Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
No 67, Volume 17, Issue 3

Check for updates

Original Article

Effect of Ethanolic Extract of *Dracocephalum Kotschyi* on Inflammatory and Oxidative Stress Biomarkers in Male Wistar Rats

Nafiseh Vahidi[1], Ameneh Mohammadi[2], Hamid Mollazadeh[3], Manouchehr Teymouri[4], Peiman Alesheikh[4], Maryam Rameshrad[4,5*], Jamal Kasaian[4]

[1] Student Research Committee, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[2] MSc in Phytochemistry, Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Physiology, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[4] Assistant Professor, Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[5] Assistant Professor, Department of Pharmacodynamics and Toxicology, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

***Corresponding author:** Maryam Rameshrad, Assistant Professor, Department of Pharmacodynamics and Toxicology, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. Email: mrameshrad@gmail.com

DOI: 10.32592/nkums.17.3.45

How to Cite this Article:
Vahidi N, Mohammadi A, Mollazadeh H, Teymouri M, Peiman Alesheikh, Rameshrad M, Kasaian J. Effect of Ethanolic Extract of *Dracocephalum Kotschyi* on Inflammatory and Oxidative Stress Biomarkers in Male Wistar Rats. J North Khorasan Univ Med Sci. 2025;17(3): 45-53. DOI: 10.32592/nkums.17.3.45

Received: 13 April 2025
Accepted: 21 June 2025

Keywords:
Anti-inflammatory
Antioxidant
Carrageenan
D. kotschyi

Abstract

Introduction: Oxidative stress is a phenomenon caused by an imbalance between the production and accumulation of reactive oxygen species (ROS) in cells and tissues, and the inability of a biological system to detoxify these reactive products. *Dracocephalum kotschyi* is traditionally used in local treatment for inflammatory complications. This study investigated the effect of *D. kotschyi* extract on oxidative stress biomarkers in male Wistar rats.

Method: Male Wistar rats were randomly divided into five groups, each with ten rats, and received ethanol extract (12.5, 25, and 50 mg/kg, i.p.) and indomethacin (2.5 mg/kg) as the reference drug. Rat hind paw edema caused by carrageenan injection was used for acute inflammation. The animals were inoculated with carrageenan (1% w/v, 0.1 ml) before measuring the thickness of their left hind paw at hourly intervals. Catalase, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), malondialdehyde (MDA), and total antioxidant capacity (TAC) were determined using standard methods. Moreover, the major bioactive compound in the extract was identified using high-performance liquid chromatography (HPLC) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. In addition, comparisons were made using one-way analysis of variance (ANOVA).

Results: The edema reduction with the extract was comparable to that of indomethacin, especially at 12.5 and 25 mg/kg doses, from the very beginning of carrageenan inoculation ($p<0.01$). The extract also remarkably reduced the level of MDA ($p<0.001$), enhanced the activity of ROS-scavenging enzymes ($p<0.001$), and exhibited a significant 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity. Moreover, 1 g of the extract yielded 23.8 mg of luteolin-7-O-glucoside following purification. In conclusion, *D. kotschyi* ethanol extract is a potential herbal medicine for treating edema and ROS reactions associated with it, likely due to the presence of effective phenolic compounds, such as luteolin-7-O-glucoside.

Conclusion: The ethanol extract of *D. kotschyi* could be a potential herbal medicine for the treatment of edema and its resulting ROS reactions, likely due to the presence of compounds such as luteolin-7-o-glucoside.

Copyright *© 2025 The Author(s); Published by Journal of North Khorasan University of Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-10-05]

مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
دوره ۱۷، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۴

مقاله پژوهشی

اثر عصاره اتانولی گیاه *Dracocephalum kotschyi* بر بیومارکرهای التهابی و استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار

نفیسه وحیدی[۱]، آمنه محمدی[۲]، حمید ملازاده[۳]، منوچهر تیموری[۴]، پیمان آل شیخ[۴]، مریم رامش راد[۴،۵*]، جمال کسائیان[۴]

[۱] دانشجوی دکترای عمومی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۲] کارشناس ارشد فیتوشیمی، مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۳] استادیار، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۴] استادیار، مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۵] استادیار، گروه سم‌شناسی و فارماکودینامی، دانشکده داروسازی مشهد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

***نویسنده مسئول:** مریم رامش راد، استادیار، گروه سم‌شناسی و فارماکودینامی، دانشکده داروسازی مشهد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران. ایمیل: mrameshrad@gmail.com

DOI: 10.32592/nkums.17.2.45

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۳۱

واژگان کلیدی:
ضدالتهاب
آنتی‌اکسیدان
کاراژنین
D.kotschyi

چکیده

مقدمه: استرس اکسیداتیو پدیده‌ای است که در اثر عدم تعادل بین تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (*ROS*) در سلول‌ها و بافت‌ها و عدم توانایی یک سیستم بیولوژیکی در سم‌زدایی این محصولات واکنش‌پذیر ایجاد می‌شود. *Dracocephalum kotschyi* به طور سنتی در درمان موضعی عوارض التهابی استفاده می‌شود. این مطالعه به بررسی اثر عصاره *D.kotschyi* بر بیومارکرهای استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار می‌پردازد.

روش کار: موش‌های صحرایی نر ویستار به طور تصادفی به پنج گروه با ده موش در هر گروه تقسیم شدند و عصاره اتانولی (۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) و ایندومتاسین (۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به‌عنوان داروی مرجع دریافت کردند. ادم پنجه عقب موش که در اثر تزریق کاراژنین ایجاد می‌شود، به منظور القا التهاب حاد مورد استفاده قرار گرفت. قبل از اندازه‌گیری ضخامت پنجه عقب چپ حیوانات در فواصل ساعتی با کاراژنین (۱٪ w/v، ۰/۱ میلی‌لیتر) تلقیح شد. کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPx)، مالون دی آلدئید (MDA)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) با استفاده از روش‌های استاندارد تعیین شدند. همچنین ترکیب فعال زیستی اصلی آن عصاره با استفاده از HPLC و NMR تعیین شد. مقایسه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه انجام شد.

