

Research Paper

Investigation on the Effect of Combination of Tanacetum Parthenium and Satureja Montana Methanolic Extracts on the Total Antioxidant Capacity and Serum Nitric Oxide



Zahra Bahramnezhad¹ , Ali Ghazavi^{1,2,3} , Ali Ganji^{1,4} , *Ghasem Mosayebi^{1,2,4} 

1. Department of Immunology & Microbiology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
2. Traditional and Complementary Medicine Research Center (TCMRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
3. Infectious Diseases Research Center (IDRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
4. Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.



Citation: Bahramnezhad Z, Ghazavi A, Ganji A, Mosayebi Gh. [Investigation on the Effect of Combination of Tanacetum Parthenium and Satureja Montana Methanolic Extracts on the Total Antioxidant Capacity and Serum Nitric Oxide (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2021; 24(3):386-397. <https://doi.org/10.32598/JAMS.24.3.6196.1>

 <https://doi.org/10.32598/JAMS.24.3.6196.1>



Article Info:

Received: 27 May 2020

Accepted: 21 Apr 2021

Available Online: 01 Aug 2021

Key words:

Tanacetum parthenium, Satureja montana, Antioxidants, Nitric oxide

ABSTRACT

Background and Aim Medicinal plants contain various biological compounds, including phenols, flavonoids, and terpenoids, with anti-radical and anti-inflammatory activities that affect human health and improve life. Considering the numerous beneficial effects of Tanacetum Parthenium and Satureja Montana and the lack of full antioxidant capacity and anti-inflammatory effects of their combination, we decided to combine these two plants' anti-inflammatory and antioxidant effects on induced acute inflammation in BALB/c mice.

Methods & Materials In the present study, mice received the extracts of T. Parthenium and S. Montana and their combination by gavage for 14 consecutive days. Then, to induce acute inflammation, thioglycollate was injected intraperitoneally to all groups. FRAP and Grease tests were used to evaluate the total antioxidant capacity and serum nitric oxide concentration, respectively. One-way ANOVA analyzed the results.

Ethical Considerations This study was approved by the Research Ethics Committee of Arak University of Medical Sciences (Code: REC.1398.021).

Results The results showed that the combination of the extracts ($P=0.006$) and Satureja Montana ($P=0.021$) led to a significant increase in total antioxidant activity compared to the control group. Also, according to the results of grease test, Satureja montana ($P=0.04$), Tanacetum parthenium ($P=0.034$), and their combination ($P=0.003$) significantly reduced serum nitric oxide production compared to the control group.

Conclusion The present study shows the synergistic effect of the combined extracts to increase their total antioxidant capacity and anti-inflammatory.

Extended Abstract

1. Introduction

Inflammatory diseases are associated with protein denaturation, Nitric Oxide (NO),

and free radicals overproduction [3, 4]. Therefore, it is necessary to use antioxidant and anti-inflammatory agents to prevent oxidative and inflammatory stress. Today, medicinal plants and their aromatic compounds as natural resources have attracted many researchers' attention.

* Corresponding Author:

Ghasem Mosayebi, PhD.

Address: Department of Immunology & Microbiology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Tel: +98 (86) 34173502

E-mail: ghasemmosayebi@arakmu.ac.ir

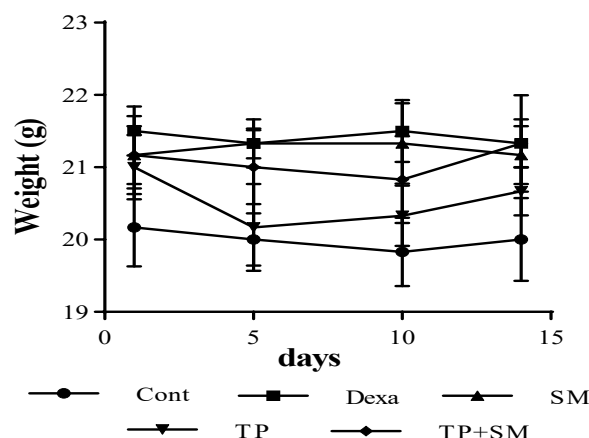


Figure 1. Weight changes in mice

Mice weight was measured on days 1, 5, 10, and 14. Data are expressed as the Means \pm SEM.

Tanacetum parthenium contains antioxidant and anti-inflammatory substances such as sesquiterpene lactones and flavonoids. The studies have shown that T. Parthenium has a role in reducing pain and inflammation in arthritis [12, 13]. Also, Satureja Montana contains various biological compounds such as phenols, alcohols, rosmarinic acid, and ursolic acid triterpenoids [3]. This plant's leaves and aerial parts have antioxidant, anti-inflammatory, and hepatoprotective properties [14, 15].

Considering the beneficial effects of T. Parthenium and S. Montana and the lack of total antioxidant capacity and anti-inflammatory effects of their combination, we decided to combine these two plants' anti-inflammatory and antioxidant effects on induced acute inflammation in BALB/c mice.

2. Materials and Methods

The aerial parts of the dried plants were pulverized separately. Percolation and soxhlet methods, respectively, then performed the extraction of T. Parthenium and S. Montana. The extracts were concentrated using a rotary evaporator, and the alcoholic solvent was separated [16, 17]. According to the OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) guidelines, the extracts' acute toxicity was assessed.

Then, the mice were treated with the extracts and their mixture by gavage for 14 days [19-21]. The control group received DMSO (as a vehicle) by gavage [24], and the positive control group received dexamethasone intraperitoneally (i.p.) as an anti-inflammatory drug [22-23]. During the treatment, the weight of the mice was measured. On the

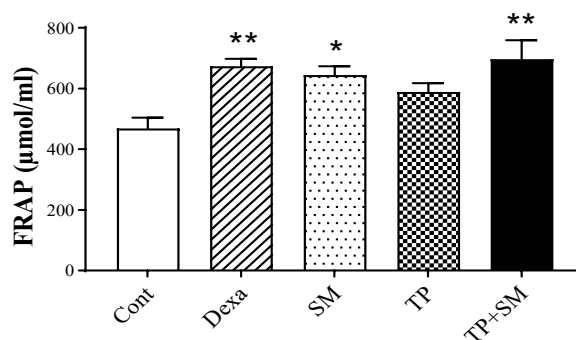


Figure 2. The effect of extracts on total antioxidant capacity

*P<0.05 and **P<0.01 compared to the control group.

