ORIGINAL ARTICLE

Impact of Extraction Methods on Polyphenol Contents and Antioxidant Activities of Melissa Officinalis and Evaluation of Their Antihypoxic Activities in Mice

Ali Mirzazadeh[1,2]
Mohammad Hossein Hosseinzadeh[3]
Mohammad Eghbali[3]
Mohammad Ali Ebrahimzadeh[4,2]
Omran Habibi[5,2]
Ahmad Ramezani[6]
Amin Barani[7]

[1] Pharmacy Student, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] PharmD, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.
[4] Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] Associate Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[6] Clinical Pharmacist, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[7] Ph.D Student of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received January 2, 2023; Accepted March 2, 2024)

Abstract

Background and purpose: The role of free radicals in causing many diseases has been well proven. These particles can destroy biomolecules. Antioxidants can prevent these harmful effects. Considering that plants are a source of natural antioxidants, research in this field is increasing. Hypoxia means the reduction of oxygen in the body tissues, which can lead to dysfunction of the body. Hypoxia causes a significant increase in reactive oxygen species, thus, antioxidants are considered anti-hypoxia. *Melissa officinalis* L. is a well-known medicinal plant of Lamiaceae. Leaves of this plant have been widely used for the treatment of cardiovascular and respiratory problems and as a memory enhancer. This investigation was carried out to examine the impact of extraction on total phenolic contents and antioxidant activities of M. officinalis aerial parts. In addition, the Antihypoxic activities of all extracts were evaluated in three models in mice.

Materials and methods: In this experimental study, dried aerial parts were extracted by three different methods, i.e. maceration method, ultrasonic-assisted, and soxhlet-assisted extraction. Antioxidative capacity was assessed by utilizing DPPH free radicals scavenging and reducing power. The total phenolic and flavonoid contents were also determined. The protective effects of extract in the initial dose of 62.5-250 mg/kg were evaluated against hypoxia-induced lethality in mice by three experimental models of hypoxia, i.e. asphyctic, haemic, and circulatory. The latencies for death for mice in minutes were recorded. The Institutional Animal Ethical Committee of Mazandaran University of Medical Sciences approved the experimental protocol. In the asphyctic hypoxic model, phenytoin (50 mg/kg, i.p.) and in the next two tests, propranolol (20 and 30 mg/kg, i.p.) were used as the positive control. In all tests, Normal saline (0.5 ml, i.p.) was used as the negative control. Analysis of variance was performed followed by Newman-Keuls multiple comparisons (by GraphPad Prism 8) were used to determine the differences in means.

Results: Meceration method and ultrasonic($P<0.0001$) assisted extraction were the best methods for extraction of polyphenols. In DPPH radical scavenging activity, soxhlet-assisted extraction and extraction by the meceration method were more efficient than ultrasonic-assisted extraction($P>0.05$). In the hemic model, none of the extracts showed any activity. Even the soxhlet-assisted extract at the dose of 250 mg/kg, even though it increased the death time by about one minute, could not cause a significant effect($P>0.05$). In the circulatory model, none of the extracts showed any effect at the lowest tested dose i.e. 62.5 mg/kg but all the extracts showed a very potent activity at higher doses. All the extracts at a dose of 250 mg/kg showed a much stronger effect than propranolol 30 mg/kg. In the asphyctic model, all the extracts showed very good effects so we had to reduce the dosage many times. The extract obtained from the maceration method at a dose of 1.95 mg/kg and ultrasonic-assisted and soxhlet assisted extracts at the dose of 7.81 mg/kg showed the same activity as phenytoin($P>0.05$).

Conclusion: The findings of the current study indicated that extraction methods significantly affect antioxidant capacities and total phenolic contents. The ultrasonic-assisted extraction and maceration method were the most suitable methods for extracting phenolic and flavonoid compounds from this plant. All extracts showed high antioxidant activities. All extracts showed very strong effects in the asphyctic model.

Keywords: Melissa officinalis, Extraction methods, Antioxidant, Antihypoxia, Asphyctic hypoxia, Circulatory hypoxia, haemic hypoxia

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 34 (231): 22-37 (Persian).

Corresponding Author: Mohammad Ali Ebrahimzadeh - Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: zadeh20@gmail.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-21]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و چهارم شماره ۲۳۱ فروردین سال ۱۴۰۳ (۳۷-۲۲)

اهمیت روش استخراج بر محتوای پلی فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی بادرنجبویه و ارزیابی فعالیت آنتی هیپوکسی آن‌ها در موش سوری

علی میرزازاده[۱و۲]
محمد حسین حسین زاده[۳]
محمد اقبالی[۳]
محمد علی ابراهیم زاده[۴و۲]
دکتر عمران حبیبی[۵و۲]
احمد رمضانی[۶]
امین بارانی[۷]

چکیده

سابقه و هدف: نقش رادیکال‌های آزاد در ایجاد بسیاری از بیماری‌ها به خوبی اثبات شده است. این ذرات توانایی تخریب بیومولکول‌ها را دارند. آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند مانع از این اثرات زیان آور شوند. نظر به این که گیاهان منبع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشد تحقیقات در این زمینه رو به افزایش است. هیپوکسی به معنای کاهش اکسیژن موجود در بافت‌های بدن بوده که می‌تواند به اختلال در عملکرد بدن منجر شود. هیپوکسی موجب افزایش قابل ملاحظه ذرات فعال اکسیژن می‌گردد، پس آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان آنتی‌هیپوکسی مطرح می‌باشند. بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) گیاه دارویی شناخته شده از خانواده Lamiaceae بوده که برای درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله قلبی عروقی و در مشکلات تنفسی و همچنین به عنوان تقویت‌کننده حافظه مورد استفاده می‌گیرد. این مطالعه به منظور بررسی تأثیر روش استخراج بر محتوای تام فنلی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه طراحی شده است. فعالیت آنتی هیپوکسی تمامی عصاره‌ها در سه مدل در موش بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، اندام هوایی خشک شده بادرنجبویه به سه روش ماسیراسیون، با کمک سوکسله و با کمک امواج التراسونیک با حلال متانول عصاره‌گیری شدند. فعالیت آنتی اکسیدانی تمامی عصاره‌ها با روش بدام اندازی رادیکال آزاد DPPH و تست احیاکنندگی ارزیابی شد. محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی تعیین گردید. اثر محافظتی عصاره‌ها در دوزهای اولیه ۲۵۰ mg/kg–۶۲/۵ در مقابل مرگ و میر ناشی از هیپوکسی در موش سوری با سه مدل خفگی، خونی و جریان خونی مورد ارزیابی قرارگرفت. زمان زنده ماندن موش‌ها به دقیقه اندازه‌گیری شد. کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران نیز پروتکل آزمایشی را تایید کرد. درتست هیپوکسی خفگی، فنی‌توئین (۵۰ میلی‌گرم برکیلوگرم، داخل صفاقی) و در دو تست بعدی پروپرانولول (۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم برکیلوگرم، داخل صفاقی) به‌عنوان کنترل مثبت به کار رفتند. در تمامی تست‌ها، نرمال سالین به‌عنوان کنترل منفی به‌کار گرفته شد. آنالیز واریانس یک سویه و متعاقب آن نیومن کولز با کمک نرم‌افزار گراف پد پریزم ۸ به منظور تعیین اختلاف بین میانگین‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: برای استخراج ترکیبات پلی‌فنلی، روش خیساندن و عصاره‌گیری به روش التراسونیک($P<۰/۰۰۰۱$) و در تست بدام اندازی رادیکال آزاد DPPH عصاره‌های حاصل از روش سوکسله و خیساندن موثر از روش دیگر بودند. در تست قدرت احیا کنندگی، تمامی عصاره فعالیت بالایی از خود نشان دادند($P>۰/۰۵$). در مدل خونی، هیچ‌یک از عصاره‌ها اثری از خود نشان ندادند. حتی عصاره حاصل از روش سوکسله در دوز ۲۵۰mg/kg، علی‌رغم این که زمان مرگ را حدود یک دقیقه افزایش داد، نتوانست تغییر معنی‌داری ایجاد کند($P>۰/۰۵$). در مدل گردش خونی، هیچ‌یک از عصاره‌ها در پایین‌ترین دوز تست شده یعنی ۶۲/۵ mg/kg اثری از خود نشان نداند اما تمامی عصاره‌ها در دوزهای بالاتر اثر بسیار قوی از خود نشان دادند. تمامی عصاره‌ها در دوز ۲۵۰ mg/kg اثری به مراتب قوی‌تر از پروپرانولول ۳۰ mg/kg از خود نشان دادند. در مدل خفگی، تمامی عصاره‌ها اثرات بسیار خوبی از خود نشان دادند به گونه‌ای که بارها مجبور به کاهش دوز شدیم. عصاره حاصل از روش خیساندن در دوز ۱/۹۵ mg/kg و عصاره‌های حاصل از روش سوکسله و روش التراسونیک در دوز ۷/۸۱ mg/kg اثری مشابه فنی‌توئین از خود نشان داد($P>۰/۰۵$).