یافته‌ها: کاهش ادم با عصاره، به خصوص در دوزهای ۱۲/۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، از همان ابتدای تلقیح کاراژنین با ایندومتاسین قابل مقایسه بود ($p<۰/۰۱$). عصاره، سطح MDA را به طور قابل‌توجهی کاهش داد ($p<۰/۰۰۱$) و از طرفی فعالیت آنزیم‌های مهارکننده ROS را افزایش داد ($p<۰/۰۰۱$) و ظرفیت مهار رادیکال DPPH قابل‌توجهی را نشان داد. عصاره، حاوی ۲/۳۸ درصد ماده لوتئولین-۷-O-گلوکزید می‌باشد.

نتیجه‌گیری: عصاره اتانولی *D.kotschyi* می تواند به عنوان یک داروی گیاهی برای درمان ادم و واکنش های ROS ناشی از آن پیشنهاد شودکه احتمالاً به دلیل وجود ترکیبات فنلی موثر مانند لوتئولین-۷-O-گلوکزید است.

مقدمه

Dracocephalum kotschyi، از خانواده نعناعیان و با نام فارسی رایج "زرین گیاه"، گیاهی غنی از ترکیبات درمانی مفید است که در درمان بیماری‌هایی مانند آرتریت، سردرد و اختلالات گوارشی استفاده می‌شود [۱]. بیشترین ترکیبات یافت‌شده در این گیاه زانتومیکرول، لیمونن، ژرانیال، آپیژنین و کالیکوپترین می‌باشد که دارای خواص ضدالتهابی و رادیکال‌زدایی قوی هستند [۱]. ادم یک علامت التهابی غیراختصاصی به دنبال پاسخ‌های التهابی است [۲]. این علامت بیماری با خارج شدن مایعات و واسطه‌های التهابی در محیط خارج‌سلولی شناخته می‌شود [۲]. اگرچه این رویداد به مقابله با پیشرفت پاتوژن و حذف سلول‌های آسیب‌دیده کمک می‌کند، اما اگر به شدت کنترل نشود باعث آسیب

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-10-05]

شدید می‌شود. ادم با به‌کارگیری طیف گسترده‌ای از سلول‌های ایمنی و نفوذ نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها، آزادسازی انواع مختلف واسطه‌های التهابی (مانند پروستاگلاندین‌ها)، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) (مانند اکسیدهای نیتریک، سوپراکسیدها، پراکسیدهای لیپید و سوپراکسیدهای لیپیدی، پراکسیدهای لیپیدی، پراکسیدهای نیتروژن، و ادم شروع می‌شود [۳-۵]. با توجه به پیامدهای مضر ادم، رویکرد مرسوم کاهش علائم با سرکوب تجمع واسطه‌های مرتبط با ادم است [۶] . این امر با تجویز داروهای سرکوب‌کننده ایمنی، گلوکوکورتیکوئیدهای ضدالتهابی و استفاده از داروهایی با خواص آنتی‌اکسیدانی قوی به دست می‌آید [۷]. به نظر می‌رسد استفاده از گلوکوکورتیکوئیدها به تنهایی کارایی بالینی محدودی با عوارض جانبی بالا داشته باشد [۶] که استفاده از ترکیبات درمانی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی را نیز ضروری می‌کند. از آن‌جایی که *D.kotschyi* غنی از چندین ترکیب آنتی‌اکسیدانی است [۸]، گزارش حاضر سعی دارد اثر عصاره الکلی گیاه *D.kotschyi* را بر بیومارکرهای التهابی و استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار بررسی کند.

روش کار

جمع‌آوری و استخراج گیاهان دارویی

D.kotschyi در اردیبهشت ماه، از مناطق کوهستانی برداشت شد. نمونه هرباریومی با شماره ۱۱۱۴ به مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران، داده شد. بخش هوایی برای مطالعه انتخاب خشک و آسیاب شد و به مدت ۴۸ ساعت در اتانول مطلق در دمای اتاق خیسانده شد. سپس حلال صاف شده در دمای ۵۰-۴۵ درجه سانتیگراد در خلاء تبخیر گردید.

محتوای فنلی کل

برای ارزیابی محتوای فنلی کل عصاره از تکنیک فولین سیوکالتیو استفاده شد. برای این منظور،۱۰ میکرولیتر از عصاره (۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با معرف فولین سیوکالتیو (۱۰۰ میکرولیتر) در یک پلیت ۹۶ خانه مخلوط و به مدت سه دقیقه انکوبه شد. سپس محلول کربنات سدیم اشباع (۹۰ میکرولیتر، ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد و پلیت دوباره به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. سپس داده‌های جذب در طول موج ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت‌خوان (BioTek, ELx800) در برابر منحنی استاندارد اسیدگالیک ثبت شد که در آن داده‌ها به صورت میلی‌گرم معادل اسیدگالیک در هر گرم عصاره خشک نشان داده شد [۹].

توانایی مهار رادیکال‌های آزاد

برای بررسی قدرت مهار رادیکال آزاد از تکنیک مهار رادیکال و ۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل‌هیدرازیل (DPPH) استفاده شد [۱۰]. ۱۰ میکرولیتر از عصاره در محدوده غلظتی ۸-۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با ۲۰۰ میکرولیتر معرف DPPH، ۳۰۰ میکرومولار DPPH در پلیت ۹۶ خانه مخلوط شد. به طور مشابه، بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. میکروپلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از آن، جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر در مقابل نمونه شاهد ثبت شد. درصد مهار بازدارندگی بر اساس معادله زیر محاسبه شد.