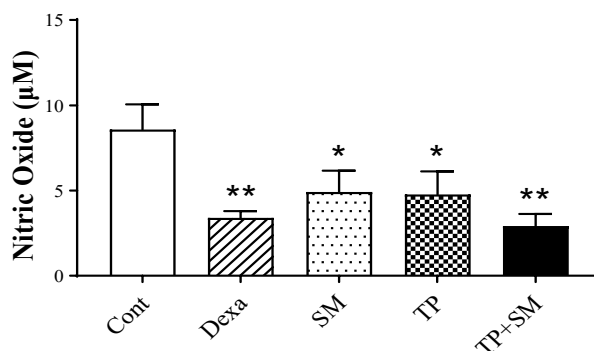


Figure 3. The effect of extracts on serum nitric oxide

* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared to the control group.

10th day of treatment, mice were injected intraperitoneally with 1 ml of sterile 3% (w/v) Brewer-modified thioglycolate solution. 12 to 14 hours after the last gavage, the mice were killed under ethics principles, and the blood was isolated from the mice's hearts [25]. FRAP and Griess's analyses performed total antioxidant capacity and serum nitric oxide concentration, respectively [26, 27]. The results were analyzed in SPSS software using one-way ANOVA.

3. Results

The results indicated no change in the skin, fur, and breaths in the mice. The mean weight in the treatment groups with *T. Parthenium* and *S. Montana* and their combination in the 1, 5, 10, and 14 days during the gavage period showed that the mice receiving the extracts had a similar weight pattern and clinical symptoms to the control group.

Also, the results indicated that the highest antioxidant effect is related to the group of composition of the extracts compared to the control group ($P=0.006$). Also, the FRAP in receiving *S. Montana* extract increased significantly compared to the control group ($P=0.021$). On the other hand, the group of *T. parthenium* extract, despite the increase in FRAP level compared to the control group, did not show a significant increase ($P=0.01$). The results also showed nitric oxide levels in receiving groups of *T. parthenium* extract ($P=0.034$), *S. Montana* ($P=0.04$), and the mixture of the extract ($P=0.003$) decreased significantly compared to the control group (Figure 1, 2 & 3).

4. Discussion and Conclusion

The present study's findings show that the combination of alcoholic extracts of *T. Parthenium* and *S. Montana* causes a significant increase in antioxidant potential and inhibition of serum-free radicals. In this study, the nitric oxide concentra-

tion was also evaluated as an inflammatory mediator. The results indicated that the concentration of nitric oxide decreased significantly compared to the control group.

Many researchers have suggested that the major constituents of *Satureja* species are phenolic monoterpenes, which are often present with γ -terpinene, paracetamol, linalool, oleanolic acid, and ursolic acid and this group of phenolic compounds has antioxidant properties [33, 34]. In one study investigating the neuroprotective effect of oleanolic acid, as an active ingredient of *S. Montana*, in a model of Alzheimer's disease, it was observed that oleanolic acid reduced NO release from BV2-stimulated microglial cell line LPS. In this study, NO production by oleanolic acid was more inhibited than iNOS gene expression, indicating a possible effect of triterpene oleanolic acid on the post-translational process [37].

Also, Previous studies, consistent with other studies, indicate that *T. Parthenium* and its active ingredients reduce NO concentration by inhibiting the expression and synthesis of the iNOS [31, 32]. However, there are differences in the amount and type of these compounds that have different reasons. In general, the constituent compounds can change according to the geographical area of growth, plant age, method of extraction, and the genetic differences of the plants.

The results show that these two plants' extract' combined administration effectively reduces inflammation and increases total antioxidant capacity. The findings indicated synergistic effects of the combination of these two plants. Awareness of these changes' mechanism of action requires further investigation, which we hope to achieve in future studies.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

The study was approved by the Research Ethics Committee of Arak University of Medical Sciences (AUMS) (Code: IR.ARAKMU.REC.1398.021).

Funding

The Vice-Chancellor for Research and Technology of Arak University of Medical Sciences has financially supported the present study.

Authors' contributions

The authors had the writing standards based on the International Committee of Medical Journal Publishers ([ICMJE](#)).

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Deputy and Council for Research of Arak University of Medical Sciences for their support.

This Page Intentionally Left Blank

مقاله پژوهشی

بررسی تأثیر ترکیب عصاره‌های متانلی بابونه گاوی و مرزه کوهی بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و نیتریک اکسید سرمی

زهرا بهرام نژاد^۱، علی قضاوی^{۱،۲،۳}، علی گنجی^{۱،۴}، قاسم مسیبی^{۱،۲،۴}

۱. گروه ایمنی‌شناسی و میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.
۲. مرکز تحقیقات طب سنتی و مکمل، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.
۳. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.
۴. مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: گیاهان دارویی حاوی ترکیبات بیولوژیک گوناگون شامل فنل‌ها، فلاونوئیدها و ترپنوئیدها با فعالیت آنتی‌رادیکالی و ضدالتهابی هستند که بر سلامت و بهبود زندگی انسان اثر می‌گذارد. با توجه به اثرات مفید متعدد دو گیاه بابونه گاوی و مرزه کوهی و اینکه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و اثرات ضدالتهابی ترکیب این دو عصاره بررسی نشده است، ما بر آن شدیم تا اثر ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی توأم این دو گیاه در التهاب حاد ایجادشده در موش‌های نژاد BALB/C را بررسی کنیم.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر، موش‌های مطالعه، عصاره‌های بابونه گاوی، مرزه کوهی و ترکیب آن دو را به مدت ۱۴ روز متوالی به صورت گاواژ دریافت کردند. سپس برای القای التهاب حاد، تیوگلیکولات به صورت داخل صفاقی به تمامی گروه‌ها تزریق شد. برای ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی توتال و غلظت نیتریک اکسید سرمی به ترتیب آزمون‌های FRAP و گریس به کار گرفته شد. نتایج به روش ANOVA یک طرفه تحلیل و بررسی شد.

ملاحظات اخلاقی: این مطالعه با کد اخلاق IR.ARAKMU.REC.1398.021 در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک به ثبت رسید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که ترکیب عصاره‌ها ($P=0/006$) و عصاره مرزه کوهی ($P=0/021$) منجر به افزایش معنادار فعالیت آنتی‌اکسیدانی تام نسبت به گروه کنترل شدند. همچنین طبق نتایج تست گریس، عصاره‌های مرزه کوهی ($P=0/04$)، بابونه گاوی ($P=0/034$) و ترکیب آن‌ها ($P=0/003$) به طور معناداری میزان تولید نیتریک اکسید سرمی را در مقایسه با گروه کنترل کاهش دادند.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان‌دهنده تأثیر هم‌افزایی ترکیب عصاره‌های مذکور در راستای افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و ضدالتهابی آن‌هاست.