استنتاج: باتوجه به نتایج این مطالعه مشخص شد که روش استخراج تأثیر زیادی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی ومحتوای تام‌فنلی و فلاونوئیدی دارد. روش استخراج با کمک التراسونیک و روش خیساندن به ترتیب مناسب‌ترین روش‌ها برای استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی از این گیاه بود. تمامی عصاره‌ها اثرات آنتی‌اکسیدانی بالایی نشان دادند. عصاره‌ها اثر بسیار خوبی در تست خفگی از خود نشان دادند.

واژه های کلیدی: بادرنجبویه، روش استخراج، آنتی‌اکسیدان، آنتی هیپوکسی، هیپوکسی خفگی، هیپوکسی گردش خونی، هیپوکسی خونی

مولف مسئول: محمدعلی ابراهیم زاده– ساری، کیلومتر ۱۷ جاده فرح‌آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، مرکز تحقیقات علوم دارویی E-mail: zadeh20@gmail.com
۱. دانشجوی داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دکتر داروساز، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. دانشیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۶. متخصص داروسازی بالینی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۷. دستیار شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۴۰۲/۱۰/۱۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۴۰۲/۱۰/۱۳ تاریخ تصویب : ۱۴۰۲/۱۲/۱۲

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-21]

مقدمه

نقش رادیکال‌های آزاد در ایجاد بسیاری از بیماری‌ها به‌خوبی اثبات شده است. برخی واکنش‌های بیوشیمیایی در بدن اکسیژن فعال تولید نموده که توانایی تخریب بیو مولکول‌ها را دارند. آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند مانع از این اثرات زیان‌آور شوند. این مواد موجب به دام اندازی رادیکال‌های آزاد شده و بدین‌وسیله موجب رفع سمیت می‌شوند. غذاهای غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در پیشگیری از بیماری‌های قلبی- عروقی، سرطان، بیماری های دژنراتیو مانند پارکینسون و الزایمر بازی می‌کنند. نظر به این که گیاهان منبع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشد، تحقیقات در این زمینه رو به افزایش است(۲،۱). هیپوکسی به معنای کاهش اکسیژن موجود در بافت‌های بدن بوده که می‌تواند به اختلال در عملکرد بدن منجر شود و ممکن است باعث ناهنجاری‌های فیزیولوژیکی مختلف گردد. هیپوکسی با پاتولوژی بیماری قلبی- عروقی و سکته مغزی مرتبط بوده و منجر به مرگ می‌شود(۳). هیپوکسی موجب افزایش قابل ملاحظه ذرات فعال اکسیژن می‌گردد، پس آنتی‌اکسیدان‌ها به‌عنوان آنتی‌هیپوکسی مطرح می‌باشند(۴). اخیرا از چندین گیاه با اثرات آنتی اکسیدانی بالا، فعالیت آنتی‌هیپوکسی جالبی گزارش شده است(۶،۵).

بادرنجبویه با نام علمی *Melissa officinalis* L. یک گیاه دارویی شناخته شده از خانواده Lamiaceae است. بیش از ۲۰۰۰ سال است که از برگ‌های معطر این گیاه در آشپزی برای طعم دادن به غذاها استفاده می‌شود. در طب سنتی از این گیاه برای درمان بیماری‌های روانی و CNS، مشکلات قلبی عروقی و تنفسی، انواع سرطان‌ها و به عنوان تقویت کننده حافظه، قلب، ضد افسردگی و خواب‌آور استفاده می‌شود(۷). در حال حاضر این گیاه در سراسر جهان کشت می‌گردد. در ایران نیز از جمله گیاهان بومی شمال ایران است و عموماً قسمت بالای زمین (اندام هوایی) به‌طور سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از آن‌ها عمدتاً می‌توان دم کرده، چای یا جوشانده تهیه کرد. مهم‌ترین دسته ترکیبات موجود در گیاه، آلکالوئیدها، تانن‌ها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها و ترکیبات فنلی هستند(۱۰-۸). تنوع این مولکول‌های زیست فعال آن‌ها را به یک نامزد امیدوارکننده برای توسعه مواد مغذی و آرایشی تبدیل می‌کند(۹). رزمارینیک اسید، اسید اورسولیک و اسید اولئانولیک از اندام‌های هوایی بادرنجبویه جدا شده است(۱۱). اسید کافئیک، اسید پاراکوماریک و ترکیبات فعال آنتی‌اکسیدانی، در برگ خشک بادرنجبویه شناسایی و تعیین مقدار شده است(۱۳،۱۲). برگ‌ها حاوی اسید گالیک، اسید کلروژنیک، اسید کافئیک، اسید رزمارینیک، اسید الاژیک، روتین، ایزوکورسیترین، کوئرستین و کامفرول هستند(۱۴). بادرنجبویه دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قوی می باشد. علی‌رغم فعالیت خوب آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنتی‌هیپوکسی از این گیاه گزارش نشده است. در این تحقیق از اندام هوایی بادرنجبویه استفاده شد. با توجه به این‌که چندین روش برای تهیه عصاره گیاهی وجود دارد و هر روش در مقایسه با دیگر روش‌ها از محدودیت‌ها و مزایای منحصر به فرد برخوردار می‌باشد، در سال‌های اخیر توجه فراوانی به ارائه روش‌های جدید استخراج شده است به گونه‌ای که بیش‌ترین اجزای اصلی در کوتاه‌ترین زمان ممکن با کم‌ترین قیمت به دست آید(۲).

در این تحقیق عمل استخراج با روش کلاسیک (ماسیراسیون)، استفاده از حمام الترا سوند و هم‌چنین با روش سوکسله انجام شده است. میزان تام‌فنلی و فلاونوئیدی عصاره‌های حاصل سنجیده شد و سپس فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها با یکدیگر مقایسه گردید. در نهایت فعالیت آنتی‌هیپوکسی تمامی عصاره‌ها در سه روش مختلف (Haemic، Asphyctic و Circulatory) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

نمونه گیاهی

در این مطالعه تجربی، اندام هوایی گیاه بادرنجبویه

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-21]

از باغ گیاهان دارویی بهدیس (بهشهر) خریداری و توسط دکترای سیستماتیک گیاهی (آقای دکتر بهمن اسلامی) تایید شد. اندام هوایی به قطعات ریز تبدیل شد و سپس در آون در دمای ۴۰ درجه برای مدت سه روز خشک گردید. در نهایت عصاره‌گیری با روش‌های، خیساندن، اولتراسونیک و سوکسله با استفاده از متانول خالص انجام شد.

تهیه عصاره به روش خیساندن

در این روش ۱۰ گرم از برگ خشک گیاه با ۴۰ میلی‌لیتر متانول مخلوط شد. مجموعه به‌مدت ۲۴ ساعت رها گردید. روز بعد فاز آلی (متانول) جدا و مجددا حلال جدید اضافه شد. این عمل برای سه بار تکرار شد. در روز آخر، مجموعه حلال آلی توسط دستگاه تبخیرکننده چرخان حذف گردید(۲،۱).

تهیه عصاره به روش اولتراسونیک

در این روش، از امواج غیر مستقیم اولترا سونیک با فرکانس ۶۰ کیلو هرتز در دمای محیط به مدت یک ساعت استفاده شد. ۱۰ گرم برگ ریز شده گیاه به همراه ۴۰ میلی‌لیتر حلال متانول در بشر قرار داده شد. مجموعه به‌مدت یک ساعت در حمام اولتراسونیک قرار گرفت. سپس محلول صاف گردید و متانول به دست آمده توسط دستگاه تبخیرکننده چرخان حذف گردید(۱۵،۱).

تهیه عصاره به روش سوکسله

در این روش ۱۰ گرم برگ ریز شده گیاه در کاغذ صافی قرار داده شد و سپس در دستگاه قرار گرفت. عمل استخراج با حلال متانول به‌مدت ۶ ساعت ادامه پیدا کرد سپس متانول حاوی مواد استخراج شده توسط دستگاه تبخیرکننده چرخان حذف گردید(۱۵،۱).

تعیین محتوای کلی فنولی و فلاونوئید

سنجش محتوای ترکیبات فنولی از طریق متد فولین سیو کالتیو صورت پذیرفت. غلظت ۱ mg/ml از هر عصاره تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره با ۲/۵ میلی لیتر واکنشگر ۰/۲ نرمال فولین سیو کالتیو مخلوط شد و به‌مدت ۵ دقیقه هم زده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم با غلظت ۷۵ گرم در لیتر اضافه شد. جذب نمونه‌ها پس از ۲ ساعت در دمای اتاق توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر ماوراء بنفش در ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج به‌صورت مقادیر هم ارز با استاندارد اسید گالیک بیان شد. بدین‌صورت که میانگین جذب حاصل در معادله خط به‌دست آمده از ترسیم منحنی استاندارد گالیک اسید قرار داده شد و نتیجه به‌عنوان محتوای تام فنولی عصاره به‌صورت میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره گزارش شد. آزمایشات برای هر عصاره و استاندارد ۳ بار تکرار شد(۱۶). میزان محتوای فلاونوئید هر عصاره از طریق روش رنگ سنجی ارزیابی شد. غلظت ۱ mg/ml از هر عصاره تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد به آن اضافه شد، سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول پتاسیم استات ۱ مولار و در نهایت ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر هم به آن اضافه شد. به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و سپس جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مرئی- ماوراء بنفش اندازه‌گیری شد. کوئرستین به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید به صورت میلی گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره گزارش گردید. آزمایشات ۳ بار تکرار شد و میانگین آن‌ها گزارش شد(۱۶).