درصد مهارکنندگی = {(جذب شاهد − جذب نمونه)} ÷ جذب شاهد × ۱۰۰

IC_{50} عصاره توسط نرم افزار GraphPad Prism نسخه ۵ (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) تعیین شد.

جداسازی و شناسایی ماده موثره موجود در عصاره

عصاره اتانولی با استفاده از کروماتوگرافی ستونی و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نیمه آماده فاز معکوس (HPLC) جداسازی و سپس توسط طیف‌سنجی رزونانس مغناطیس هسته (NMR) مشخص شد. در ابتدا، عصاره اتانولی (۲/۲ گرم) توسط کروماتوگرافی ستونی (۱۰۰×۱۰ سانتی‌متر) و سیلیکاژل (مش ۴۰۰-۲۳۰) با شویش گرادیان توسط حلال‌های پترولیوم اتر، اتیل استات و متانول شسته‌شد و فراکسیون‌های مشابه بر اساس پروفایل‌های کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) جمع‌آوری شدند که از این میان، بیشترین فراکسیون به شویش گرادیان توسط حلال اتیل استات: متانول (از ۲۰:۸۰ تا ۴۰:۶۰) (۵۰ میلی‌گرم) مربوط می‌شوند. سپس خالص‌سازی بیشتر توسط HPLC (Prominence LC-20A Modular HPLC System, Shimadzu Corporation, Japan) با سیستم حلال متانول: آب (۱۰:۹۰) انجام گرفت [۱۱]. ترکیب جداشده از نظر ساختار مولکولی با استفاده از طیف‌سنجی H-NMR و C-NMR (Brucker Avance TM 500 DRX) فرکانس ۵۰۰ مگاهرتز برای H۱ و ۱۲۵ مگاهرتز برای C۱۳ مشخص شد. تترامتیل‌سیلان به‌عنوان استاندارد داخلی مورد استفاده قرار گرفت و طیف‌ها با طیف‌های موجود در مطالعات دیگر مقایسه شدند [۱۲].

مطالعه روی حیوانات

موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (۱۸۰-۲۰۰ گرم) از آزمایشگاه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی تهیه شدند. این حیوانات از نظر ظاهری همه سالم بودند و قبلا آزمایشی بر روی آن‌ها انجام نشده بود. آن‌ها در آزمایشگاه حیوانات تحت شرایط استاندارد (۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد و مجموعه نور/تاریکی ۱۲ ساعت) و تغذیه آزاد قرار گرفتند. حیوانات به طور تصادفی به پنج گروه با ده موش در هر گروه تقسیم شدند. سعی شد چینش حیوانات از نظر وزنی در همه گروه‌ها یکسان باشد. حیوانات در گروه یک (شاهد) حلال (۵۰۰ میکرولیتر، داخل صفاقی)، در گروه‌های دو تا چهار (گروه‌های تیمار) عصاره (۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم؛ ۵۰۰ میکرولیتر، داخل صفاقی) [۱۳] و در گروه پنج، ۵ میلی‌گرم ایندومتاسیون به‌عنوان کنترل مثبت تلقیح شد. در این مطالعه کورسازی صورت نگرفته است.

اثر ضدالتهابی

در مطالعه حاضر، ادم پنجه عقب موش که در اثر تزریق کاراژنین ایجاد شده، به عنوان نمونه‌ای از التهاب حاد مورد استفاده قرار گرفت. همه حیوانات با محلول کاراژنین (۱٪ w/v، ۱۰۰ میکرولیتر) در پنجه عقب

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-10-05]

چپ خود، ۳۰ دقیقه پس از دریافت عصاره یا حلال تلقیح شدند. فاصله ضخامت شکمی تا پشتی در پنجه آن‌ها قبل از تزریق کاراژنین و سپس در یک تا چهار ساعت پس از آن توسط کولیس شماره‌گیری اندازه‌گیری شد [۱۴]. داده ها به صورت درصد افزایش ضخامت پنجه بیان شده و با مقادیر قبل از تزریق مقایسه شدند. پس از آخرین اندازه، حیوانات تحت بی هوشی قربانی شدند و پنجه‌های متورم عقب بریده و در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

کیت‌های سنجش

برای بررسی شاخص‌های استرس اکسیداتیو، از کیت‌های تجاری شرکت ZellBio GmbH (آلمان) استفاده شد. سطح مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی با استفاده از کیت MDA اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد در بازه غلظتی ۰–۱۰۰ میکرومولار تهیه گردید و نتایج به‌صورت میکرومول در ۱۰۰ میلی‌گرم پروتئین کل بیان شد. محتوای پروتئین کل با استفاده از کیت برادفورد تعیین گردید. همچنین، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC) با استفاده از کیت TAC سنجش شد و نتایج بر حسب گرم پروتئین کل گزارش شدند. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، از کیت‌های سنجش گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) و سوپراکسیددیسموتاز (SOD) استفاده گردید. فعالیت آنزیم‌ها به‌صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین نمونه بیان شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم افزار GraphPad Prism نسخه ۵، انجام شد. نتایج به صورت میانگین±انحراف معیار بیان می‌شوند. مقایسه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه انجام شد و تفاوت‌های معنادار با آزمون تعقیبی LSD در سطح معناداری $p<۰/۰۵$ مشاهده شد. این مطالعه با حمایت دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد با کد اخلاق IR.NKUMS.REC.1398.040 انجام شد.