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۰۷ خرداد ۱۳۹۹

تاریخ پذیرش: ۰۱ اردیبهشت ۱۴۰۰

تاریخ انتشار: ۱۰ مرداد ۱۴۰۰

کلیدواژه‌ها:

بابونه گاوی، مرزه کوهی، آنتی‌اکسیدان‌ها، نیتریک اکسید

مقدمه

التهاب یک مکانیسم دفاعی بدن میزبان است که بدن را در طول عفونت و یا آسیب محافظت کرده و موجب برقراری هومئوستاز در بدن می‌شود و در صورت مزمن شدن می‌تواند اثرات زیان‌بار موضعی و سیستمیک به همراه داشته باشد و منجر به بیماری شود [۱، ۲]. در بسیاری از اختلالات التهابی، فعال شدن بیش از حد فاگوسیت‌ها و تولید نیتریک اکسید به منزله یک ماده توکسیک مشاهده می‌شود [۳، ۴]. بنابراین موارد مذکور نیاز به

استفاده از ترکیبات گوناگون مانند ترکیبات گیاهی که عوامل آنتی‌اکسیدان و ضدالتهابی برای جلوگیری از تنش اکسیداتیو و التهابی هستند را ضروری می‌کند.

در دهه‌های اخیر، در راستای حذف یا کاهش ترکیبات سنتزی، مطالعات بسیاری برای جایگزین کردن مواد طبیعی به جای شیمیایی انجام شده و گزارش‌های متعددی بیان کردند که گیاهان دارویی دارای ترکیباتی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند [۵]. آنتی‌اکسیدان‌ها به دو دسته شیمیایی (سنتزی) و طبیعی

* نویسنده مسئول:

دکتر قاسم مسیبی

نشانی: اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی‌شناسی.

تلفن: ۰۲۳۴۱۷۳۵۰۲ (۸۶) ۹۸+

پست الکترونیکی: ghasemmosayebi@arakmu.ac.ir



بابونه گاوی از روش پرکولاسیون استفاده شد. بدین منظور، پودر خشک شده گیاه در متانول ۷۰ درصد به مدت ۷ روز در داخل دکانتور دستگاه خیسانده شد. پس از اینکه عصاره به طور کامل خارج شد، با استفاده از دستگاه تبخیر روتاری تغلیظ و حلال الکلی از عصاره جدا شد. سپس برای خشک شدن، در دستگاه فور در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت [۱۴]. عصاره متانولی گیاه مرزه کوهی به روش سوکسله به دست آمد. عصاره گیری به مدت ۸ ساعت با حلال متانول مطلق در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد صورت گرفت. عصاره به دست آمده با دستگاه تبخیر روتاری تغلیظ و حلال الکلی از عصاره جدا شد [۱۵]. سرانجام، عصاره ها پس از توزین و محاسبه میزان بازدهی، در غلظت مناسب در DMSO حل و تا زمان استفاده در دمای منهای ۷۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

انتخاب حیوانات

تعداد ۳۰ سر موش نر نژاد BALB/c، ۶ الی ۸ هفته ای در محدوده وزنی ۲۲ تا ۲۴ گرم و بدون پاتوژن خاص از انستیتو پاستور خریداری و جهت تطبیق با محیط و شرایط جدید به مدت ۲ هفته بدون هیچ مداخله تحقیقاتی نگهداری شدند. شرایط نگهداری شامل دمای 23 ± 1 درجه سانتی گراد، ۱۲ ساعت روشنایی/ تاریکی و در بستری از پوشال بود [۱۸-۱۶].

سنجش سمیت حاد عصاره ها و تیمار حیوانات با عصاره ها

قبل از شروع کار، برای سنجش سمیت حاد عصاره ها، متوسط دُز کشنده (LD50) عصاره های بابونه گاوی و مرزه کوهی طبق مقالات به دست آمد. موش ها به طور تصادفی به ۵ گروه (هر گروه شش موش) تقسیم شدند. قبل از القا التهاب حاد با تایوگلائیکولات در فرایند درمان با عصاره ها قرار گرفتند.

گروه های مطالعه شامل موارد ذکر شده بودند: گروه کنترل (Cont) که حلال دی متیل سولفوکسید (DMSO) را به میزان ۳۰ درصد دریافت کردند، گروه درمانی عصاره بابونه گاوی (TP) با دریافت ۶۰ mg/kg از عصاره بابونه گاوی [۲۰، ۱۹]، گروه درمانی مرزه کوهی (SM) با دریافت ۴۰ mg/kg از عصاره مرزه کوهی [۲۱] و گروه درمانی ترکیب (TP + SM) با دریافت نسبت ۵۰/۵۰ از عصاره ها (ترکیب ۳۰ mg/kg از عصاره بابونه گاوی و ۲۰ mg/kg از عصاره مرزه کوهی) به صورت گاواژ به مدت ۱۴ روز متوالی دریافت کردند. گروه کنترل درمان شده با دگزامتازون (Dexa) به صورت داخل صفاقی دگزامتازون دریافت کرد [۲۲، ۲۳]. عصاره ها در DMSO حل شد، زیرا DMSO یک ماده سمی و توکسیک است، به همین دلیل عصاره ها در ۳۰ درصد از DMSO حل شد که طبق مطالعات قبلی این مقدار از دی متیل سولفوکساید اثر سمی ندارد [۲۴]. موش ها در این مدت از نظر الگوی رفتاری، ظاهر فیزیکی (پوست و خز) و تغییر در تعداد تنفس پایش شدند. همچنین وزن موش ها در روزهای ۱، ۵، ۱۰ و ۱۴ اندازه گیری و ثبت شد.