ارزیابی میزان توانایی به دام اندازی رادیکال DPPH

برای انجام این آزمایش از رادیکال‌های پایدار DPPH استفاده شد. به ۱ میلی‌لیتر از هر عصاره ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH اضافه شد و مخلوط حاصل به خوبی تکان داده شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک قرار داده شد. سپس جذب مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر UV در ۵۱۷ نانومتر با بلانک متانول

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-21]

قرائت شد. BHA به‌عنوان استاندارد استفاده شدند و میزان IC_{50} به‌معنی غلظتی از هر عصاره که لازم است تا ۵۰ درصد رادیکال‌ها پاکسازی شوند، برای عصاره‌ها تعیین شد. در نهایت درصد به دام‌اندازی رادیکال DPPH طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\left(\frac{A_B - A_S}{A_B}\right)\times 100$$

A_B= جذب بلانک،

A_S= جذب نمونه یا استاندارد(۱۷)

تعیین قدرت احیاء کنندگی

میزان قدرت احیاءکنندگی عصاره‌ها از طریق متد گزارش شده قبلی ارزیابی شد. غلظت‌های مختلف از هر عصاره تهیه شد و با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفاته ۰/۲ مولار با pH ۶/۵ و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد پتاسیم فری سیانید $[K_3Fe(CN_6)]$ مخلوط شد. در دمای ۵۰ درجه به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد، سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول تری کلرواستیک اسید به نمونه‌ها اضافه شد تا واکنش متوقف شود. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از اتمام این مرحله ۲/۵ میلی‌لیتر از قسمت بالای محلول با ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ درصد فریک کلراید به آن اضافه شد. سپس جذب محلول در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. در این آزمایش آسکوربیک اسید با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ µg/ml به‌عنوان استاندارد استفاده شد. آزمایش برای هر نمونه و استاندارد سه بار تکرار شد(۱۷).

حیوان مورد مطالعه

از موش‌های سوری نر با سن حدود ۹ تا ۱۰ هفته‌ای که از بخش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تهیه شده بود، استفاده گردید. گروه‌های مورد مطالعه که در هر گروه ۵ سر موش سوری با وزن ۲۵-۲۱ گرم قرار داده شد، در قفس‌های مجزا تحت وضعیت کنترل شده درجه حرارت (بین ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) و روشنایی (دوره‌ای ۱۲ ساعت روشن ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری شد و پلت غذا و آب جهت تغذیه در دسترس آن‌ها قرار گرفت. تمام مراحل آزمایشی مطابق با دستورالعمل‌های موسسه ملی بهداشت(NIH) درخصوص مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. کمیته اخلاق دانشگاه (کد اخلاق: R.MAZUMS..REC.1398.4975) نیز پروتکل آزمایشی را تایید نمود.

هیپوکسی خفگی

در این تست از دوز اولیه ۶۲/۵ mg/kg از عصاره‌های حاصل از روش‌های خسیاندن، سوکسله والتراسونیک استفاده شد و کاهش دوزها تا زمانی که پاسخ درمانی نسبت به کنترل منفی(نرمال سالین) از نظر آماری یکسان گردد، ادامه یافت. ۳۰ دقیقه بعد از تزریق داخل صفاقی دوزهای مورد نظر از هر عصاره، حیوان در یک محفظه شیشه ای دربسته و مهر و موم شده توسط پارا فیلم (به حجم ۳۰۰ ml) قرار گرفت. از آهک به عنوان جاذب CO_2 استفاده شد تا خفگی صرفا به دلیل کاهش اکسیژن محیط باشد و اسیدوز متابولیک ناشی از افزایش CO_2 در فضای دربسته کوچک، نقشی در مرگ موش‌ها نداشته باشد. موش‌ها بر اثر هیپوکسی تشنج گرفته و مردند. اثر ضدهیپوکسی ترکیب به‌صورت زمان زنده‌بودن موش بیان گردید. نرمال سالین به‌عنوان کنترل منفی و فنی‌توئین (۵۰ mg/kg به‌صورت تزریق داخل صفاقی) به‌عنوان کنترل مثبت به‌کار رفت(۶،۵).

هیپوکسی خونی

از نیتریت سدیم به‌عنوان عامل ایجادکننده هیپوکسی استفاده شد. دوزهای ۲۵۰، ۱۲۵و ۶۲/۵ mg/kg از عصاره‌های حاصل از روش‌های خسیاندن، سوکسله و التراسونیک به کار رفت. ۳۰ دقیقه بعد از تزریق داخل

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-21]

صفاقی دوزهای مورد نظر از هر عصاره به موش، $NaNO_2$ با دوز ۳۶۰ mg/kg به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. اثر ضد هیپوکسی به‌صورت زمان زنده ماندن در مقایسه با گروه کنترل منفی (نرمال سالین) بیان گردید. در این تست پروپرانولول (۲۰ mg/kg) به‌عنوان کنترل مثبت به‌کار رفت(۶،۵).

هیپوکسی وابسته به گردش خون

در این روش از سدیم فلورید به‌عنوان عامل ایجاد کننده هیپوکسی استفاده شد. دوزهای ۲۵۰، ۱۲۵و ۶۲/۵ mg/kg ازعصاره‌های حاصل از روش‌های خیساندن، سوکسله والتراسونیک به‌کار رفت. ۳۰ دقیقه بعد از تزریق داخل صفاقی دوزهای مورد نظر از هر عصاره به هر موش، NaF با دوز ۱۵۰ mg/kg بهصورت داخل صفاقی تزریق گردید و درصد فعالیت در مقابل کنترل منفی به صورت زمان زنده ماندن در مقایسه با نرمال سالین سنجیده شد. در این تست از پروپرانولول ۲۰ و ۳۰ mg/kg به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد(۶،۵).

آنالیز آماری

کلیه اطلاعات به صورت Mean ± SD گزارش شد. آنالیز واریانس یک سویه (ANOVA) و متعاقب آن Newman-Keuls multiple comparisons test برای مقایسه میانگین‌ها به‌کار رفت. نتایج با احتمال $P<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای انجام برنامه‌های آماری از برنامه گراف پد پریزم ۸ (GraphPad Prism 8) استفاده شد. مقادیر IC_{50} از روی رگرسیون خطی بین درصد مهار و غلظت‌های مربوطه به‌دست آمد.

یافته‌ها

بازده عصاره ها

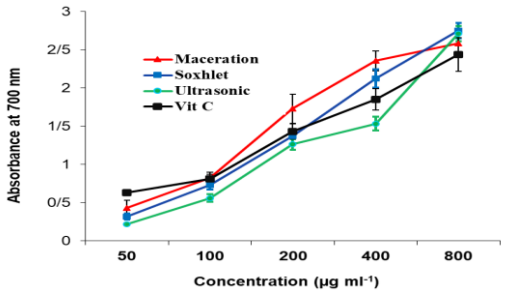
راندمان عصاره‌گیری به روش اولتراسونیک، ۷/۵، عصاره‌گیری به روش خیساندن ۱۲ و عصاره‌گیری به روش سوکسله ۱۹/۴ درصد به‌دست آمد. جدول شماره۱ محتوای تام فنولی و تام فلاونوئیدی موجود در عصاره حاصل از روش خیساندن، عصاره به کمک التراسونیک و عصاره با کمک سوکسله با حلال متانول خالص را نشان می‌دهد.

جدول شماره ۱: محتوای تام فنولی و تام فلاونوئیدی موجود در عصاره‌های بادرنجبویه به روش‌های مختلف استخراج با حلال متانول

روش استخراج	محتوای فنلیa	محتوای فلاونوئیدیb
روش سوکسله	۴۷۵/۳۲ ± ۱۰/۵۹	۷۱/۰۲ ± ۳/۱۳
روش اولتراسونیک	**** ۵۸۷/۰۵ ± ۸/۶۷	****۱۰۰/۳۹ ± ۳/۰۴
روش ماسیراسیون	****۵۶۴/۳۳ ± ۶/۹۸	****۱۱۴/۳۸ ± ۱/۵۷

a میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره،
b میلی‌گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره،
ns:not significant ، ****P<۰/۰۰۰۱

روش خیساندن و عصاره‌گیری به روش التراسونیک روش مناسب‌تر روش برای استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی از این گیاه بود. تأثیر روش استخراج بر درصد به دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره‌های مختلف از بادرنجبویه به‌صورت مقادیر IC_{50} بیان شده است. بر این اساس، میزان IC_{50} برای روش سوکسله ۲/۰۵±۳۸/۱۶، برای روش اولتراسونیک ۱/۸۷±۴۴/۴۵ و برای روش ماسیراسیون ۱/۳۶±۳۸/۳۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. در سنجش فعالیت به دام اندازی رادیکال ازاد DPPH، از BHA به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. مقدار IC_{50} برای BHA ۵۳/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. تأثیر روش استخراج بر قدرت احیاکنندگی توسط عصاره‌های مختلف بادرنجبویه در غلظت‌های مختلف در نمودار شماره ۱ رسم شده است.