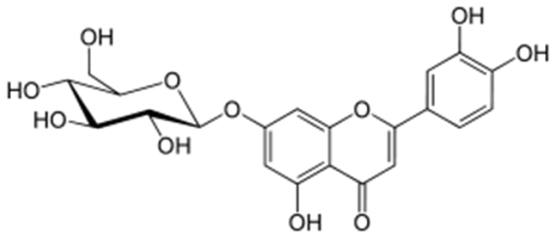
یافته‌ها

بازده استخراج به دست آمده، ۵/۳ درصد بود. محتوای فنلی کل در مقایسه با اسیدگالیک به دست آمد که ۱۳۸/۸۴ میلی‌گرم اسیدگالیک در گرم عصاره بود. در روش مهار رادیکال DPPH، فعالیت آنتی‌اکسیدانی این عصاره نصف BHT بود، با مقادیر IC50 برابر با ۱/۶۸ در مقایسه با ۰/۸۹ mg/ml برای BHT.

در ۲/۲ گرم عصاره اتانولی خشک *D.kotschyi*، فراکسیون با بیشترین مقدار (۲۳/۸ میلی‌گرم) با HPLC جداسازی شد. این فراکسیون از نظر مولکولی به نام لوتئولین-۷-O گلوکوزید، (C21H20O11) به شرح زیر مشخص شد:

^{1}H NMR spectrum (400 MHz, DMSO-d6, δ, ppm); 3.20 (1H, d, H-4"), 3.25 (2H, m, H-2", 3"), 3.44 (1H, m, H-5"), 3.49 (1H, d, H-6a"), 3.72 (1H, d, H-6b"), 5.10 (1H, d, H-1"), 6.46 (1H, d, H-6), 6.80 (1H, d, H-8), 6.76 (1H, s, H-3), 6.91 (1H, d, J = 8.3, H-5'), 7.41 (1H, d, H-2'), 7.47 (1H, dd, H-6'), 9.39 (1H, s, 3'-OH), 9.97 (1H, s, 4'-OH), 13.00 (1H, s, 5-OH).

^{13}C NMR spectrum (100 MHz, DMSO-d6, δ, ppm); 164.95 (C-2), 103.63 (C-3), 182.37 (C-4), 163.43 (C-5), 100.00 (C-6), 161.61 (C-7), 95.19 (C-8), 157.42 (C-9), 105.81 (C-10), 121.85 (C-1'), 114.05 (C-2'), 146.26 (C-3'), 150.41 (C-4'), 114.052 (C-5'), 119.63 (C-6'), 100.37 (C-1"), 73.59 (C-2"), 76.87 (C-3"), 70.02 (C-4"), 77.64 (C-5"), 61.09 (C-6").



شکل ۱: ساختار مولکولی لوتئولین-۷-O-گلوکوزید

جنبه‌های مختلف سوگیری بر اساس ابزار SYRCLE در جدول ۱ آورده شده‌است [۱۵]. رعایت یا عدم رعایت هر کدام از آیتم‌ها در جدول ذکر شده است. وضعیت کلی به این صورت می‌باشد؛ ریسک پایین: تولید توالی تخصیص، ویژگی‌های پایه‌ای، داده‌های ناقص ،گزارش‌دهی گزینشی. ریسک نامشخص: پنهان‌سازی تخصیص، اسکان تصادفی، ارزیابی تصادفی نتایج، سوگیری‌های دیگر. ریسک بالا: کورسازی مراقبان/محققان و کورسازی ارزیاب‌ها.

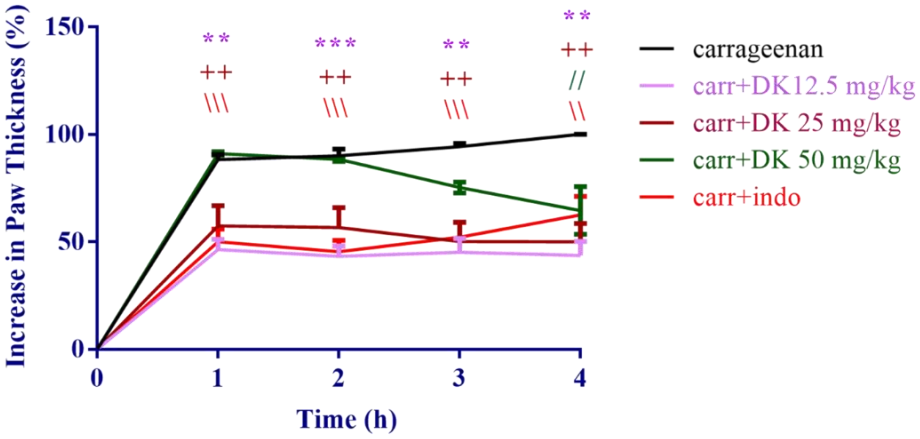
جدول ۱: ارزیابی ریسک سوگیری (Risk of Bias) بر اساس ابزار SYRCLE

شماره	نوع سوگیری	ارزیابی	توضیح
۱	تولید توالی تخصیص	ریسک پایین	تصادفی‌سازی حیوانات به پنج گروه با توجه به وزن بیان شده است.
۲	ویژگی‌های پایه‌ای	ریسک پایین	توزیع وزن در بین گروه‌ها کنترل شده است.
۳	پنهان‌سازی تخصیص	ریسک نامشخص	نحوه پنهان‌سازی تخصیص ذکر نشده است. مطالعه بلایند نبوده است
۴	اسکان تصادفی	ریسک نامشخص	به تصادفی‌بودن محل نگهداری حیوانات اشاره‌ای نشده است.
۵	کورسازی مراقبان/محققان	ریسک بالا	محققان بلایند نبودند
۶	ارزیابی تصادفی نتایج	ریسک نامشخص	اطلاعی از انتخاب تصادفی حیوانات برای ارزیابی وجود ندارد.
۷	کورسازی ارزیاب‌ها	ریسک بالا	محققان بلایند نبودند
۸	داده‌های ناقص	ریسک پایین	داده‌های کامل برای تمامی حیوانات گزارش شده‌اند.
۹	گزارش‌دهی گزینشی	ریسک پایین	تمامی نتایج ذکرشده در روش‌ها در نتایج نیز گزارش شده‌اند.
۱۰	سوگیری‌های دیگر	ریسک نامشخص	کد اخلاق درج شده و عامل مشکوکی به سوگیری دیده نمی‌شود. هرچند به دلیل نبود اطلاعات دقیق درباره شرایط همگن‌سازی یا استانداردسازی سایر متغیرها، ریسک نامشخص در نظر گرفته شد.