تقسیم می شوند [۶]. طبق برخی از تحقیقات انجام شده، استفاده از آنتی اکسیدان های سنتزی در بعضی از کشورها به سبب اثرات نامطلوب آن ها روی سلامتی افراد، دارای محدودیت هستند [۵]. همچنین افزایش استفاده از داروهای گیاهی به دلایل گوناگون از جمله: ناکارآمدی داروهای مرسوم، عوارض جانبی منفی متعدد، دسترسی نداشتن درصد زیادی از مردم به این داروها، همچنین باور و فرهنگ عمومی مبنی بر بی ضرر بودن محصولات طبیعی، ارزان بودن و تجربیات گذشتگان بوده است. بنابراین امروزه استفاده از گروه وسیعی از گیاهان دارویی و ترکیبات آروماتیک آن ها به منزله منابع طبیعی توجه محققان را جلب کرده است.

بابونه گاوی با نام علمی *Tanacetum parthenium* از خانواده کاسنی هاست. این گیاه معمولاً با نام *Feverfew* شناخته می شود [۷]. قسمت های هوایی گیاه دارای مواد آنتی اکسیدان و ضد التهاب مثل لاکتون های سزکوئی ترپنی (پارتنولید، آرتیکانین، سانتامارین) و فلاونوئیدها (آپیژنین، دایوسمتین) است. مطالعات انجام شده روی این گیاه نشان داده که گیاه بابونه گاوی به دلیل دارا بودن این ترکیبات در کاهش درد و التهاب و درمان آرتروز نقش دارد [۹، ۸]. با توجه به وجود ترکیباتی نظیر لاکتون های سزکوئی ترپن و ترکیبات هیدروکسیل دار در عصاره این گیاه، به نظر می رسد که عصاره این گیاه برای جلوگیری از ایجاد آسیب های اکسیداتیو به وسیله مواد اکسیدان مؤثر است [۱۰].

مرزه کوهی با نام علمی *Satureja montana*، معمولاً با نام *Winter savory* شناخته می شود و حاوی ترکیبات بیولوژیکی گوناگون از جمله فنل ها (کارواکرول، تیمول)، الکل ها (ژرانیول، منتول و لینالول) و تری ترپنوئیدهای رزمارینیک اسید و اورسولیک اسید بوده [۳]. عصاره به دست آمده از برگ و بخش های هوایی این گیاه دارای خواص آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و هپاتو پروتکتیو است [۱۱، ۱۲].

با توجه به مطالعات گذشته و بررسی اثرات مفید دو گیاه بابونه گاوی و مرزه کوهی و از طرفی اثرات منفی متعدد داروهای شیمیایی مرسوم، همچنین این نکته که ظرفیت آنتی اکسیدانی تام و اثرات ضد التهابی ترکیب این دو عصاره بررسی نشده است، بر آن شدیم تا اثر توأم این دو گیاه را در التهاب حاد ایجاد شده در موش های نژاد BALB/c بررسی کنیم.

مواد و روش ها

تهیه گیاه و عصاره گیری

نمونه های گیاهی از مراکز دانشگاهی معتبر تهیه و پس از تعیین جنس و گونه گیاهی (با کدهای هرباریومی HVN-IM-13962 and HVN-IM-S13963 به ترتیب برای بابونه گاوی و مرزه کوهی) عصاره گیری انجام شد. بخش های هوایی گیاهان خشک شده به طور جداگانه پودر شد. برای عصاره گیری گیاه

مدل التهاب حاد القاشده با تیوگلیکولات

در این مطالعه، روز دهم درمان (۴ روز قبل از آخرین گاواژ) تیوگلیکولات ۳ درصد به صورت داخل صفاقی به تمامی موش‌ها تزریق شد و اجازه داده شد تا پاسخ‌های التهابی به مدت ۴ روز پیش رود. ۱۲ تا ۱۴ ساعت پس از آخرین گاواژ، موش‌ها با محلول کتامین زایلازین بیهوش شدند و خون‌گیری از قلب آن‌ها انجام پذیرفت. سپس برای جداسازی سرم، نمونه‌های خون سانتریفیوژ شدند [۲۵].

بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم با روش FRAP

FRAP^۱ تکنیکی برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی است که ابتدا برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسما به وجود آمد ولی می‌توان برای آنالیز دیگر مایعات نیز از این روش استفاده کرد. در آزمایش FRAP تغییرات جذب نوری به دلیل تولید رنگ آبی ناشی از احیا Fe^{3+} به Fe^{2+} و واکنش Fe^{2+} با ۲، ۴ و ۶ تری پیریدیل-۵-تریازین (TPTZ) اندازه‌گیری می‌شود. بدین منظور، ابتدا معرف FRAP آماده شد. برای تهیه این معرف، میزان ۲۵ میلی‌لیتر بافر استات (۳۰۰ mM با $PH=۳/۶$) با ۲/۵ میلی‌لیتر از معرف (TPTZ ۱۰ mM) محلول در اسید کلریدریک (۴۰ mM) مخلوط شده و سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول کلرید فریک (۲۰ mM) اضافه شد. مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از معرف FRAP را به هر یک از لوله‌های آزمایش افزوده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از نمونه سرم و یا استاندارد سولفات آهن به لوله‌های مذکور اضافه و کاملاً ورتکس شد. انکوباسیون به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت. در نهایت، شدت رنگ حاصل در طول موج ۵۹۳ نانومتر با استفاده از میکروپلیت الیزا ریدر قرائت و مقدار FRAP به دست آمده با استفاده از استاندارد سولفات آهن ($FeSO_4$) بیان شد [۲۶].

سنجش نیتریک اکسید سرمی با روش Griess

نیتریک اکسید یکی از عوامل مهم در سیستم‌های بیولوژیک از جمله سیستم ایمنی، عصبی و قلبی عروقی محسوب می‌شود و به همین دلیل سنجش آن در بافت‌ها و مایعات بیولوژیک بدن ارزشمند است. یکی از تکنیک‌های سنجش NO، اندازه‌گیری غلظت نیتريت بر اساس واکنش دی‌آزوتاسیون است که اولین بار در سال ۱۸۷۹ گریس آن را پیشنهاد کرد. در این روش ابتدا ۵۰ میکرولیتر از سرم هر موش در میکروپلیت ۹۶ خانه ریخته شد. سپس با توجه به دستورالعمل واکنش گریس، ۵۰ میکرولیتر از محلول سولفانیلامید (۰/۰۵ گرم از پودر سولفانیلامید در ۵ میلی‌لیتر اسید فسفوریک ۰/۵ میلی‌لیتر ۸۵ درصد H_3PO_4 در

۸ میلی‌لیتر آب کروماتوگرافی)) و ۵۰ میکرولیتر از محلول N-۱- نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلراید (NED) (۰/۰۵ گرم از پودر NED در ۵ میلی‌لیتر آب کروماتوگرافی) به هر چاهک اضافه شد که حجم نهایی هر چاهک به ۱۵۰ میکرولیتر رسید. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر قرائت و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت نمونه‌ها محاسبه شد [۲۷].