نمودار شماره ۱: تأثیر روش استخراج بر میزان قدرت احیا کنندگی عصاره‌های اندام هوایی بادرنجبویه

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-21]

تمامی عصاره و ویتامین ث تقریبا درتمامی غلظت‌های تست شده، اثر مشابه ای داشتند (P>۰/۰۵) تنها در دوز ۴۰۰ µg/ml عصاره حاصل از ماسیراسیون قوی‌تر از ویتامین ث (P<۰/۰۵)، و عصاره حاصل از التراسونیک ضعیف‌تر از تمامی عصاره‌ها بود (P<۰/۰۵).

بررسی اثرات آنتی هیپوکسی خونی

نتایج حاصل از تزریق نیتریت سدیم $NaNO_2$ به میزان ۳۶۰ mg/kg به دریافت‌کنندگان عصاره‌های حاصل از روش‌های خیساندن، سوکسله و التراسونیک در جدول شماره ۲ آمده است. این زمان بر حسب دقیقه بوده و مدت زمانی که موش پس از تزریق دچار تشنج و مرگ می‌شود را گزارش می‌کند.

جدول شماره ۲: فعالیت آنتی‌هیپوکسی عصاره‌های حاصل از روش‌های خیساندن، سوکسله والتراسونیک در مدل هیپوکسی خونی در موش سوری نر

ترکیب/ روش استخراج	دوز mg/kg	انحراف معیار ± میانگین(دقیقه)
نرمال سالین	۰/۵ ml	۹/۶۶ ± ۰/۸۶
خیساندن	۶۲/۵	۹/۴۵ ± ۰/۳۰ ns
خیساندن	۱۲۵	۹/۴۳ ± ۰/۶۵ ns
خیساندن	۲۵۰	۹/۸۰ ± ۰/۲۷ ns
سوکسله	۶۲/۵	۹/۵۸ ± ۱/۴۹ ns
سوکسله	۱۲۵	۱۰/۱۰ ± ۰/۵۸ ns
سوکسله	۲۵۰	۱۰/۵۹ ± ۱/۹۹ ns
التراسونیک	۶۲/۵	۹/۸۸ ± ۱/۱۶ ns
التراسونیک	۱۲۵	۹/۹۶ ± ۱/۶۸ ns
التراسونیک	۲۵۰	۱۰/۲۱ ± ۱/۱۹ ns
پروپرانولول	۲۰	۱۶/۴۸ ± ۱/۹۸****

*: اختلاف نسبت به گروه کنترل نرمال سالین (کنترل منفی)،
****:P<۰/۰۰۰۱ ،
ns: not significant

هیچ یک از عصاره‌ها در این تست اثری از خود نشان نداد. حتی عصاره حاصل از روش سوکسله که در بالاترین دوز تست شده خود، یعنی ۲۵۰mg/kg، علی‌رغم این‌که زمان مرگ را حدود یک دقیقه افزایش داد، نتوانست تغییر معنی‌داری ایجاد کند(P>۰/۰۵). در این تست پروپرانولول در دوز ۲۰mg/kg به‌عنوان کنترل مثبت به‌کار رفت. در این دوز، پروپرانولول به‌طور معنی‌داری زمان مرگ را از ۹/۶۶±۰/۸۶ دقیقه برای گروه کنترل به ۱۶/۴۸±۱/۹۸ دقیقه افزایش داد (P<۰/۰۰۰۱). هر سه عصاره در بالاترین دوز و پایین‌ترین دوز تست شده خود، اثر یکسانی از خود نشان دادند و هیچ اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد(P>۰/۰۵).

بررسی اثرات آنتی هیپوکسی وابسته به گردش خون

نتایج حاصل از تزریق سدیم فلورایـد به میزان ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به دریافت‌کنندگان عصاره‌های حاصل از روش‌های خیساندن، سوکسله والتراسونیک در جدول شماره ۳ آمده است. این زمان بر حسب دقیقه بیان شده و مدت زمانی که موش پس از تزریق دچار تشنج و مرگ می‌شود را نمایش می‌دهد.

جدول شماره ۳: فعالیت آنتی‌هیپوکسی عصاره‌های حاصل از روش‌های خیساندن، سوکسله والتراسونیک در مدل وابسته به گردش خون در موش سوری نر

ترکیب/ روش استخراج	دوز mg/kg	انحراف معیار ± میانگین (دقیقه)
نرمال سالین	۰/۵ ml	۹/۲۲ ± ۰/۹۱
خیساندن	۶۲/۵	۹/۱۴ ± ۱/۳۹ ns
خیساندن	۱۲۵	۱۷/۸۲ ± ۲/۷۶ ****
خیساندن	۲۵۰	۱۹/۵۹ ± ۰/۸۱ ****
سوکسله	۶۲/۵	۹/۲۹ ± ۱/۳۶ ns
سوکسله	۱۲۵	۱۰/۳۲ ± ۰/۴۶ ns
سوکسله	۲۵۰	۲۳/۱۷ ± ۱/۹۱ ****
التراسونیک	۶۲/۵	۹/۶۸ ± ۰/۸۱ ns
التراسونیک	۱۲۵	۹/۸۶ ± ۲/۳۰ ns
التراسونیک	۲۵۰	۱۸/۶۴ ± ۰/۶۶ ****
پروپرانولول	۲۰	۱۲/۷۶ ± ۰/۸۸**
پروپرانولول	۳۰	۱۵/۹۱ ± ۱/۷۷****

*: اختلاف نسبت به گروه کنترل نرمال سالین (کنترل منفی)،
****:P<۰/۰۰۰۱ ،***: P<۰/۰۰۱ ،**: P<۰/۰۱ ،
ns: not significant

هیچ‌یک از عصاره‌ها در پایین‌ترین دوز تست شده اثری در مدل هیپوکسی گردش خونی از خود نشان نداند اما تمامی عصاره‌ها در دوزهای بالاتر اثر بسیار قوی در این مدل هیپوکسی از خود نشان دادند. اگرچه عصاره حاصل از روش خیساندن در پایین‌ترین دوز تست شده، ۶۲/۵ mg/kg، تاثیری بر افزایش بقاء

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-21]

موش‌های سوری نداشت در دوز ۱۲۵ mg/kg، به‌طور معنی‌داری زمان مرگ را از ۹/۲۲±۰/۹۱ دقیقه برای گروه کنترل به ۱۷/۸۲±۲/۷۶ دقیقه افزایش داد (P<۰/۰۰۰۱). در دوز بالاتر، اثر بهتری مشاهده شد. در این دوز زمان بقا ۱۹/۵۹±۰/۸۱ دقیقه بود(P<۰/۰۰۰۱). عصاره‌های حاصل از روش‌های سوکسله و التراسونیک در دوز ۲۵۰mg/kg، به‌طور معنی‌داری زمان مرگ را به‌ترتیب به ۲۳/۱۷±۱/۹۱ و ۱۸/۶۴±۰/۶۶ دقیقه افزایش دادند(P<۰/۰۰۰۱). در این تست پروپرانولول در دوزهای ۲۰ و ۳۰mg/kg به‌عنوان کنترل مثبت به‌کار رفت. پروپرانولول در دوز ۲۰، موجب افزایش زمان مرگ در موش‌ها شد (۱۲/۷۶±۰/۸۸ دقیقه). این افزایش از نظر آماری نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود(P<۰/۰۱). پروپرانولول در دوز ۳۰mg/kg، زمان زنده ماندن موش‌ها را به ۱۵/۹۱±۱/۷۷ دقیقه افزایش داد(P<۰/۰۰۰۱). عصاره حاصل از روش خیساندن در دوز ۱۲۵ mg/kg اثری مشابه پروپرانولول ۳۰ mg/kg از خود نشان داد(P>۰/۰۵). تمامی عصاره‌ها در دوز ۲۵۰ mg/kg اثری به مراتب قوی‌تر از پروپرانولول ۳۰ mg/kg از خود نشان دادند. هر سه عصاره در پایین‌ترین دوز تست شده خود، اثر یکسانی از خود نشان دادند و هیچ اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد(P>۰/۰۵)، اما در بالاترین دوز تست شده، عصاره‌ی حاصل از روش سوکسله به مراتب قوی‌تر از عصاره‌های حاصل از روش‌های خیساندن والتراسونیک بود(P<۰/۰۰۱).

بررسی اثرات آنتی هیپوکسی خفگی

نتایج حاصل از شرایط کمبود اکسیژن برای تست خفگی در خصوص عصاره‌های حاصل از روش‌های خیساندن، سوکسله و التراسونیک در جدول شماره ۴ آمده است. این زمان بر حسب دقیقه بوده و مدت زمانی که موش پس از قرارگیری در محفظه بسته دچار تشنج و سپس مرگ می‌شود را نمایش می‌دهد.