بلافاصله پس از تزریق داخل پلانتار کاراژنین، ادم حاد پنجه در همه گروه‌ها شروع شد (شکل ۲) که در یک ساعت پس از تلقیح به یک پلاتو رسید. با این حال، عصاره و ایندومتاسین هر دو ادم را تا ۵۰ درصد کاهش دادند که بر حسب درصد رشد ضخامت پنجه بیان شد. این

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-10-05]

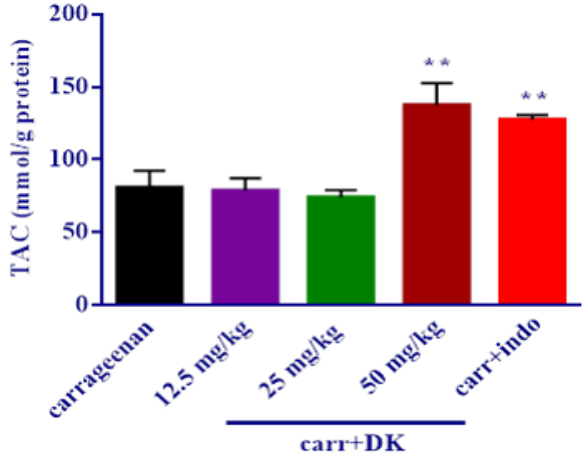
کنترل ادم تا چهار ساعت در تمام گروه‌های درمانی پیگیری شد. دوز پایین این عصاره (۱۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) رشد ضخامت پنجه را تا بیش از ۵۰ درصد در مقایسه با شاهد (p <۰.۰۱) مختل کرد. این روند در حیوانات تحت درمان با دوز متوسط (۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) نیز منعکس شد. تزریق دوز بالا (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) عصاره، با این حال، به همان اندازه کارا نبود و ضخامت پنجه به همان میزانی که در گروه شاهد تیمار نشده در ساعت اول تزریق کاراژنین، افزایش یافت. این حالت ادم تا یک ساعت بعد باقی ماند و به تدریج در ساعت پایانی به ۵۰ درصد کاهش یافت (p<۰/۰۱). با در نظرگرفتن ایندومتاسین، همچنین از رشد ضخامت پنجه و ایجاد ادم در دو ساعت اول تا ۵۰ درصد جلوگیری کرد که پس از آن افزایش متوسطی داشت و در چهار ساعت به ۶۰ درصد رسید (p<۰/۰۱).



شکل ۲: درصد افزایش ضخامت پنجه بر اثر تزریق داخل صفاقی بر ادم پنجه ناشی از کاراژنین

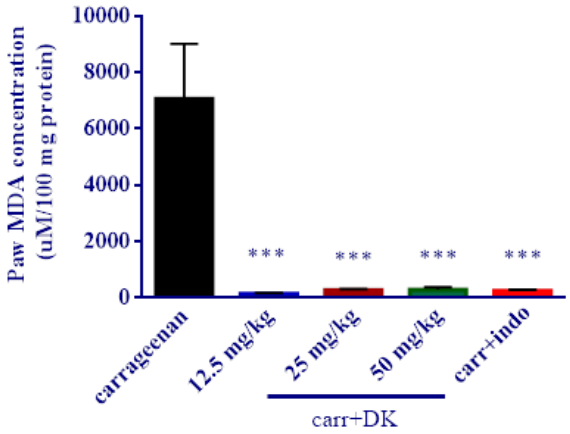
TAC به صورت mmol/g پروتئین بیان می‌شود. TAC بافت همژنه حیوانات تیمار شده با عصاره در حدود سطح گروه کاراژنین با استفاده از دوزهای ۱۲/۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره (به ترتیب۸/۴۳± ۷۸/۷۶ و ۵/۱۸± ۷۳/۸۵ میلی‌مول بر گرم پروتئین) به دست آمد. برای گروه‌هایی که با عصاره ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، تیمار شده بودند، مقدار TAC در ۱۵/۱۹±۱۳۷/۳۹ دو برابر شد (p <۰/۰۱). گروه ایندومتاسین همچنین شاهد افزایش مشابهی در TAC (۳/۰۶ ± ۱۲۷/۶۴) بودند (شکل ۳).

سطح MDA در پنجه چهار ساعت پس از تزریق کاراژنین در شکل ۴ نشان داده شده است. داده‌ها بر حسب میکرومول بر ۱۰۰ میلی گرم پروتئین گزارش شدند. همان‌طور که مشاهده می‌شود، سطح MDA در تمام گروه‌های تیماردر مقایسه با گروه کنترل به شدت کاهش یافت (۱۲/۵ ± ۱۵۵/۶، ۲۷۸±۳۷/۳ و ۲۹۰±۸۹/۷ میکرومول بر ۱۰۰ میلی‌گرم پروتئین در گروه های تحت درمان با عصاره به ترتیب در دوزهای ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم). مقدار MDA در گروه کاراژنین ۱۹۷۶/۲ ±۷۰۶۹/۸ (میکرومول / ۱۰۰ میلی‌گرم پروتئین) می باشد. تفاوتی در سطح MDA بین ایندومتاسین (۳۵/۶±۲۵۵/۳ میکرومول در ۱۰۰ میلی‌گرم پروتئین) و عصاره در سه دوز مشاهده نشد.