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از تحقیق با نرم‌افزار SPSS و با به‌کارگیری آنالیز واریانس یک طرفه و با تست تعقیبی LSD صورت گرفت. $P < 0/05$ میزان معناداری در نظر گرفته شد. رسم نمودارها با نرم‌افزار Graph-Pad Prism و نتایج به صورت میانگین \pm خطای معیار (استاندارد) نمایش داده شد.

یافته‌ها

بازدهی عصاره‌ها

بازدهی به دست آمده از ۵۰ گرم پودر اولیه بابونه گاوی برابر با ۲۳/۱۸ گرم و برای ۵۰ گرم از پودر اولیه مرزه کوهی برابر با ۸/۳۴ گرم بود.

نتایج سمیت حاد و بررسی تغییرات وزن موش‌ها در دوره گاواژ

تغییری در ظاهر فیزیکی موش‌ها (پوست و خز) و تعداد تنفس مشاهده نشد. همچنین میانگین وزنی در گروه‌های درمانی با بابونه گاوی و مرزه کوهی و ترکیب آن‌ها در روزهای اول، هفتم و چهاردهم در طول دوره گاواژ نشان داد که موش‌های دریافت‌کننده عصاره‌ها، الگوی وزنی و علائم کلینیکی تقریباً مشابهی را نسبت به گروه کنترل داشتند (تصویر شماره ۱).

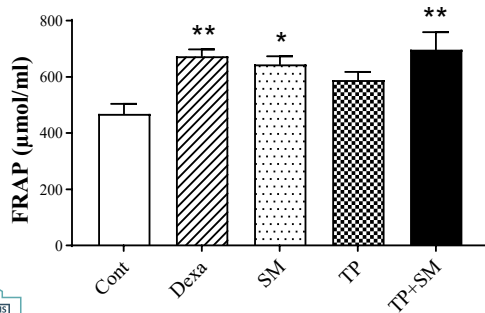
تأثیر عصاره‌ها بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام

همان‌طور که تصویر شماره ۲ نشان می‌دهد، بیشترین افزایش اثر آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با گروه کنترل مربوط به گروه دریافت‌کننده ترکیب عصاره‌ها است ($P=0/006$). همچنین میزان FRAP در گروه دریافت‌کننده عصاره مرزه کوهی در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری ایجاد کرد ($P=0/021$). از طرفی، گروه دریافت‌کننده عصاره بابونه گاوی علی‌رغم افزایش سطح FRAP در مقایسه با گروه کنترل، افزایش معناداری را نشان نداد ($P=0/110$).

تأثیر عصاره‌ها بر میزان نیتریک اکسید سرمی

تصویر شماره ۳ نشان می‌دهد، سطح نیتریک اکسید در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره بابونه گاوی ($P=0/034$)، مرزه کوهی ($P=0/04$) و ترکیب عصاره‌ها ($P=0/003$) در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری داشت.

1. Ferric Reducing Antioxidant Power

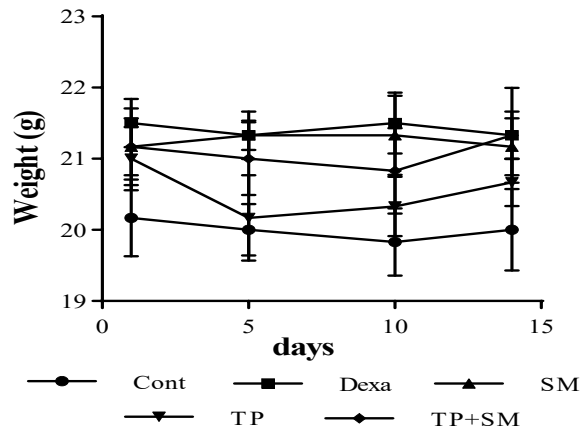


تصویر ۲. تأثیر عصاره‌ها بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم

Cont: کنترل، Dexa: دگزامتازون، SM: مرزه کوهی، TP: بابونه گاوی و TP+SM: ترکیب عصاره مرزه کوهی و بابونه گاوی. تمامی نتایج در مقایسه با گروه کنترل بیان شدند. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار نمایش داده شده است. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل

انجام می‌دهد، بررسی اثر ترکیب این دو عصاره بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی در شرایط درون تنی لازم به نظر می‌آید. یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد، ترکیب عصاره‌های الکلی بابونه گاوی و مرزه کوهی باعث افزایش معنادار در پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد سرم می‌شود. در یک مطالعه، رضایی و همکاران روغن گیاه بابونه گاوی را به علت محتوای بالای مونوترپن و الکل‌های سزکوئی ترپن، به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی برای صنعت غذایی و دارویی پیشنهاد کردند [28]. همچنین در مطالعه‌ای دیگر، تأثیر عصاره گیاه بابونه گاوی بر سطوح آنتی‌اکسیدانی بافت‌های گوناگون رت‌های مواجهه‌یافته با تتراکلرید کربن (CCl₄) بررسی شد. در این مطالعه برای ارزیابی میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام ترکیبات مختلف بدن در هموزنات بافت‌های بدن تست FRAP به کار گرفته شد. نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق CCl₄ سبب کاهش میزان آنتی‌اکسیدان تام در هموزنات کبد و کلیه شد اما روی بافت‌های قلب و بیضه تأثیر معنادار نداشت که احتمالاً به علت کمتر بودن غلظت رادیکال‌های آزاد تولید شده باشد و یا به دلیل اینکه این بافت‌ها کمتر در مواجهه با اثرات ترکیبات سمی هستند [16].