جدول شماره ۴: فعالیت آنتی هیپوکسی عصاره‌های حاصل از روش‌های خیساندن، سوکسله و التراسونیک در هایپوکسی خفگی در موش سوری نر

ترکیب/ روش استخراج	دوز mg/kg	انحراف معیار ± میانگین (دقیقه)
نرمال سالین	۰/۵ ml	۲۰/۱۱ ± ۲/۲۶
خیساندن	۰/۹۸	۲۰/۵۱ ± ۱/۷۰ ns
خیساندن	۱/۹۵	۲۶/۷۵ ± ۲/۲۵***
خیساندن	۳/۹۰	۲۷/۶۹ ± ۲/۴۲****
خیساندن	۷/۸۱	۲۸/۳۱ ± ۱/۹۸ ****
خیساندن	۱۵/۶۲	۲۸/۵۳ ± ۲/۵۶****
خیساندن	۳۱/۲۵	۳۱/۳۷ ± ۲/۴۷****
سوکسله	۳/۹۰	۲۱/۲۶ ± ۱/۹۸ ns
سوکسله	۷/۸۱	۲۹/۵۴ ± ۳/۱۸****
سوکسله	۱۵/۶۲	۳۰/۳۰ ± ۲/۲۴****
سوکسله	۳۱/۲۵	۳۱/۶۰ ± ۳/۴۳ ****
التراسونیک	۱/۹۵	۲۱/۲۰ ± ۲/۳۱ ns
التراسونیک	۳/۹۰	۲۵/۴۴ ± ۲/۴۸***
التراسونیک	۷/۸۱	۲۷/۵۶ ± ۱/۵۶****
التراسونیک	۱۵/۶۲	۲۹/۷۲ ± ۲/۱۴****
التراسونیک	۳۱/۲۵	۳۲/۱۰ ± ۱/۹۶****
فنی توئین	۵۰	۲۹/۶۰ ± ۱/۳۴****

*: اختلاف نسبت به گروه کنترل نرمال سالین (کنترل منفی)،
*: P<۰/۰۵، **: P<۰/۰۱، ***: P<۰/۰۰۱، ****: P<۰/۰۰۰۱
ns: not significant

تمامی عصاره‌ها اثرات بسیار خوبی در این مدل هیپوکسی از خود نشان دادند به گونه‌ای که بارها مجبور به کاهش دوز شدیم. عصاره حاصل از روش خیساندن در دوز ۱/۹۰ mg/kg، تاثیری زیادی بر افزایش بقاء موش‌های سوری داشت و به‌طور معنی‌داری زمان مرگ را از ۲۰/۱۱±۲/۲۶ دقیقه برای گروه کنترل به ۲۶/۷۵±۲/۲۵ دقیقه افزایش داد(P<۰/۰۰۱). در دوز ۳/۹۰ mg/kg، اثر بهتری مشاهده شد. در این دوز زمان بقا ۲۷/۶۹±۲/۴۲ دقیقه بود (P<۰/۰۰۰۱). عصاره حاصل از روش سوکسله در دوز ۷/۸۱ mg/kg، به‌طور معنی‌داری زمان مرگ را به ۲۹/۵۴±۳/۱۸ دقیقه افزایش دادند(P<۰/۰۰۰۱). با افزایش دوز به ۳۱/۲۵ mg/kg، زمان زنده ماندن ۲ دقیقه بیش‌تر شد و به ۳۱/۶۰±۳/۴۳ دقیقه رسید(P<۰/۰۰۰۱). عصاره حاصل از روش التراسونیک در دوز ۳/۹۰ mg/kg، به‌طور معنی‌داری زمان مرگ را به ۲۵/۴۴±۲/۴۸ دقیقه افزایش داد(P<۰/۰۰۱). با هر افزایش دوز به دو برابر، زمان بقاء در موش‌های سوری نر تقریبا ۲ دقیقه افزایش یافت. در دوز ۳۱/۲۵ mg/kg، زمان زنده ماندن به ۳۲/۱۰±۱/۹۶

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-21]

دقیقه رسید(P<۰/۰۰۰۱). در این مدل، فنی‌توئین ۵۰mg/kg به‌عنوان کنترل مثبت به‌کار رفت. زنده ماندن در گروه‌های دریافت‌کننده فنی‌توئین ۱/۳۴±۲۹/۶۰ دقیقه بود که تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل داشت(P<۰/۰۰۰۱). عصاره حاصل از روش خیساندن در دوز ۱/۹۵ mg/kg اثری مشابه فنی توئین از خود نشان داد (P>۰/۰۵). در دوز ۳۱/۲۵، اگرچه زمان زنده ماندن موش‌ها را ۲ دقیقه بیش‌تر از فنی توئین افزایش داد، اما از نظر آماری تفاوتی بین آن ها مشاهده نشد(P>۰/۰۵). عصاره حاصل از روش سوکسله در دوز ۷/۸۱ mg/kg اثری مشابه فنی‌توئین از خود نشان داد (P>۰/۰۵). اگر چه این عصاره هم در دوز ۳۱/۲۵ mg/kg، زمان زنده ماندن موش‌ها را ۲ دقیقه بیش تر از فنی‌توئین افزایش داد، اما از نظر آماری تفاوتی بین آن‌ها نیز مشاهده نشد (P>۰/۰۵). عصاره حاصل از روش التراسونیک در دوز ۷/۸۱ mg/kg اثری مشابه فنی‌توئین از خود نشان داد (P>۰/۰۵). اگرچه این عصاره هم در دوز ۳۱/۲۵ mg/kg، زمان زنده ماندن موش‌ها را ۲/۵ دقیقه بیش‌تر از فنی‌توئین افزایش داد، اما از نظر آماری تفاوتی بین آن‌ها نیز مشاهده نشد(P>۰/۰۵). عصاره حاصل از روش خیساندن موثر از بقیه بود. این عصاره حتی در دوز ۱/۹۵ mg/kg، بسیار موثر بود. در این دوز سایر عصاره‌ها اثری نداشتند. در پایین‌ترین دوز مشترک، ۳/۹۰mg/kg، اگرچه عصاره حاصل از روش خیساندن ۲ دقیقه زمان مرگ را نسبت به عصاره حاصل از روش التراسونیک، بیش‌تر افزایش داد، اما اختلاف معنی‌داری بین این دوز در این عصاره مشاهده نشد (P>۰/۰۵). اما هر دو عصاره به‌طور معنی‌داری از عصاره حاصل از روش سوکسله قوی‌تر بودند. در بالاترین دوز مشترک، ۳۱/۲۵ mg/kg، هر سه عصاره اثر یکسانی از خود نشان دادند و هیچ اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد(P>۰/۰۵).

بحث

ذرات اکسیژن فعال(ROS) دسته‌ای از مولکول‌های بسیار واکنش‌پذیر هستند که از اکسیژن مشتق شده و توسط برخی فرآیندهای متابولیک طبیعی تولید می‌شوند(۱۸). آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موجود در گیاهان برای محافظت از انسان در برابر رادیکال‌های آزاد و پیشگیری ازبرخی بیماری‌ها به خوبی شناخته‌شده هستند. بادرنجبویه به‌طور سنتی برای اثرات آن بر سیستم عصبی استفاده می‌شود(۱۹). در این تحقیق سه عصاره با سه روش مختلف تهیه شد. عصاره با کمک سوکسله با ۱۹/۴ درصد بالاترین راندمان استخراج را داشت. نظر به چرخش حلال تازه در این روش و استفاده همزمان از دما، بیش‌تر بودن راندمان استخراج منطقی است. عصاره با کمک التراسونیک بالاترین مقدار ترکیبات پلی‌فنولی را داشت. عصاره حاصل از روش خیساندن بالاترین مقدار فلاونوئید تام را دارا بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان را می‌توان عمدتا به حضور ترکیبات فنولی در آن نسبت داد. فعالیت‌های بیولوژیکی زیادی از جمله، فعالیت ضدقارچی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد التهاب، ضد آلرژی و گشادکننده عروق از این ترکیبات گزارش شده است(۲۰). روند استخراج یک عامل مهم در تعیین خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره است. دما، حلال، زمان عصاره‌گیری، قدرت استخراج و روش استخراج تاثیر بارزی در محتویات عصاره خواهد گذاشت. تکنیک‌های پیشرفته استخراج مانند عصاره‌گیری به کمک اولتراسوند از طریق افزایش کارایی و انتخابیت، موجب غلبه بر مشکلات روش‌های قدیمی شده است(۲۱). در مطالعه‌ای به منظور عصاره‌گیری از گیاه *Mesembryanthemum edule*، از روش استخراج اولتراسونیک استفاده شد. نتایج نشان داد که نوع حلال تاثیر زیادی بر محتوای فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد. عصاره متانولی حاوی مقدار قابل توجهی ترکیبات پلی‌فنولی نسبت به عصاره اتانولی بود(۲۲). نتایج یک پژوهش بر روی گل آذین زولنگ نشان داد که مواد فنولی بیش‌تری در عصاره حاصل از روش سوکسله نسبت به روش‌های التراسونیک و خیساندن وجود

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-21]

دارد(۲۳). گزارشات متعددی از به‌کارگیری روش استخراج با کمک التراسونیک در استخراج مواد مختلف از قبیل ایزوفلاون‌ها از ریشه *Radix puerariae*، هسپریدین از پوست *Citrus reticulata*، پلی‌ساکاریدها از پوست میوه longan و ترکیبات فنولی از غلات وجود دارد(۲۴). در یک مقاله، فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه *Agrimonia pilosa* با کمک روش استخراج با کمک التراسونیک و روش سوکسله با یکدیگر مقایسه شد و نشان داد که هر دو روش در استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاه موثر و کارآمد بوده و به خوبی قابل استفاده در صنایع غذایی هستند(۲۵).

