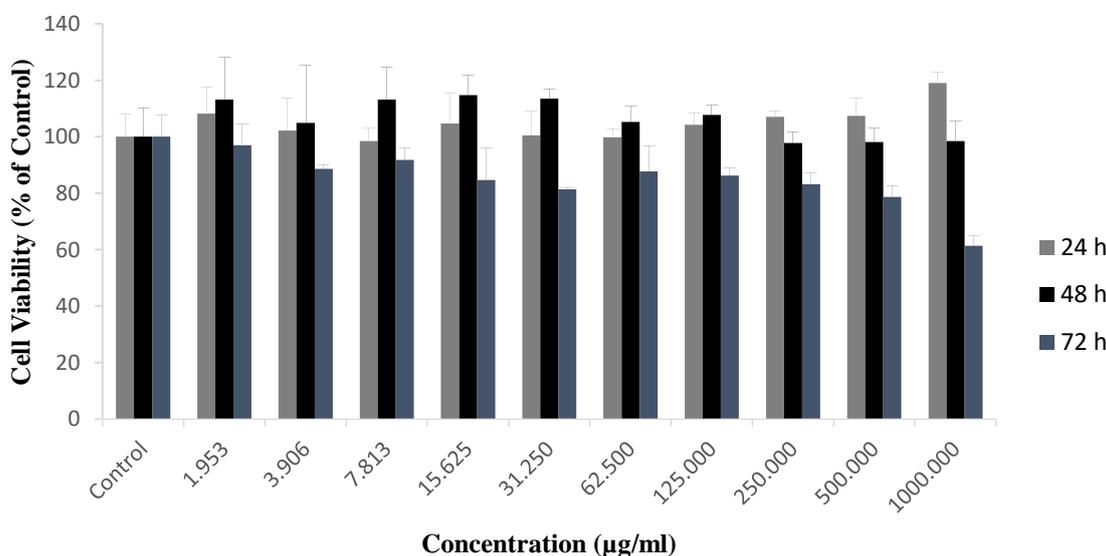
بررسی سمیت مخلوط عصاره گیاهی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از کشت رده سلولی PC12

به منظور بررسی سمیت مخلوط عصاره گیاهی، سلول‌های PC12

در محیط کشت بدون افزودن گلوکز اضافی، در معرض دوزهای مختلف مخلوط عصاره قرار گرفتند. زنده‌مانی 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 اندازه‌گیری تکراری (Repeated Measures) با تست تعقیبی Tukey مربوط به زنده‌مانی سلول PC12 پس از انکوباسیون با مخلوط عصاره گیاهی برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد که میزان زنده‌مانی سلولی در هیچ یک از دوزهای عصاره مورد نظر، بدون حضور گلوکز، کمتر از ۵۰٪ نبوده است و کاهش معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۱). در این مطالعه IC-50 بیشتر از ۱۰۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر تعیین شد که مؤید این مطلب است که بیشترین دوز مخلوط عصاره‌های ۶ گیاه، خطر سمی ندارد (> IC-50 1000).

بررسی میزان زنده‌مانی سلول PC12 پس از انکوباسیون با مخلوط عصاره گیاهی



شکل ۱- اثرات انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مخلوط عصاره گیاهی بر میزان زنده‌مانی سلول PC12