در مطالعه حاضر، غلظت نیتریک اکسید نیز به عنوان مدیاتور التهابی ارزیابی شد. نتایج مطالعات ما بیان کرد که غلظت نیتریک اکسید در سرم کاهش معناداری در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد. همچنین کاهش معنادار NO در گروه درمان شده با دگزامتازون نشان‌دهنده افزایش نوع التهابی NO است که کاهش آن با درمان توسط فرآورده‌های مختلف حاکی از خواص ضدالتهابی این ماده است. آندونوا و همکاران غلظت نیتریک اکسید سرمی را در سه گروه از سگ‌های دچار عفونت سودموناس آئروژینوزا پوستی تجربی مطالعه کردند و به این نتیجه رسیدند که غلظت NO در گروه‌های درمان‌شده با آنتی‌بیوتیک و عصاره استاندارد شده بابونه گاوی (حاوی ۰/۷ درصد ماده فعال پارتنولید)، به طور چشمگیری کاهش یافت. اما گروهی که برای



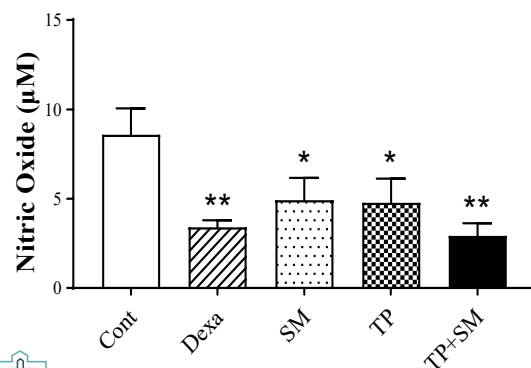
تصویر ۱. تغییرات وزن موش‌ها

Cont: کنترل، Dexa: دگزامتازون، SM: مرزه کوهی، TP: بابونه گاوی و TP+SM: ترکیب عصاره مرزه کوهی و بابونه گاوی. وزن موش‌ها در روزهای ۰، ۱، ۵، ۱۰ و ۱۵ سنجیده شد. تمامی نتایج در مقایسه با گروه کنترل بیان شدند. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار نمایش داده شده است.

بحث

مطالعه حاضر به بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی تام و ضدالتهابی ترکیبی از عصاره‌های مرزه کوهی و بابونه گاوی پرداخته است که نتیجه این مطالعه با کاهش معنادار غلظت نیتریک اکسید و همچنین افزایش اثرات آنتی‌اکسیدانی تام در موش‌های درمان‌شده با ترکیبی از عصاره‌های مرزه کوهی و بابونه گاوی همراه بود.

با توجه به آثار متعدد عصاره‌های بابونه گاوی، مرزه کوهی و ماده مؤثر آن‌ها و اعمال گوناگون که رادیکال‌های آزاد در بدن



تصویر ۳. تأثیر عصاره‌ها بر میزان نیتریک اکسید سرمی

Cont: کنترل، Dexa: دگزامتازون، SM: مرزه کوهی، TP: بابونه گاوی و TP+SM: ترکیب عصاره مرزه کوهی و بابونه گاوی. تمامی نتایج در مقایسه با گروه کنترل بیان شدند. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار نمایش داده شده است. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل

باشد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شده یک نمونه در ارتباط با روش مورد استفاده و منبع تولید رادیکال آزاد یا عامل اکسیدکننده است. به علاوه، برای بررسی کاهش یا افزایش استرس اکسیداتیو در اثر این عصاره‌ها و ترکیب آن‌ها لازم بود که معیارهای دیگر برای سنجش و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نظر گرفته می‌شد.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان می‌دهد که تجویز توأمان عصاره‌های متانلی بابونه گاوی و مرزه کوهی بر کاهش التهاب و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام مؤثر بوده و یافته‌ها حاکی از اثرات هم‌افزایی (سینرژیستی) ترکیب این دو گیاه است. آگاهی از چگونگی تأثیر ترکیبات این دو گیاه و چگونگی مکانیسم این تغییرات در عوامل مورد مطالعه نیازمند بررسی‌های بیشتری است که امیدواریم در مطالعات بعدی بتوانیم به آن‌ها دست یابیم.

در پایان پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده به بررسی اثرات هم‌افزایی عصاره‌های مذکور یا هریک از عصاره‌ها با داروهای ضدالتهابی شیمیایی مرسوم در مدل‌های التهابی اتوایمیون پرداخته شود. همچنین نقش هم‌افزایی این گیاهان در پلاریزاسیون ماکروفاژها و آبشارهای التهابی برای دست‌یابی به نتایج جامع‌تر پیشنهاد می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه با کد اخلاق R.ARAKMU.REC.1398.021 در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک به ثبت رسید.

حامی مالی

معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اراک از پژوهش حاضر حمایت مالی کرده است.

مشارکت‌نویسندگان

نویسندگان استانداردهای نوشتاری را بر اساس کمیته بین‌المللی ناشران مجلات پزشکی (ICMJE) رعایت کرده‌اند.

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله تصریح می‌کنند که هیچ‌گونه تعارض منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک به دلیل تأمین مالی تشکر و قدردانی می‌شود.

آن‌ها عصاره گیاه تجویز شده بود، بیشترین کاهش را نسبت به سایر گروه‌ها در روز هفتم نشان داد. پس از آن تا انتهای آزمایش (روز چهاردهم) میزان NO دوباره افزایش پیدا کرد، ولی غلظت NO در گروه درمان‌نشده و گروه دریافت‌کننده ترکیب آنتی‌بیوتیک و عصاره گیاهی بیشتر از گروه کنترل بود [۲۹]. در مطالعه‌ای دیگر روی موش‌های دچار آنسفالومیلیت تجربی خودایمن، مبنی بر بررسی تأثیر پارتنولید (ماده مؤثره بابونه گاوی) روی سلول‌های پری‌توتال موشی، مشاهده شد که تولید NO به طور چشمگیری پس از درمان با پارتنولید کاهش یافت [۳۰]. این نتایج همسو با مطالعات دیگر نشان‌دهنده این است که پارتنولید از طریق مهار بیان و سنتز آنزیم iNOS باعث کاهش غلظت NO می‌شود [۳۱، ۳۲].