در مطالعه‌ای، اثرات دو روش عصاره‌گیری بر روی محتوای تام فنولی و فلاونوییدی گیاه سیاه ولیک مورد بررسی قرارگرفت. فعالیت آنتی‌اکسیدانی فراکسیون پلی‌فنولی و اولتراسونیک با چهار تست آنتی‌اکسیدانی مختلف به‌صورت برون‌تنی ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که عصاره حاصل از روش اولتراسونیک در تست‌های DPPH، به دام اندازی هیدروژن پراکسید و شلات کردن Fe^{2+} بهتر از عصاره پلی فنل بود(۱۵). مطالعه‌ای دیگر با هدف بررسی تاثیر روش‌های مختلف استخراج در فعالیت آنتی‌اکسیدانی، بر روی اندام‌های هوایی گیاه زعفران خزری *Crocus caspius* انجام شد. روش‌های استخراج شامل اولتراسونیک، پرکولاسیون و فراکسیون پلی‌فنولی بود. عصاره اولتراسونیک دارای بیش‌ترین میزان فنول و فلاونویید بود، در تست DPPH و به دام اندازی H_2O_2 هم قوی‌ترین عصاره بود. عصاره تهیه شده به روش خیساندن در تست قدرت احیاکنندگی قوی‌ترین عصاره بود(۲۶). در یک مطالعه گل آذین گیاه زولنگ با سه روش عصاره شده و سپس فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با چهار روش با یکدیگر مقایسه شده است. در عمده تست‌ها عصاره حاصل از روش سوکسله قوی‌ترین فعالیت را از خود نشان داد. اگر چه اختلاف زیادی بین این عصاره و عصاره حاصل از روش التراسونیک وجود نداشت. این تحقیق هم‌چنین نشان داد که روش‌های سوکسله و اولتراسوند در استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئید موثرتر از روش کلاسیک خیساندن عمل می‌کنند. بنابراین روش ارجح در استخراج این ترکیبات فعال بیولوژیک در این گیاه می‌باشند. میزان فلاونوئید تام در این مقاله، ۱۱/۹ تا ۱۸/۶۵ میلی‌گرم فلاونوئید معادل کوئرستین در گرم عصاره به دست آمد. کم‌ترین مقدار مربوط به روش خیساندن بود. بر این اساس، روش‌های سوکسله و اولتراسوند در این گیاه در استخراج ترکیبات فلاونوئید موثر از روش کلاسیک خیساندن عمل می‌کنند(۲۳).

مدل به دام اندازی رادیکال DPPH به‌طورگسترده برای ارزیابی توانایی به دام‌اندازی رادیکال آزاد در نمونه‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد(۲۰). در تحقیق حاضر، تغییر روش استخراج تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر این تست داشت. عصاره‌گیری روش سوکسله و ماسیراسیون مناسب‌تر از روش دیگر بودند. در خصوص گیاه زولنگ، میزان IC_{50} حاصل از سه روش سوکسله، ماسیراسیون و اولتراسوند برای به دام اندازی رادیکال DPPH به‌ترتیب برابر ۸۳/۱، ۱۷۷/۳ و ۱۸۸/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بر این اساس استخراج با روش سوکسله مهارکننده قوی‌تری از دو روش دیگر بود. در این مطالعه نیز ارتباط خوبی بین فعالیت آنتی اکسیدانی و فنول تام به دست آمد. عصاره‌ها با میزان بیش‌تر فنولی (به‌ترتیب سوکسله، خیساندن و التراسونیک)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری از خود نشان دادند(۲۳). قدرت احیاکنندگی به‌عنوان شاخصی در تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاهان دارویی به‌کار می‌رود(۲۰). در این روش، حضور عوامل احیا کننده فعالیت خود را از طریق اهدا الکترون اعمال می‌کنند و موجب احیا آهن III به آهن II می‌گردند. میزان تشکیل آبی پروس در طول موج ۷۰۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است. افزایش جذب در این طول موج نشان از افزایش توانایی احیاکنندگی می‌باشد. در تحقیق حاضر، روش استخراج تاثیری بر فعالیت احیاکنندگی عصاره‌ها نداشت. تمامی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-21]

عصاره و ویتامین ث تقریبا در تمامی غلظت‌های تست شده، اثر مشابه‌ای داشتند(P>۰/۰۵). هدف از یک مطالعه تعیین پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدهای بادرنجبویه بود. بدین منظور عصاره متانولی از اندام هوایی گیاه تهیه شد و محتوای تام فنلی و محتوای تام فلاونوئید به روش رنگ‌سنجی ارزیابی شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز توسط فعالیت مهار رادیکال DPPH برآورد شد. محتوای فنول تام و فلاونوئیدهای تام عصاره اتیل استات به‌ترتیب ۱۴۳/۵۰ میلی‌گرم GAE/g (dw) و ۱۲۴/۹۶ میلی‌گرم QE/g DW بود(۲۷). نقش و اهمیت هیپوکسی به‌عنوان یک عامل مهم در پاتوژنز برخی بیماری‌ها مانند پلی‌سیتمی، اختلالات قلبی ریوی و کووید-۱۹ اثبات شده است(۲۹،۲۸). هیپوکسی در رشد سلول‌ها و تومور سرطانی، افزایش قدرت تهاجمی آن‌ها و هم‌چنین متاستاز نقش داشته و از طرفی باعث افزایش مقاومت سلول‌های به پرتو درمانی و شیمی درمانی می‌شود. هیپوکسی به‌عنوان یک ریسک فاکتور در تشخیص برخی سرطان ها از قبیل سر و گردن شناخته می‌شود(۳۰). بر این اساس ترکیبات آنتی هیپوکسیک را می‌توان به عنوان داروی ضد سرطان یا حداقل داروی کمکی در درمان آن در نظر گرفت(۳۱). ترکیبات طبیعی گیاهی و برخی داروها فعالیت آنتی‌هیپوکسی خوبی دارند و بنابراین پتانسیل استفاده در درمان محدوده وسیعی از بیماری‌ها را دارند(۳۲). تاثیر دگزامتازون در درمان کووید-۱۹ تایید شده است. این دارو مرگ بیماران کووید-۱۹ بستری و نیازمند اکسیژن (بدون ونتیلاتور) و تحت ونتیلاسیون را کاهش داد، اما در بیماران بدون نیاز به حمایت اکسیژن موثر نبود. لذا استراتژی جدیدی در درمان کووید-۱۹ پیشنهاد شد. این استراتژی مبتنی عملکرد دگزامتازون به عنوان یک آنتی‌هیپوکسی، و پیشنهاد استفاده از آنتی‌هیپوکسی‌ها در درمان کووید-۱۹ بود. با این رویکرد، فعالیت بالای آنتی‌هیپوکسی دگزامتازون به عنوان یکی از مکانیسم‌های احتمالی عملکرد این دارو در درمان کووید-۱۹ گزارش شد(۳۳).

آسیب مغزی ایسکمیک اغلب باعث آسیب عصبی غیر قابل برگشت می‌شود. آبشار حوادثی که منجر به آسیب عصبی و مرگ در ایسکمی می‌شود شامل التهاب، ادم، آپوپتوز و نکروز است(۳۴). ایسکمی مغزی چندین روند متابولیکی را آغاز می‌کند که نهایتا منجر به مرگ نورون‌ها می‌شود. این روندها بخش زیادی از آسیب‌های ناشی از ایسکمی مغزی را میانجی‌گری می‌کنند. بادرنجبویه به‌عنوان یک گیاه گیاهی مفید در پیشگیری از بیماری‌های عصبی مختلف مانند آلزایمر که با استرس اکسیداتیو مرتبط است، در نظر گرفته می‌شود(۱۹).

در مطالعه حاضر فعالیت آنتی هیپوکسی این گیاه به عنوان مکانیسم احتمالی فعالیت آن در ایسکمی مغزی مورد ارزیابی قرار گرفت.