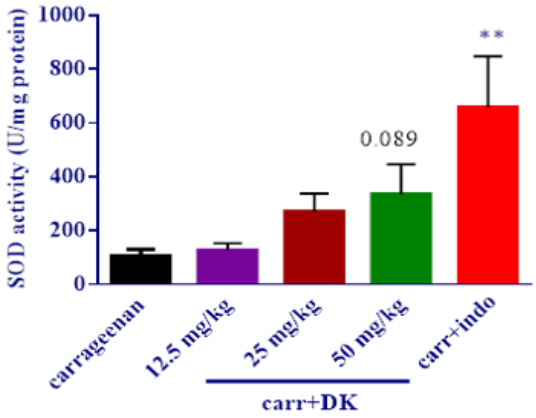
شکل ۳: TAC بافت پنجه نمونه‌های همگن موش‌ها چهار ساعت پس از تزریق داخل صفحه‌ای. ** نشان‌دهنده تفاوت معناداری در مقایسه با گروه تزریقی کاراژنین است (p <۰/۰۱)

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-10-05]



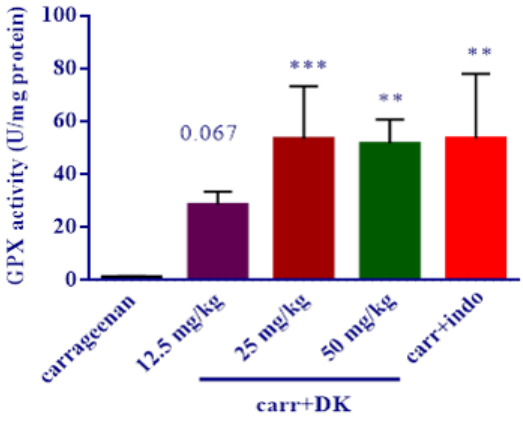
شکل ۴: غلظت MDA پنجه، چهار ساعت پس از تزریق عصاره در دوزهای مختلف. * نشان دهنده تفاوت معناداری در مقایسه با گروه کاراژنین در p<۰/۰۰۰۱ است.**

فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی (SOD و GPX) هموژنه‌های بافت پنجه در حیوانات به دنبال ادم در شکل‌های ۵ و ۶ نشان داده شده است. داده‌ها به صورت واحد در میلی گرم پروتئین بافت بیان می‌شوند. به طور کلی، پیش درمانی با عصاره باعث افزایش فعالیت این آنزیم ها در بافت‌ها، به ویژه فعالیت GPX در دوزهای بالا شد. فعالیت SOD مطابق با افزایش دوز عصاره، از ۱۲۶/۹±۰/۲۶ در ۱۲/۵ میلی‌گرم عصاره در کیلوگرم به ۳۵۵/۲±۱۱۱/۰در ۵۰ میلی‌گرم عصاره در کیلوگرم افزایش یافت. اما این افزایش ناچیز بود (p=۰/۰۹۸) برای ۵۰ میلی‌گرم عصاره بر کیلوگرم). در مقابل، گروه ایندومتاسین شاهد افزایش قابل توجهی در فعالیت SOD در مقایسه با گروه کاراژنین بود (۵۶۸/۷±۱۸۸/۴ در مقابل ۲۳/۷ ± ۱۰۶/۶ U/mgپروتئین، p<۰/۰۱). برخلاف SOD، پیش‌درمانی با عصاره در افزایش فعالیت GPX بسیار موثرتر بود و آن را از ۱/۳±۰/۲ U/mg پروتئین در گروه کاراژنین به ۲۸/۴ ±۵ (۰/۰۶۷ =p با پایین ترین دوز عصاره) رساند. فعالیت این آنزیم در دوزهای بالای عصاره در مقایسه با گروه کاراژنین به صورت کاملا معنی داری افزایش یافت و به سطح مشابه ایندومتاسین، با میانگین ۵۳ واحد بر میلی گرم پروتئین رسید.



شکل ۵: فعالیت SOD پنجه چهار ساعت پس از تزریق عصاره اتانولی *D.kotschyi* در دوزهای مختلف. ** نشان‌دهنده تفاوت معناداری در مقایسه با گروه تزریق شده با کاراژنین است (P<۰/۰۱).

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-10-05]



شکل ۶: فعالیت GPX پنجه چهار ساعت پس از تزریق عصاره اتانولی *D.kotschyi* در دوزهای مختلف و * نشان‌دهنده تفاوت معناداری در مقایسه با گروه تزریق شده با کاراژنین است (P<۰/۰۰۱).**

بحث

در تحقیق حاضر، ابتدا ترکیب اصلی عصاره اتانولی *D.kotschyi* و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی کل عصاره مشخص شد. در ادامه، عصاره از نظر فعالیت ضد ادم و آنتی‌اکسیدانی *In Vivo* در مدل ادم پنجه ناشی از کاراژنین مورد بررسی قرار گرفت. برای استخراج، از اندام هوایی D.*kotschyi* استفاده شد. عصاره اتانولی *D.kotschyi* در مقایسه با اسیدگالیک از نظر ترکیبات فنلی غنی بود و در مقایسه با آنتی‌اکسیدان استاندارد در روش مهار رادیکال DPPH دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی متوسطی (IC_{50} برابر با ۱/۶۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بود. بر اساس طیف‌سنجی NMR، ترکیب فعال زیستی عمده در عصاره اتانولی *D.kotschyi*، لوتئولین-۷-O-گلوکوزید است که قبلاً در سایر گونه‌های جنس Dracocephalum مانند *D. moldavica* و *D.komarovii* جدا و شناسایی شده بود [۱۲-۱۶]. پس از مطالعه روی حیوان، عصاره اتانولی *D.kotschyi* در کاهش ادم ناشی از کاراژنین بسیار موثر بود. پیش تیمار با عصاره از ادم تا حد زیادی مانند ایندومتاسین در دوزهای ۱۲/۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم از ساعت اول تزریق کاراژنین در پنجه حیوان جلوگیری کرد. تزریق در این دوزها رشد ضخامت پنجه را تا ۵۰ درصد نسبت به گروه کنترل کاهش داد.