۱۳ گونه مرزه (Savory) شامل S. montana، S. hortensis، S. khuzestanica و S. bachtiarica از لحاظ بالینی و فیتو فارماکولوژیکی اهمیت بیشتری دارند و مطالعات انجام‌شده روی روغن ضروری آن‌ها اکثراً مرتبط با ویژگی‌های آنتی‌میکروبیال است، اما ویژگی‌های آنتی‌اکسیدان، آنتی‌دیابتی و آنتی‌کلسترولمی این گونه نیز انجام شده است. بسیاری از محققان بیان کردند ترکیبات عمده گونه‌های جنس مرزه از مونوترپن‌های فنلی مثل تیمول و کارواکرول است که اغلب به همراه گاماتریپین، پاراسیمن، لینالول، اولئانولیک اسید و اورسولیک اسید وجود دارند و این گروه از ترکیبات فنلی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند؛ این یافته‌ها با نتایج ما مطابقت دارد. البته در مقدار و نوع این ترکیبات تفاوت‌هایی مشاهده می‌شود که دلایل گوناگونی دارد و به طور کلی ترکیبات تشکیل‌دهنده آن می‌تواند بر حسب منطقه جغرافیایی رویش، سن گیاه، روش عصاره‌گیری و درنهایت تفاوت ژنتیکی گیاه تغییر کند [۳۳، ۳۴]. حسنین و همکارانش گزارش کردند که در ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی فراکشن اتیل استات عصاره متانلی مرزه کوهی با روش DPPH، به دلیل حضور مواد پلی فنلی در این فراکشن، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به اندازه روغن ضروری آن افزایش می‌یابد [۳۵]. در مطالعه‌ای دیگر عصاره متانلی S. macrostema برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق سنجش DPPH در مقایسه با آسکوربیک اسید بررسی شد. نتایج نشان داد، عصاره متانلی این گونه مرزه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کمتری نسبت به آسکوربیک اسید (۸۹/۸۷ درصد در مقابل ۹۷ درصد) ایجاد می‌کند [۳۶]. همچنین در مطالعه کاستاتو و همکارانش در راستای بررسی اثر نوروپروتکتیو اولئانولیک اسید (ماده مؤثره مرزه کوهی) در مدل بیماری آلزایمر در شرایط آزمایشگاهی مشاهده شد که اولئانولیک اسید منجر به کاهش آزادسازی NO از رده سلولی میکروگلیال BV2 تحریک‌شده با LPS می‌شود. در این مطالعه، تولید NO به واسطه اولئانولیک اسید بیشتر از بیان ژن iNOS مسدود شد که نشان‌دهنده اثر احتمالی تری‌ترپن اولئانولیک اسید در فرایند پس از ترجمه است [۳۷].

در مجموع، تناقض در نتایج تحقیقات متفاوت می‌تواند در ارتباط با نوع ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان، مکانیسم مختلف واکنش آن‌ها و کینتیک متفاوت واکنش‌های مهارتی آن‌ها در روش‌های انتخابی