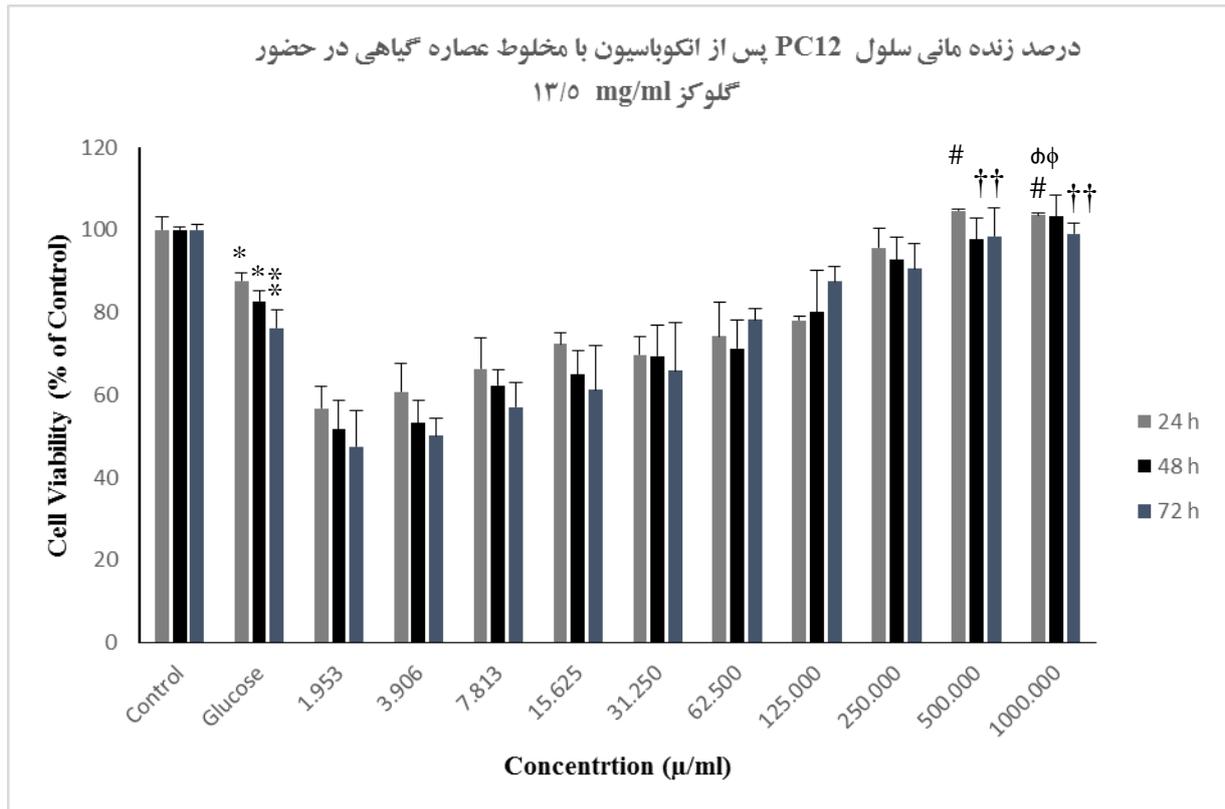
زنده‌مانی سلولی در هیچ یک از دوزهای عصاره مورد نظر کمتر از ۵۰٪ نبوده است و کاهش معنی‌داری مشاهده نشد. داده‌ها به صورت Mean ± SD ارائه شده است

نتایج آزمون آنالیز واریانس با اندازه‌گیری تکراری (RM) با تست تعقیبی Tukey مربوط به زنده‌مانی سلول PC12 پس از انکوباسیون با مخلوط عصاره گیاهی برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲

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

کنترل مثبت افزایش داشته است (برای دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در زمان ۲۴ ساعت $P\text{-Value} < 0/05$ ، برای دوز ۱۰۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در زمان ۴۸ ساعت $P\text{-Value} < 0/01$ و برای دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در زمان ۷۲ ساعت $P\text{-Value} < 0/01$). ضمناً افزایش زنده‌مانی سلولی برای دوز ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نیز مشاهده شد، هرچند این افزایش معنی‌دار نبود (شکل ۲).