در مدل هایپوکسی خفگی، تمامی عصاره ها اثرات بسیار خوبی از خود نشان دادند. عصاره حاصل از روش خیساندن در دوز ۱/۹۰ mg/kg، تاثیری زیادی بر افزایش بقاء موش‌های سوری داشت و به‌طور معنی‌داری زمان مرگ را افزایش داد (P<۰/۰۰۱). در دوز ۳/۹۰mg/kg، اثر بهتری مشاهده شد. عصاره حاصل از روش سوکسله در دوز ۷/۸۱ mg/kg، به‌طور معنی‌داری زمان مرگ را افزایش داد (P<۰/۰۰۰۱). عصاره حاصل از روش التراسونیک در دوز ۳/۹۰ mg/kg، موثر بود (P<۰/۰۰۱). در این مدل، فنی‌توئین ۵۰ mg/kg به‌عنوان کنترل مثبت به‌کار رفت. فنی‌توئین میزان مصرف اکسیژن، فعالیت سلولی و مصرف ATP را کم‌تر و مقاومت سلولی را در برابر ایجاد هیپوکسی بیش‌تر می‌کند(۳۵). عصاره حاصل از روش خیساندن در دوز ۱/۹۵ و عصاره‌های حاصل از روش سوکسله و التراسونیک در دوز ۷/۸۱ mg/kg اثری مشابه فنی توئین از خود نشان دادند (P>۰/۰۵) (جدول شماره ۴). در گزارش‌های پیشین، عصاره برگ مورد و عصاره گل سیر در دوز ۱۲۵ mg/kg نیز توانسته بودند، زمان زنده ماندن موش‌ها را در حد فنی‌توئین افزایش دهند(۳۷،۳۶). اما اثرات قابل توجهی در این مدل از برخی گیاهان مانند سیاه ولیک و

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-21]

سرخ ولیک حتی تا دوزهای ۴۰۰ mg/kg مشاهده نشده است(۳۸). در مدل هایپوکسی خونی، هیچ یک از عصاره‌ها اثری از خود نشان ندادند. حتی عصاره حاصل از روش سوکسله که در بالاترین دوز تست شده خود، یعنی ۲۵۰mg/kg ، علی‌رغم این‌که زمان مرگ را حدود یک دقیقه افزایش داد، نتوانست تغییر معنی‌داری ایجاد کند(P>۰/۰۵)(جدول شماره ۳). در این تست پروپرانولول در دوز ۲۰mg/kg به‌عنوان کنترل مثبت به‌کار رفت. در این مدل، سدیم نیتریت نسبت به اکسیژن با تمایل بیش‌تری به هموگلوبین متصل شده و ظرفیت حمل اکسیژن از طریق تبدیل هموگلوبین به متهموگلوبین کاهش پیدا می‌کند. در نتیجه اکسیژن‌رسانی به بافت‌ها دچار اختلال شده و این فرایند سبب مرگ جاندار می‌گردد(۳). پروپرانولول به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در پستانداران، کاتکول آمین‌ها بر گیرنده‌های شیمیایی کاروتید که به اکسیژن حساس هستند، اثر می‌گذارند. این گیرنده‌های شیمیایی مسئول تنفس سریع و زیاد در پاسخ به نور اپی‌نفرین هستند. پروپرانولول پاسخ به نوراپی نفرین و هم‌چنین هیپوکسی را مهار می‌کند(۳۹). فعالیت تنفسی میتوکندریایی (اتم اکسیژن مصرفی بر مبنای گرم پروتئین میتوکندریایی) بهتر شده و تجمع یون کلسیم در میتوکندری با سرعت نسبتاً آهسته‌تری انجام می‌شود. پروپرانولول از عضله قلب در برابر اثرات هیپوکسی و ایسکمی محافظت می‌کند(۴۰). در این مدل، عصاره اتانولی اندام هوایی *Delphinium elbursense* و عصاره متانولی بامیه در دوز ۱۰۰۰ mg/kg توانستند زمان زنده ماندن را افزایش دهند(۴۱،۴۲). عصاره متانولی گل آذین زولنگ در دوز ۶۰۰ (P<۰/۰۰۱)، عصاره متانولی گل گردو و گل سیر در دوز ۱۲۵ و عصاره آبی اندام هوایی *Hypericum scabrum* در دوز ۳۱/۲۵ mg/kg (P<۰/۰۰۱) فعالیت آنتی هیپوکسی از خود نشان دادند(۲۳،۳۷،۴۳،۴۴).

در مدل هایپوکسی وابسته به گردش خون هیچ یک از عصاره‌ها در پایین‌ترین دوز تست شده اثری از خود نشان ندادند، اما تمامی عصاره‌ها در دوزهای بالاتر اثر بسیار قوی داشتند. عصاره حاصل از روش خیساندن در دوز ۱۲۵ mg/kg، به طور معنی داری زمان مرگ را افزایش داد (P<۰/۰۰۰۱). در دوز بالاتر، اثر بهتری مشاهده شد. عصاره‌های حاصل از روش‌های سوکسله و التراسونیک در دوز ۲۵۰mg/kg، به‌طور معنی‌داری زمان مرگ را افزایش دادند(P<۰/۰۰۰۱). در این تست پروپرانولول در دوزهای ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌عنوان کنترل مثبت به‌کار رفت. پروپرانولول در دوز ۲۰، موجب افزایش زمان مرگ در موش‌ها شد(P<۰/۰۱) و در دوز ۳۰mg/kg ، زمان زنده ماندن موش‌ها را بیش‌تر افزایش داد (P<۰/۰۰۰۱). عصاره حاصل از روش خیساندن در دوز ۱۲۵ mg/kg اثری مشابه پروپرانولول ۳۰ mg/kg داشت (P>۰/۰۵). تمامی عصاره‌ها در دوز ۲۵۰ mg/kg به مراتب قوی‌تر از پروپرانولول ۳۰ mg/kg بودند (جدول شماره ۲). سدیم فلورایـد در هایپوکسی وابسته به گردش خون باعث لیز شدن هموگلوبین و در نتیجه کاهش ظرفیت حمل اکسیژن می‌گردد. در نتیجه با وجود سالم بودن سیستم‌های آنزیمی و عملکردی، سلول‌ها به دلیل عدم دریافت اکسیژن کافی از خون، دچار هایپوکسی و مرگ می‌گردند. در این مدل ترکیباتی که بتوانند اکسیژن رسانی به سلول‌ها و بافت‌ها و یا میزان مقاومت بافت ها در برابر هیپوکسی را افزایش دهند، مفید واقع می‌گردند. در مطالعات پیشین، فراکسیون پلی‌فنول میوه سیاه ولیک و سرخ ولیک در دوز ۱۰۰ mg/kg توانستند زمان زنده ماندن موش‌های آزمایشگاهی را از ۹/۲۹±۰/۹۵ دقیقه در گروه کنترل به ۳۸/۶۷±۹/۸۱ و ۲۶/۴۴±۸/۳۲ دقیقه افزایش دهند که بسیار قابل توجه بود(P<۰/۰۰۱)(۳۸). هم‌چنین فراکسیون پلی‌فنولی گل آذین زولنگ در دوز ۴۰۰ (P<۰/۰۰۱) و عصاره متانولی اندام هوایی گیاه گزنه در دوز ۳۰۰ mg/kg (P<۰/۰۰۱) و عصاره متانولی برگ گیاه پلم در دوز ۶۲/۵ mg/kg (P<۰/۰۰۱) اثرات قابل توجهی از خود نشان دادند(۲۳،۳۶).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-21]

مطالعه‌ای به منظور بررسی اثر محافظتی بادرنجبویه در مدل برون تنی هیپوکسی و همچنین توانایی محافظتی تجویز قبل و بعد از ایسکمی و سپس خون رسانی مجدد در نورون‌های هیپوکامپ به عنوان یک مدل درون تنی انجام شد. در این مطالعه سنجش سمیت سلولی، محافظت قابل‌توجهی از دوز ۱۰ μg/ml بادرنجبویه در برابر هیپوکسی در نورون‌های کشت شده نشان داد که با رنگ‌آمیزی معمولی تأیید شد. تیمار با اسانس گیاه فعالیت کاسپاز ۳ را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. این اسانس همچنین سطح مالون دی آلدئید را مهار کرده و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در هیپوکامپ را بهبود داد. سطوح mRNA سیتوکین‌های التهابی TNF-α، IL-1β و HIF-1α پس از ایسکمی به شدت افزایش یافت و مواجهه با بادرنجبویه به طور قابل توجهی بیان ژن HIF-1α را سرکوب کرد. نتایج این تحقیق نشان داد که بادرنجبویه می‌تواند به‌عنوان یک عامل محافظ در بیماری‌های عصبی مختلف مرتبط با آسیب ایسکمیک مغزی در نظر گرفته شود(۱۹). در این تحقیق فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره حاصل از روش خیساندن، عصاره به کمک التراسونیک و عصاره با کمک سوکسله اندام هوایی گیاه بادرنجبویه با حلال متانول مورد ارزیابی قرار گرفت. تأثیر روش استخراج بر فعالیت آنتی اکسیدانی آن بررسی شد. بالاترین راندمان استخراج مربوط سوکسله بود. روش‌های التراسونیک و خیساندن به ترتیب مناسب‌ترین روش‌ها برای استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی از این گیاه بود. عصاره با کمک سوکسله و خیساندن بالاترین فعالیت را در به دام اندازی رادیکال DPPH از خود نشان دادند. در تست احیا کنندگی، تمامی عصاره‌ها اثرات خوب آنتی‌اکسیدانی بالایی نشان داده و اثر آن‌ها مشابه بود. عصاره‌ها اثرات محافظتی بسیار خوبی در افزایش زمان زنده ماندن موش‌های سوری در تست خفگی از خود نشان دادند. عدم تعیین مقدار یک یا چند فاکتورهای اصلی نشان‌دهنده هایپوکسی مانند مقدار اشباع اکسیژن یا بیان فاکتور القا شده با هایپوکسی به‌عنوان یکی از محدودیت‌های کار حاضر اعلام می‌گردد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌های دانشجویی دکترای داروسازی به شماره (کد طرح ۴۹۷۵) می‌باشد که بدین‌وسیله از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تشکر می‌گردد.