References

- [1] Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in neurodegenerative disease—a double-edged sword. *Neuron*. 2002; 35(3):419-32. [DOI:10.1016/S0896-6273(02)00794-8]
- [2] Vishal V, Ganesh S, Mukesh G, Ranjan B. A review on some plants having anti-inflammatory activity. *J Phytopharmacol*. 2014; 3(3):214-21. http://www.phytopharmacjournal.com/Vol3_Issue3_09.pdf
- [3] Vitanza L, Maccelli A, Marazzato M, Scazzocchio F, Comanducci A, Fornarini S, et al. *Satureja montana* L. essential oil and its antimicrobial activity alone or in combination with gentamicin. *Microbial Pathogenesis*. 2019; 126:323-31. [DOI:10.1016/j.micpath.2018.11.025]
- [4] Prashanth S, Pooja S, Suchetha K, Vidya V. Radical scavenging and antioxidant activities of ethanolic and aqueous extract from the leaves of Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.) and asynthetic compound parthenolide. *J pharmacogn phytochem*. 2015; 4(1): 223-7. https://www.researchgate.net/profile/Priya-Priya-6/publication/320346118_
- [5] Hariharan P, Subburaju T. Medicinal plants and its standardization-A global and industrial overview. *Glob J Med Plant Res*. 2012; 1(1):10-3. <http://www.aensiweb.com/ol/GJMPPR/2012/10-13.pdf>
- [6] Kulkarni KM, Patil LS, Khanvilkar VV, Kadam VJ. Fingerprinting techniques in herbal standardization. *Indo Am J Pharm*. 2014; 4(2):1049-62. <https://www.semanticscholar.org/paper/>
- [7] World Health Organization. WHO monographs on selected medicinal plants. Geneva: World Health Organization; 2006. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42052>
- [8] Morteza-Semnani K, Saeedi M, Mahdavi MR, Rahimi F. Antimicrobial effects of methanolic extracts of some species of *Stachys* and *Phlomis*. *J Maz Univ Med Sci*. 2007; 17(57):57-66. <https://vlibrary.emro.who.int/imemr/antimicrobial-effects-of-methanolic-extracts-of-some-species-of-stachys-and-phlomis-2/>
- [9] Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, Milos M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*. 2004; 85(4):633-40. [DOI:10.1016/j.foodchem.2003.07.024]
- [10] Singh G, Maurya S, DeLampasona M, Catalan CA. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food Chem Toxicol*. 2007; 45(9):1650-61. [DOI:10.1016/j.fct.2007.02.031]
- [11] Cretnik L, Kotnik P, Škerget M, Knez Ž. Separation of Parthenolide from *Tanacetum Parthenium*. Maribor: University of Maribor; 2000. https://www.researchgate.net/profile/Petra-Kotnik/publication/228763462_
- [12] Parvin N, Ansari Samani R, Shahinfard N, Reissi S, Alibabaei Z, A Asgari A. Effect of alcoholic extract of *Tanacetum parthenium* on acute pain in rat. *J Inflamm Dis*. 2012; 16(1):15-21. <http://journal.qums.ac.ir/article-1-1236-en.html>
- [13] Pareek A, Suthar M, Rathore GS, Bansal V. Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.): A systematic review. *Pharmacogn Rev*. 2011; 5(9):103. [DOI:10.4103/0973-7847.79105]
- [14] Escudero J, López JC, Rabanal RM, Valverde S. Secondary metabolites from *Satureja* species. New triterpenoid from *Satureja acinos*. *J Nat-Prod*. 1985; 48(1):128-31. [DOI:10.1021/np50037a025]
- [15] Kim SH, Hong JH, Lee YC. Ursolic acid, a potential PPAR γ agonist, suppresses ovalbumin-induced airway inflammation and Penh by down-regulating IL-5, IL-13, and IL-17 in a mouse model of allergic asthma. *Eur J Pharmacol*. 2013; 701(1-3):131-43. [DOI:10.1016/j.ejphar.2012.11.033]
- [16] Mahmoodzadeh Y, Mazani M, Rezagholizadeh L. Hepatoprotective effect of methanolic *Tanacetum parthenium* extract on CCl $_4$ -induced liver damage in rats. *Toxicol Rep*. 2017; 4:455-62. [DOI:10.1016/j.toxrep.2017.08.003]
- [17] Amiri H. The in vitro antioxidative properties of the essential oils and methanol extracts of *Satureja macrosiphonia* Bornm. *Nat Prod Res*. 2011; 25(3):232-43. [DOI:10.1080/14786410903374694]
- [18] Malik F, Singh J, Khajuria A, Suri KA, Satti NK, Singh S, et al. A standardized root extract of *Withania somnifera* and its major constituent withanolide-A elicit humoral and cell-mediated immune responses by up regulation of Th1-dominant polarization in BALB/c mice. *Life Sci*. 2007; 80(16):1525-38. [DOI:10.1016/j.lfs.2007.01.029]
- [19] Subha D, Geetha N. Evaluation of acute toxicity of the methanolic extract of *Tanacetum parthenium* L. in albino wistar rats. *J Sci Innov Res*. 2017; 6(3):113-5. http://www.jsirjournal.com/Vol6_Issue3_07.pdf
- [20] Pooja S, Prashanth S, Suchetha K, Vidya V, Krishna B. Evaluation of acute and sub acute toxicity of the leaf extract of *Tanacetum parthenium* (Asteraceae) and synthetic parthenolide. *World J Pharm Pharm Sci*. 2016;5(8):703-13. https://www.researchgate.net/profile/Pooja-Shivappa/publication/316643904_
- [21] Hajhashemi V, Ghannadi A, Pezeshkian SK. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Satureja hortensis* L. extracts and essential oil. *J Ethnopharmacol*. 2002; 82(2-3):83-7. [DOI:10.1016/S0378-8741(02)00137-X]
- [22] Biagiotti S, Menotta M, Orazi S, Spapperi C, Brundu S, Fraternali A, Bianchi M, Rossi L, Chessa L, Magnani M. Dexamethasone improves redox state in ataxia telangiectasia cells by promoting an NRF2-mediated antioxidant response. *FEBS J*. 2016; 283(21):3962-78. [DOI:10.1111/febs.13901]
- [23] Xu T, Qiao J, Zhao L, He G, Li K, Wang J, Tian Y, Wang H. Effect of dexamethasone on acute respiratory distress syndrome induced by the H5N1 virus in mice. *Eur Respir J*. 2009; 33(4):852-60. [DOI:10.1183/09031936.00130507]
- [24] Noel PR, Barnett KC, Davies RE, Jolly DW, Leahy JS, Mawdesley-Thomas LE, et al. The toxicity of Dimethyl Sulphoxide (DMSO) for the dog, pig, rat and rabbit. *Toxicology*. 1975; 3(2):143-69. [DOI:10.1016/0300-483X(75)90081-5]
- [25] Hoover-Plow J, Gong Y, Shchurin A, Busuttill S, Schneeman T, Hart E. Strain and model dependent differences in inflammatory cell recruitment in mice. *Inflamm Res*. 2008; 57(10):457-63. [DOI:10.1007/s00011-008-7062-5]
- [26] Nencini C, Cavallo F, Capasso A, Franchi GG, Giorgio G, Micheli L. Evaluation of antioxidative properties of *Allium* species growing wild in Italy. *Phytother Res*. 2007; 21(9):874-8. [DOI:10.1002/ptr.2168]
- [27] Phizackerley P, Al-Dabbagh S. The estimation of nitrate and nitrite in saliva and urine. *Anal Biochem*. 1983; 131(1):242-5. [DOI:10.1016/0003-2697(83)90161-6]
- [28] Rezaei F, Jamei R, Heidari R. Evaluation of the phytochemical and antioxidant potential of aerial parts of Iranian *tanacetum parthenium*. *Pharm Sci*. 2017; 23(2):136. [DOI:10.15171/PS.2017.20]
- [29] Andonova M, Urumova V, Dimitrova D, Slavov E, Dzhelebov P, Chaprazov T, et al. Evaluation of nuclear factor kappa beta, nitric oxide and blood neutrophil/lymphocyte ratio as biomarkers of inflammatory response and complementary therapy in dogs with experimental skin *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Adv Anim Vet Sci*. 2015; 3(3):174-82. [DOI:10.14737/journal.aavs/2015/3.3.174.182]

- [30] Pal SK, Shukla Y. Herbal medicine: current status and the future. *Asian Pac J Cancer*. 2003; 4(4):281-8. <https://iranjournals.nlai.ir/handle/123456789/31035>
- [31] Oh Y-C, Jeong YH, Cho W-K, Ha J-H, Gu MJ, Ma JY. Anti-inflammatory and analgesic effects of pyeongwisan on LPS-stimulated murine macrophages and mouse models of acetic acid-induced writhing response and xylene-induced ear edema. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(1):1232-51. [DOI:10.3390/ijms16011232]
- [32] Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol*. 2008; 83(1):14. [DOI:10.1002/0471142735.im1401s83]
- [33] Polatoğlu K, Karakoç ÖC, Gören N. Phytotoxic, DPPH scavenging, insecticidal activities and essential oil composition of *Achillea vermicularis*, *A. teretifolia* and proposed chemotypes of *A. biebersteinii* (Asteraceae). *Ind Crops Prod*. 2013; 51:35-45. [DOI:10.1016/j.indcrop.2013.08.052]
- [34] Miguel MG. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. *Molecules*. 2010; 15(12):9252-87. [DOI:10.3390/molecules15129252]
- [35] Innovare I. Antioxidant Polyphenolic Constituents Of *Satureja Montana* L. Growing in Egypt. 6(4):578-81. https://www.researchgate.net/publication/262030381_Antioxidant_polyphenolic_constituents_of_satureja_montana_L_Growing_in_Egypt
- [36] Gutierrez RMP, Navarro YTG. Antioxidant and hepatoprotective effects of the methanol extract of the leaves of *Satureja macrostema*. *Pharmacogn Mag*. 2010; 6(22):125. [DOI:10.4103/0973-1296.62901]
- [37] Castellano JM, Garcia-Rodriguez S, Espinosa JM, Millan-Linares MC, Rada M, Perona JS. Oleanolic acid exerts a neuroprotective effect against microglial cell activation by modulating cytokine release and antioxidant defense systems. *Biomolecules*. 2019; 9(11):683. [DOI:10.3390/biom9110683]