ساعت، در حضور گلوکز نشان داد که میزان زنده‌مانی سلولی (Cell Viability) در گروه کنترل مثبت (گروه حاوی گلوکز ۱۳/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته است ($P\text{-Value} < 0/05$) برای ۲۴ و ۴۸ ساعت و برای ۷۲ ساعت ($P\text{-Value} < 0/01$) اما میزان زنده‌مانی سلولی در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره گیاهی با دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای هر سه زمان به صورت معنی‌داری در مقایسه با گروه



شکل ۲- اثر حفاظتی مخلوط عصاره گیاهی پس از انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر میزان زنده‌مانی سلول PC12 در محیط حاوی گلوکز ۱۳/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

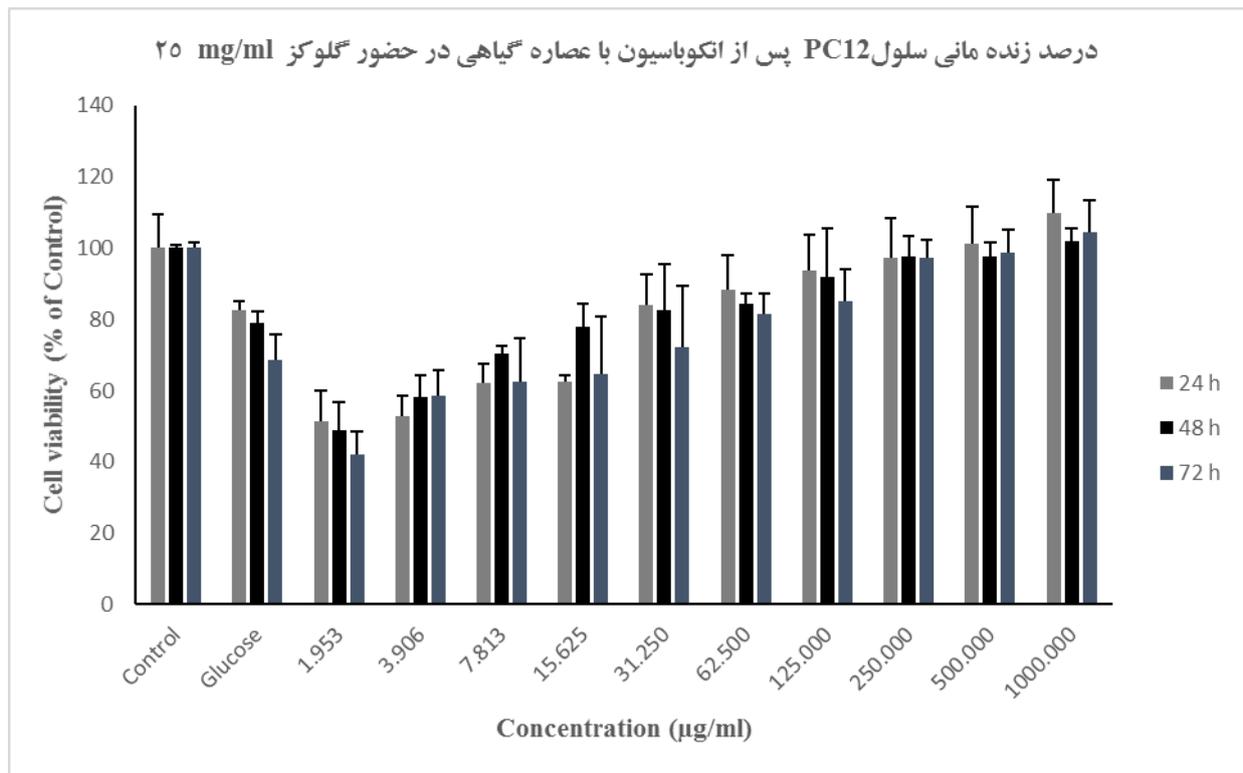
زنده‌مانی سلول PC12 پس از انکوباسیون با مخلوط عصاره گیاهی برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در حضور گلوکز نشان داد که میزان زنده‌مانی سلولی در گروه حاوی گلوکز، کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته است ($P\text{-Value} < 0/05$) برای ۲۴ و ۴۸ ساعت و برای ۷۲ ساعت ($P\text{-Value} < 0/01$) اما میزان زنده‌مانی سلولی در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره گیاهی با دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای هر سه زمان به صورت معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل مثبت (حاوی گلوکز ۱۳/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) افزایش داده است (برای دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در زمان ۲۴ ساعت $P\text{-Value} < 0/05$ ، برای دوز ۱۰۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در زمان ۴۸ ساعت $P\text{-Value} < 0/01$) و برای دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در زمان ۷۲ ساعت $P\text{-Value} < 0/01$). **
 $P\text{-Value} < 0/05$ و $P\text{-Value} < 0/01$ *P-Value اختلاف معنی‌دای نسبت به گروه کنترل. $P\text{-Value} < 0/05$ # $P\text{-Value} < 0/01$ φ $P\text{-Value} < 0/01$ †† اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مثبت به ترتیب برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. داده‌ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ارائه شده است.