References

1. Mozdastan S, Ebrahimzadeh MA, Khalili M. Comparing the impact of different extraction methods on antioxidant activities of Myrtle (Myrtus communis L.). J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(127): 10-24 (Persian).
2. Majidaee E, Hosseyni Talei SR, Gholamnezhad S, Ebrahimzadeh MA. Comparing the effect of different extraction methods and the role of solvent polarity on total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activities of Ferula persica. J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30(188): 26-39 (Persian).
3. Ataee R, Hasani H, Mohammadyan M, Ebrahimzadeh MA. Antihypoxic activities of aerial parts and roots of Ferula persica in Mice. J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30(189): 126-32 (Persian).
4. Armstrong D. Advanced Protocols in Oxidative Stress II. In: Methods in Molecular Biology. İstanbul: Humana Press; 2010. p. 28.
5. Khalili M, Dehdar T, Hamedi F, Ebrahimzadeh MA, Karami M.Antihypoxic Activities of the Golden Chanterelle Mushroom, Cantharellus cibarius (Higher Basidiomycetes). Int J Med Mushrooms 2014; 16(4): 339-344.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-21]

6. Shakeri A, Sahebkar A, Javadi B. Melissa officinalis L.–A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. J Ethnopharmacol 2016; 188: 204-228.
7. Verma PS, Singh A, Rahaman L, Bahl JR. Lemon balm (Melissa officinalis L.) an herbal medicinal plant with broad therapeutic uses and cultivation practices: a review. Int J Recent Adv Multidisciplinary Res 2015; 2(11): 928-933.
8. Abdel-Naime WA, Fahim JR, Fouad MA, Kamel MS. Antibacterial, antifungal, and GC-MS studies of Melissa officinalis, South Afr J Bot 2019; 124(7): 228-234.
9. Luta EA, Ghica M, Costea T, Elena C. Phytosociological study and its influence on the biosynthesis of active compounds of two medicinal plants Mentha piperita L. and Melissa officinalis L. Farmácia 2020; 68(5): 919-924.
10. Awad R, Muhammad A, Durst T, Trudeau VL, Arnason JT. Bioassay-guided fractionation of lemon balm (Melissa officinalis L.) using an in vitro measure of GABA transaminase activity. Phytother Res 2009; 23(8): 1075-1081.
11. Astani A, Reichling J, Schnitzler P. Melissa officinalis extract inhibits attachment of herpes simplex virus in vitro. Chemotherapy 2012; 58(1): 70-77.
12. Kamdem JP, Adeniran A, Boligon AA. Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (Melissa officinalis L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection. Indust Crops Prod 2013; 51: 26-34.
13. Aubert P, Guinobert I, Blondeau C. Basal and spasmolytic effects of a hydroethanolic leaf extract of Melissa officinalis L. on intestinal motility: An ex vivo study. J Med Food 2019; 22(7): 653-662.
14. Rabiei Kh, Bekhradnia S, Nabavi SM, Nabavi SF, Ebrahimzadeh M.A. Antioxidant activity of polyphenol and ultrasonic extracts from fruits of Crataegus pentagyna subsp. elburensis. Nat Pro Res 2012; 26(24): 2353-2357.
15. Nabavi SM, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Bahramian F. In vitro antioxidant activity of Phytolacca americana berries. Pharmacologyonline 2009; 1(2009): 81-88.
16. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B. Free radical scavenging ability of methanolic extract of Hyoscyamus squarrosus leaves. Pharmacologyonline 2009; 2: 796-802.
17. Lopez V, Martin S, Gomez-Serranillos MP, Carretero ME, Jager AK, Calvo MI: Neuroprotective and neurological properties of Melissa officinalis. Neurochem Res 2009; 34(11): 1955-1961.
18. Bayat M, Azami Tameh A, Hossein Ghahremani M, Akbari M, Mehr SE, Khanavi M, Hassanzadeh G. Neuroprotective properties of Melissa officinalis after hypoxic-ischemic injury both in vitro and in vivo. DARU 2012; 20(1): 42.
19. Khalili M , Ebrahimzadeh MA. A review on antioxidants and some of their common evaluation methods. J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 24(120): 188-208 (Persian).
20. Vilkha K, Mawson R, Simon L, Bates D. Application and opportunities for untrasound assisted extraction in food industry; A review. Innov Food Sci Emerg Technol 2008; 9: 161-169.
21. Falleh H. Ultrasound-assisted extraction: effect of exraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of Mesembryanthemum edule L. Aizoaceae shoots. Tro J Pharm Res 2012; 11(2): 243-249.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-21]

22. Riekandeh SM, Mazandarani M, Ebrahimzadeh MA, Zargari M. Antioxidant activities of Eryngium caucasicum inflorescence. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2016; 20(5): 946-949.
23. Shahverdi A-R, Iranshahi M, Mirjani R, Jamalifar H, Amin G, Shafiee A. Bioassay-guided isolation and identification of an antibacterial compound from Ferula persica var. persica roots. DARU J Pharm Sci 2005; 13: 17-19 (Persian).
24. He Ch, Ji X, Pan Y, Wang H, Wang KM, Liang M, Yang L. Antioxidant activity of alcoholic extract of Agrimonia pilosa Ledeb. Med Chem Res 2010; 19: 448-461.
25. Khalili M, Fathi H, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity of bulbs and aerial parts of Crocus caspius, impact of extraction methods. Pak J Pharm Sci 2016; 29(3): 773-777.
26. Hassan RA, Abotaleb ST, Hamed HB, Eldeen MS. Antioxidant and antimicrobial activities of Melissa officinalis L.(lemon balm) extracts. Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology 2019; 10(9): 183-187 (Persian).
27. Aimee YY, Shimoda LA, Iyer NV, Huso DL, Sun X, McWilliams R, et al. Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1α. J Clin Invest 1999; 103(5): 691-696.
28. Cavezzi A, Troiani E, Corrao S. COVID-19: hemoglobin, iron, and hypoxia beyond inflammation. A narrative review. Clin Pract 2020; 10(2): 24-30.
29. Bredell MG, Ernst J, El-Kochairi I, Dahlem Y, Ikenberg K, Schumann DM. Current relevance of hypoxia in head and neck cancer. Oncotarget 2016; 7(31): 50781-50804.
30. Bennewith KL, Dedhar S. Targeting hypoxic tumour cells to overcome metastasis. BMC Cancer 2011; 11: 504.
31. Mohsenpour H, Pesce M, Patruno A, Bahrami A, Pour PM, Farzaei MH. A review of plant extracts and plant-derived natural compounds in the prevention/treatment of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. Int J Mol Sci 2021; 22(2): 833.
32. Hosseinzadeh MH, Shamshirian A, Ebrahimzadeh MA. Dexamethasone Vs. COVID-19: An experimental study in line with the preliminary findings of a large trial. Int J Clin Prac 2020; 75(6): e13943.
33. Kuroda S, Siesjo BK: Reperfusion damage following focal ischemia: pathophysiology and therapeutic windows. Clin Neurosci 1997; 4(4): 199-212.
34. Imaizumi S, Suzuki J, Kinouchi H, Yoshimoto T. Superior protective effects of phenytoin against hypoxia in a pharmacological screening test. Neurolog Res 1988; 10(1): 18-24.
35. Kaveh K, Mohamadyan M, Ebrahimzadeh MA. Antihypoxic activities of sambucus ebulus leaf and fruit and Myrtus communis leaf in mice. J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29(176): 61-73 (Persian).
36. Shahbazee M, Mohammadyan M, Ali Ebrahimzadeh M. Antihypoxic activities of Allium sativum flower in mice. J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29(175): 145-149 (Persian).
37. Ebrahimzadeh MA, Khalili M, Jafari N, Zareh G, Farzin D, Amin G. Antihypoxic activities of Crataegus pentaegyn and Crataegus microphylla fruits-an in vivo assay. Braz J Pharm Sci 2018; 54(2): e17363.
38. Burleson ML, Milsom WK. Propranolol inhibits O2-sensitive chemoreceptor activity in trout gills. Am J Physiol 1990; 258(4): R1089-1091.
39. Nayler WG, Fassold E, Yepez C. Pharmacological protection of mitochondrial

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-21]

function in hypoxic heart muscle: Effect of verapamil, propranolol, and methylprednisolone. Cardiovasc Res 1978; 12(3): 152-161.

40. Ebrahimzadeh M, Nabavi S, Nabavi S, Mahmoudi M, Eslami B, Dehpour A. Biological and pharmacological effects of Delphinium elbursense. Afr J Biotechnol 2010; 9(34): 5542-5549.
41. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM, Eslami B. Antihypoxic and antioxidant activity of Hibiscus esculentus seeds. Grasas Aceites 2010; 61(1): 30-36.
42. Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Mahmoudi M, Rad SK. Biological activities of Juglans regia flowers. Rev Bras Farmacogn 2011; 21(3): 465-470.
43. Eslami B, Nabavi S, Nabavi S, Ebrahimzadeh M, Mahmoudi M. Pharmacological activities of Hypericum scabrum L. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2011; 15(5): 532-537.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-21]