ترکیبات فنلی که دارای خواص ضدالتهابی و ضداکسیداتیو شناخته شده‌ای هستند، ممکن است نقش اساسی در فعالیت ضدادماتوز این عصاره داشته باشند [۱۷]. همچنین می‌توان آن را به خواص لوتئولین-۷-O-گلوکوزید موجود در عصاره نسبت داد. به عنوان مثال، لوتئولین-۷-O-گلوکزید از بیان واسطه‌های التهابی iNOS، COX-2، PGE2 جلوگیری می‌کند و پتانسیل اکسیداتیو را در غلظت کم (۲۰ میکرومولار) در ماکروفاژ موش تقویت می‌کند [۱۸]. بسیاری از مطالعات مکانیسم‌های ضدالتهابی مختلف لوتئولین را ثابت کردند، به طوری‌که به‌عنوان یک جاذب ROS عمل می‌کند، تولید ROS را مهار می‌کند و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله SOD و GPX را افزایش می‌دهد. علاوه بر این، تولید مسیرهای سیگنالینگ TNF-α و IL-6، NF-kB و AP-1 التهابی‌ترین مسیرهای مسدودشده توسط لوتئولین هستند [۱۹]. با کنار هم قراردادن این شواهد، قابل قبول است که عصاره دارای خواص ضد ادماتوز برجسته‌ای باشد.

در واقع، مطالعه ما نشان داد که دوزهای پایین (۱۲/۵ میلی‌گرم و ۲۵ میلی‌گرم) عصاره *D.kotschyi* با کاهش ادم پنجه در موش، باعث افزایش فعالیت ضد ادماتوز می‌شود. در حالی‌که دوز بالا (۵۰ میلی‌گرم) اثر مثبتی در کاهش ادم پنجه ندارد مگر در ساعت آخر. عصاره *D.kotschyi* نشان داد که پتانسیل آنتی‌اکسیدانی یعنی فعالیت SOD و GPX را در هموژن بافت ادماتوز پنجه تقویت می‌کند. تقویت این آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باعث کاهش سطح گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که توسط نوتروفیل‌های التهابی جذب‌شده در محل التهاب ایجاد می‌شوند. SOD و GPX نقش آنتی‌اکسیدانی اساسی در از بین‌بردن سوپراکسید و پراکسید هیدروژن دارند. SOD، آنیون‌های سوپراکسید را به پراکسید کم واکنش تبدیل می‌کند و GPX، هیدروژن پراکسید را به آب کاتالیز می‌کند [۲۰،۲۱]. اگرچه تاثیر ضدالتهابی عصاره اتیل استات *D.kotschyi* قبلا بر روی ماکروفاژهای فعال‌شده نشان داده شده بود [۲۲]، اما اینکه آیا عصاره *D.kotschyi* بر آزادسازی IL-1β و TNF-α در پنجه ملتهب موش‌ها تاثیر می‌گذارد سؤالی است که در آینده ارزش بررسی دارد. با توجه به سهم متابولیت‌های آراشیدونیک در التهاب ناشی از کاراژنین [۲۳]، فعالیت ضدالتهابی عصاره اتانولی *D.kotschyi* ممکن است به دلیل کاهش محصولات سیکلواکسیژناز و لیپواکسیژناز باشد که می‌تواند با اندازه‌گیری سطح PGE2 در پنجه ملتهب موش‌ها در آینده ارزیابی شود.

نتیجه‌گیری

نتایج حاضر نشان داد که عصاره اتانولی اندام‌های هوایی *D.kotschyi*، خواص ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجهی از خود نشان می‌دهد و بیانگر این است که عصاره دارای مقادیر زیادی ترکیبات ضدالتهابی موثر از جمله لوتئولین-۷-o-گلوکوزید است. مطالعات تکمیلی برای مشخص‌کردن مکانیسم‌های مولکولی دقیق و مشخصات ضدالتهابی این عصاره مورد نیاز است.

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-10-05]

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه با پشتیبانی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران با کد تایید اخلاق: IR.NKUMS.REC.1398.040 انجام شده است.

حامی مالی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران و تحت گرنت شماره ۹۷۰۲۶۴ انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در آماده‌سازی این مقاله مشارکت داشتند.

تعارض منافع

بنا بر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران، تشکر می‌کنند.