انکوباسیون با مخلوط عصاره گیاهی برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، در حضور گلوکز نشان داد که میزان زنده‌مانی سلولی (Cell Viability) در گروه کنترل مثبت (گروه حاوی گلوکز ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته است ($P\text{-Value} < 0/05$) برای ۲۴ و ۴۸ ساعت و

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 اندازه‌گیری تکراری (RM) با تست تعقیبی Tukey مربوط به زنده‌مانی سلول PC12 پس از

مثبت برای زمان ۲۴ ساعت، $P\text{-Value} < 0.01$ نسبت به گروه کنترل مثبت برای زمان ۴۸ ساعت و $P\text{-Value} < 0.01$ و $P < 0.05$ نسبت به گروه کنترل مثبت برای زمان ۷۲ ساعت. داده‌ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ارایه شده است. ضمناً بهبود یا افزایش زنده‌مانی سلولی برای دوزهای ۱۲۵، ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و دوز ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای زمان ۲۴ ساعت مشاهده شد هر چند که این افزایش معنی‌دار نبود (شکل ۳).

اما میزان زنده‌مانی سلولی در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره گیاهی با دوز ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به صورت معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل مثبت (حاوی گلوکز ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) افزایش داشته داده است. دوزهای ۵۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر عصاره گیاهی نیز در زمان ۷۲ ساعت افزایش معنی‌داری را نشان دادند. $P\text{-Value} < 0.01$ و $P\text{-Value} < 0.05$ اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه کنترل. $P\text{-Value} < 0.05$ نسبت به گروه کنترل



شکل ۳- اثر حفاظتی مخلوط عصاره گیاهی پس از آنکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر میزان زنده‌مانی سلول PC12 در محیط حاوی گلوکز ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

زنده‌مانی سلول PC12 پس از آنکوباسیون با مخلوط عصاره گیاهی برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در حضور گلوکز نشان داد که میزان زنده‌مانی سلولی در گروه حاوی گلوکز، کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته است ($P\text{-Value} < 0.05$ برای ۲۴ و ۴۸ ساعت و $P\text{-Value} < 0.01$ برای ۷۲ ساعت) اما میزان زنده‌مانی سلولی در گروه دریافت‌کننده عصاره گیاهی با دوز ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به صورت معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل مثبت (حاوی گلوکز ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) افزایش داشته داده است. دوزهای ۵۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر عصاره گیاهی نیز در زمان ۷۲ ساعت افزایش معنی‌داری را نشان دادند. $P < 0.01$ و $P < 0.05$ اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه کنترل. $P\text{-Value} < 0.05$ نسبت به گروه کنترل مثبت برای زمان ۲۴ ساعت، $P\text{-Value} < 0.01$ نسبت به گروه کنترل مثبت برای زمان ۴۸ ساعت و $P\text{-Value} < 0.01$ و $P < 0.05$ نسبت به گروه کنترل مثبت برای زمان ۷۲ ساعت. داده‌ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ارایه شده است.

بحث

زندگی مردم، به‌طور 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

دیابت یکی از بیماری‌های متابولیک شایع در سطح جهان است. این بیماری با توجه به تغییر عادات غذایی و سبک

سیلیبین هم مورد بررسی قرار گرفت که $IC-50 = 210 \mu g/ml$ داشت [۱۴].

هندوانه ابوجهل نیازمند احتیاط بیشتری است. در بررسی‌های تاکنون صورت گرفته، میزان سمیت عصاره میوه این گیاه به نسبت سایر گیاهان در غلظت‌های پایین‌تری ظاهر می‌شود. از عوارض مصرف بیش از حد این میوه می‌توان به ناراحتی‌های گوارشی شدید و اختلال عملکرد کبد و کلیه اشاره کرد [۱۵]. به طوری که در پژوهش انجام شده توسط Fallah Huseini و همکاران، میزان $IC-50$ عصاره اتیل استات این میوه ۴۹۷ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شده است [۶].

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. همان‌گونه 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 می‌شود. برای انجام این کار به طور معمول غلظت‌های مختلف گلوکز استفاده می‌شود. این مقدار براساس شرایط طراحی آزمایش متغیر است. در این مطالعه از غلظت‌های $13/5$ و 25 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای اعمال استرس بر سلول‌های عصبی استفاده شد. سپس قرار دادن ترکیب حاصل با عصاره گیاهی، اثرات آن ثبت و در صورت مشاهده بهبود معنی‌دار در زنده‌مانی سلول‌ها مقدار و دوز آن گزارش می‌شود. از سازکار 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 زنده‌مانی نورون‌ها می‌شود [۱۶].

در مطالعه Kavirasan و همکاران، اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره بذر شنبلیله را بر روی سلول‌های کبد موش صحرایی مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه مشخص شد که بذر شنبلیله حاوی مواد آنتی‌اکسیدان است و از ساختار سلولی را در برابر استرس اکسیداتیو حفاظت می‌کند [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

اثرات گسترده‌ای دارد که کیفیت زندگی و امید به زندگی مبتلایان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. ناینایی، نارسایی کلیوی، بیماری‌های قلبی-عروقی و آسیب به اعصاب مرکزی و محیطی (نوروپاتی) می‌توان نام برد [۲]. مدیریت و کنترل عوارض این بیماری هزینه سرسام آوری بر دوش جامعه و سیستم درمانی می‌گذارد. تا به امروز داروها و روش‌های درمانی بسیاری برای کنترل این بیماری و عوارض آن معرفی شده است و هنوز جست‌وجو برای یافتن روش‌های بهتر و مؤثرتر و با عوارض کمتر ادامه دارد [۴، ۱۱، ۲].

در این مطالعه با تمرکز بر عارضه مربوط به سیستم عصبی این بیماری، سعی بر اثبات اثرات پیشگیری‌کننده و حفاظت‌کننده مخلوطی از عصاره‌های گیاهان ارزان و در دسترس در داخل کشور، از جمله شنبلیله، قره‌قاپ، خارمریم، گزنه، بادرنجبویه و هندوانه ابوجهل استفاده شده است. در قدم اول ابتدا باید از عدم آسیب‌رسان 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، تعیین‌کننده میزان حداکثر دوز مجاز برای استفاده از آن ماده در پژوهش‌هایی در شرایط آزمایشی مشابه است. به طور مثال در پژوهشی که توسط Auddy و همکاران 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 تخریب‌کننده سیستم عصبی پرداختند. در این مطالعه مشخص شد که گیاه شب‌بو با $IC-50 = 16.07 \mu g/ml$ بیشترین میزان سمیت را بین گیاهان پژوهش داشت [۱۲]. طی پژوهش دیگری که در سال ۲۰۱۳ به انجام رسید، عصاره متانولی ۲۰ گیاه با فعالیت آنتی‌اکسیدانی شناخته شده که به طور سنتی در بیماران با اختلالات شناختی استفاده می‌شدند، 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 می‌کند [۱۳]. مطالعه مشابه در زمینه تعیین سمیت برای گیاه خارمریم در سال ۲۰۱۶، انجام شد. از ماده مؤثره اصلی این گیاه که سیلیمارین نام دارد، طی ۲۴ ساعت حضور در محیط کشت PC12، میزان $IC-50 > 1000 \mu g/ml$ گزارش شد. در همین مطالعه یکی از اجرای اصلی سیلیمارین، یعنی

را هم داشته است [۹].