References

1. Heydari P, Yavari M, Adibi P, Asghari G, Ghanadian SM, Dida GO, et al. Medicinal properties and active constituents of Dracocephalum kotschyi and its significance in Iran: a systematic review. Evid Based Complement Alternat Med. 2019;**2019**. [DOI:10.1155/2019/9465309] [PMID: 31198431]
2. Henriques M, Silva P, Martins M, Flores C, Cunha FdQ, Assreuy-Filho J, et al.. Mouse paw edema. A new model for inflammation? Braz J Med Biol Res. 1987;**20**(2):243-249. [PMID: 3690058]
3. Salvemini D, Wang ZQ, Wyatt PS, Bourdon DM, Marino MH, Manning PT, et al. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. Br J Pharmacol. 1996;**118**(4):829-838. [DOI: 10.1111/j.1476-5381.1996.tb15475.x] [PMID: 8799551]
4. Liu X ZM, Wang J, Yang B, Jiang Y. Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (Phyllanthus emblica L.) from six region in China. J Food Compos. Anal. 2008;**21**:219–228. [DOI: 10.1016/j.jfca.2007.10.001]
5. Saha K, Lajis NH, Israf DA, Hamzah AS, Khozirah S, Khamis S, et al. Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plant. J Ethnopharmacol. 2004;**92**:263-267. [DOI: 10.1016/j.jep.2004.03.007] [PMID: 15138010]
6. Ferrero-Miliani L, Nielsen O, Andersen P, Girardin S. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1β generation. Clin Exp Immunol. 2007;**147**(2):227-235. [DOI: 10.1111/j.1365-2249.2006.03261.x] [PMID: 17223962]
7. Ronchetti S, Migliorati G, Bruscoli S, Riccardi C. Defining the role of glucocorticoids in inflammation. Clin Sci. 2018;**132**(14):1529-1543. [DOI: 10.1042/CS20171505] [PMID: 30065045]
8. Foroozandeh E, Asadi Gharooneh HA. Dracocephalum kotschyi Boiss.: An Iranian endemic medicinal plant; A review. J Med Herb. 2021;**12**(1):9-17. [DOI:10.30495/medherb.2021.679008]
9. Mohsenzadeh MS, Razavi BM, Imenshahidi M, Mohajeri SA, Rameshrad M, Hosseinzadeh H. Evaluation of green tea extract and epigallocatechin gallate effects on bisphenol A-induced vascular toxicity in isolated rat aorta and cytotoxicity in human umbilical vein endothelial cells. Phytother Res. 2021;**35**(2):996-1009. [DOI: 10.1002/ptr.6861] [PMID: 32893422]
10. Kamali H, Ahmadzadeh Sani T, Mohammadi A, Alesheikh P, Khodaverdi E, Hadizadeh F. A comparison between pressurized hot water and pressurized liquid extraction for optimizing phenolic and antioxidants capacity of the wooden layer between of walnut seed. J Supercrit Fluids. 2018;**133**:535-541. [DOI:10.1016/j.supflu.2017.10.017]
11. Boozari M, Mohammadi A, Asili J, Emami SA, Tayarani-Najaran Z. Growth inhibition and apoptosis induction by Scutellaria pinnatifida A. Ham. on HL-60 and K562 leukemic cell lines. Environ Toxicol Pharmacol. 2015;**39**(1):307-312. [DOI: 10.1016/j.etap.2014.12.002] [PMID: 25546119]
12. Toshmatov ZO, Eshbakova KA, Aisa HA. Glycoside flavonoids from dracocephalum komarovii. Chem Nat Compd. 2018;**54**(2):358-359. [DOI:10.1007/s10600-018-2345-8]
13. Martínez-Vázquez M, Estrada-Reyes R, Martínez-Laurrabaquio A, López-Rubalcava C, Heinze G. Neuropharmacological study of Dracocephalum moldavica L. (Lamiaceae) in mice: sedative effect and chemical analysis of an aqueous extract. J Ethnopharmacol. 2012;**141**(3):908-917. [DOI: 10.1016/j.jep.2012.03.028] [PMID: 22469767]
14. Rameshrad M, Salehian R, Fathiazad F, Hamedeyazdan S, Garjani M, Maleki-Dizaji N, et al. The effects of Ocimum basilicum ethanol extract on carrageenan-induced paw inflammation in rats. Pharm Sci. 2015;**20**(4):149-156. [Link]
15. Hooijmans CR, Rovers MM, De Vries RB, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Langendam MW. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. BMC Med Res Methodol. 2014;**14**:43. [DOI:10.1186/1471-2288-14-43] [PMID: 24667063]
16. Dastmalchi K, Damien Dorman HJ, Koşar M, Hiltunen R. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water-soluble Moldavian balm (Dracocephalum moldavica L.) extract. LWT - Food Sci Technol. 2007;**40**(2):239-248. [DOI:10.1016/j.lwt.2005.09.019]
17. Sadraei H, Ghanadian M, Asghari G, Sekhavati N. Antispasmodic activity of apigenin and luteolin, two components of Dracocephalum kotschyi extract, on rat ileum contractions. J Herbmed Pharmacol. 2018;7(2):100-105. [DOI:10.15171/jhp.2018.17]
18. Hu C, Kitts DD. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264. 7 cells. Mol Cell Biochem. 2004;**265**(1):107-113. [DOI: 10.1023/b:mcbi.0000044364.73144.fe]
19. Aziz N, Kim M-Y, Cho JY. Anti-inflammatory effects of luteolin: A review of in vitro, in vivo, and in silico studies. J Ethnopharmacol. 2018;**225**:342-358. [DOI: 10.1016/j.jep.2018.05.019] [PMID: 29801717]
20. Hayyan M, Hashim MA and AlNashef IM. Superoxide ion: generation and chemical implications. Chem Rev. 2016;**116**(5):3029-3085. [DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00407] [PMID:26875845]
21. Muthukumar K, Rajakumar S, Sarkar MN and Nachiappan V. Glutathione peroxidase3 of Saccharomyces cerevisiae protects phospholipids during cadmium-induced oxidative stress. Antonie Van Leeuwenhoek. 2011;**99**(4):761-771. [DOI:10.1007/s10482-011-9550-9] [PMID: 21229313]
22. Kalantar K, Gholijani N, Mousaei N, Yazdani M, Amirghofran Z. Investigation of dracocephalum kotschyi plant extract on the effective inflammatory transcription factors and

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-10-05]

mediators in activated macrophages. Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem. 2018;**17**(1):39-49. [DOI:10.2174/1871523017666180608081656][PMID: 2987989]

23. Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J Food Drug Anal. 2002;**10**(3):178-182. [DOI:10.38212/2224-6614.2748]

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-10-05]