از طرفی در مطالعه‌ای که Khalki 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 این حال در نوزادان متولد شده از این موش‌ها، اختلالات تولید مثلی و اثرات احتمالی تراژژنیک مشاهده شده است [۱۸].

در مورد گیاه گزنه، مطالعات متعددی انجام شده است که در بعضی از آنها به بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گزنه پرداخته شده است، و نشان دادند که گزنه فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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 [۱۹، ۱۱]. در مطالعه دیگری که هم به صورت درون‌تنی (In-vivo) و هم برون‌تنی (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 آنتی‌اکسیدانی 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 می‌دهد. 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 مطالعه‌ای که Shakeri در سال ۲۰۱۶ انجام داد نشان داد که این گیاه سرشار از ترکیبات فلاونوئید و فنولیک اسید است [۲۱]. اثرات آنتی‌اکسیدانی و حفاظت سیستم عصبی این گیاه در استرس اکسیداتیو ناشی از آب اکسیژنه و همچنین اثرات حفاظتی آن در برابر $A\beta$ که در بیماران مبتلا به آلزایمر موجب آسیب به غشاء نوروها می‌شود، مورد بررسی قرار گرفته است [۲۲، ۲۳].

در مطالعه‌ای که در مورد هندوانه ابوجهل توسط Fallah Huseini و همکاران انجام شد، مشخص گردید که عصاره متانولی این گیاه میزان زنده‌مانی سلول‌های PC12 را در شرایطی که این سلول‌ها تحت تأثیر غلظت بالای گلوکز بودند به‌طور معنی‌داری 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 موش‌ها منجر به کاهش وزن و آسیب به کلیه و کبد گردید [۲۴].

در سال ۲۰۱۳، Ghorbani و گروهی از پژوهشگران با ترکیب عصاره‌های ۱۲ گیاه که از میان آنها می‌توان به هندوانه ابوجهل، بادرنجبویه، شنبلیله، قره‌قاط و گزنه اشاره کرد، سعی بر کنترل اختلالات چربی خون در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت بودند، پرداختند. نتایج این پژوهش مشخص کرد که این ترکیب گیاهی اثر قابل ملاحظه بر آنزیم‌های کبدی نداشته است. اما در نتیجه مصرف این ترکیب گیاهی نه تنها وضعیت چربی خون در موش‌های 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 نعنائیان 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 گیاهان در مهار آنزیم آلفا گلیکوزیداز است. مشخص شد که میزان مهار این آنزیم رابطه مستقیم با میزان ترکیبات فنل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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 سلول‌های 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 آنتی‌اکسیدانی و سمیت آنها بررسی کرده‌اند. به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که مخلوط گیاهان شنبلیله، قره‌قاط، خارمریم، گزنه، بادرنجبویه و هندوانه ابوجهل در دوزهای استفاده شده در این مطالعه، اثر کاهش زنده‌مانی در محیط کشت PC12 نداشته است. همچنین با استفاده از این مخلوط عصاره‌های گیاهان می‌توان از آسیب ناشی استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط غلظت‌های بالای گلوکز، تا حدودی جلوگیری کرد.

سپاسگزاری

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 فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی البرز برای تأمین مالی پروژه کمال تشکر و قدردانی را دارند. ضمناً نویسندگان

مقاله هیچ‌گونه تعارض منافع برای انتشار این مقاله ندارند.

References

- 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.
- Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2010; 33(Supplement_1):S62-S9.
- 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.
- Padhi S, Nayak AK, Behera A. Type II diabetes mellitus: a review on recent drug based therapeutics. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020; 131:110708.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Rahimi R, Amin GR, Shams Ardekani MR. A review on *Citrullus colocynthis* Schrad: from traditional Iranian medicine to modern phytotherapy. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2012; 18(6): 551-4.
- 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.
- Kaviarasan S, Naik G, Gangabagirathi 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.