



Investigation of the protective effect of hydroalcoholic extract of *Satureja khuzestanica* on PC12 cells and its phytochemical properties using two extraction methods

Roya Moghimi^{1*}, Hasan Rafati², Atousa Aliahmadi³, Akram Taleghani⁴

¹ Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Mazandaran, Babolsar, Iran,

Email: r.moghimi@umz.ac.ir

² Department of Phytochemistry & Chemical Engineering, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

³ Department of Biology, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

⁴ Department of Chemistry, Faculty of Science, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran

Article type:

Research article

Abstract

In recent years, there has been increasing interest in using medicinal plants to treat various diseases. Alzheimer's disease poses a significant health challenge in the modern era. *Satureja khuzestanica*, a plant endemic to Iran, is known for its numerous medicinal properties. This study prepared hydroalcoholic extracts of *S. khuzestanica* using two different extraction methods: maceration and sonication. We evaluated the total phenolic and flavonoid contents, as well as the antioxidant activity using the DPPH assay. Furthermore, we investigated the cytotoxic and neuroprotective effects of the extracts on PC₁₂ neuronal cells to assess their potential for Alzheimer's disease treatment. The sonication extraction method yielded the highest total phenolic content, measuring 705.8 ± 28.8 mg GA/g extract. The flavonoid content was also greater in the sonication extract compared to the maceration extract. Additionally, the sonication extract exhibited remarkable antioxidant activity, with an IC₅₀ value of 2.6 ± 0.0 µg/mL (for comparison, the IC₅₀ value for the BHT standard was 13.7 ± 0.3 µg/mL). Results from the cytotoxicity assay indicated that the hydroalcoholic extract did not demonstrate cytotoxic effects on PC₁₂ cells. Moreover, at a concentration of 25 µg/mL, the extract protected the neuronal cells against oxidative stress. These findings provide new insights into the potential application of medicinal plants, such as *S. khuzestanica*, in treating Alzheimer's disease. The hydroalcoholic extract obtained via the sonication method displayed superior phytochemical characteristics and more potent neuroprotective properties compared to the maceration extract. Future studies evaluating the efficacy of these extracts in animal or human models of Alzheimer's disease would be valuable.

Article history

Received: 2024/11/29

Revised: 2025/03/05

Accepted: 2025/03/06

Keywords

Satureja khuzestanica

Total phenolic content

Flavonoid content

Antioxidant activity

Neuronal cells

Alzheimer's disease

Cite this article as: Moghimi, R., Rafati, H., Aliahmadi, A., Taleghani, A. (2025). Investigation of the protective effect of hydroalcoholic extract of *Satureja khuzestanica* on PC12 cells and its phytochemical properties using two extraction methods. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*, 12(4): 101-115.



©The author(s)

Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch

Doi: <https://doi.org/10.71847/ejmp.2025.1191905>

بررسی اثر محافظتی عصاره هیدروالکلی مرزه خوزستانی بر سلول‌های عصبی PC12 و ویژگی‌های فیتوشیمیایی آن با دو روش عصاره‌گیری

رویا مقیمی^{۱*}، حسن رفعتی^۲، آتوسا علی احمدی^۳، اکرم طالقانی^۴

^۱ گروه شیمی آلی، دانشکده شیمی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران، رایانامه: r.moghimi@umz.ac.ir

^۲ گروه فیتوشیمی و مهندسی شیمی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

^۳ گروه بیولوژی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

^۴ گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد، ایران

نوع مقاله:	چکیده
مقاله پژوهشی	در سال‌های اخیر توجه روز افزونی به استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌های مختلف وجود دارد. یکی از بیماری‌های قرن اخیر آلزایمر است. گیاه مرزه خوزستانی با نام علمی <i>Satureja khusiztanica</i> گیاهی اندمیک با خواصی بیشمار است. در این مطالعه عصاره هیدروالکلی گیاه مرزه خوزستانی به دو روش مختلف خیساندن و سونیک کردن تهیه شد. محتوای کل فنول و فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH ارزیابی شد. همچنین به منظور بررسی اثر بخشی عصاره در درمان بیماری آلزایمر، اثر سمیت و محافظتی عصاره در برابر سلول‌های عصبی PC12 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین میزان محتوای کل فنولی برابر با $705/8 \pm 28/8$ (میلی-گرم معادل گالیک اسید / گرم عصاره) و مربوط به روش عصاره‌گیری سونیک کردن است. همچنین در این روش عصاره‌گیری میزان محتوای فلاونوئیدی کل نیز بیشتر از روش خیساندن است. عصاره حاصل از روش سونیک کردن قدرت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی نیز داشت به گونه‌ای که این عصاره دارای IC ₅₀ برابر با $2/6 \pm 0/1$ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (میزان IC ₅₀ برای استاندارد BHT برابر با $13/7 \pm 0/3$ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد). در نهایت نتایج حاصل از بررسی سمیت سلولی نشان داد که عصاره هیدروالکلی سمیتی در برابر سلول‌های عصبی ایجاد نمی‌کند و در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر قادر به حفاظت از سلول‌های عصبی در برابر استرس اکسیداتیو است. نتایج حاصل از این مطالعه دریچه‌ای تازه در زمینه کاربرد گیاهان دارویی در درمان بیماری آلزایمر ایجاد می‌کند. لذا می‌توان در آینده اثر بخشی این عصاره‌ها بر مدل‌های حیوانی و یا انسانی را مورد بررسی قرار داد.
واژه‌های کلیدی:	
فنل کل	
فلاونوئید	
فعالیت آنتی‌اکسیدانی	
سلول‌های عصبی	
آلزایمر	

استناد: مقیمی، رویا؛ رفعتی، حسن؛ علی احمدی، آتوسا؛ طالقانی، اکرم. (۱۴۰۳). بررسی اثر محافظتی عصاره هیدروالکلی مرزه خوزستانی بر سلول‌های عصبی PC12 و ویژگی‌های فیتوشیمیایی آن با دو روش عصاره‌گیری. فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، ۱۲(۴)، ۱۰۱-۱۱۵.

Doi: <https://doi.org/10.71847/ejmp.2025.1191905>

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان

© نویسندگان.



مقدمه

خانواده نعنائیان شامل بیش از ۲۳۰ جنس و ۷۰۰۰ گونه مختلف است. در میان جنس‌های مختلف این خانواده، مرزه یکی از جنس‌های مهم با بیش از ۲۰۰ گونه است. اغلب گیاهان این جنس معطر هستند و در مناطق مدیترانه، آسیا و قسمت‌هایی از آمریکا پراکنده شده‌اند (Jafari et al., 2016). تا کنون ۱۶ گونه در ایران گزارش شده که از این بین ۹ گونه اندمیک و انحصاری ایران است (Malmir et al., 2014). گیاه مرزه خوزستانی با نام علمی *Satureja khusiztanica* بومی مناطق گرم و معتدل زاگرس می باشد که در سال ۱۹۹۴ توسط آقای دکتر مظفریان در منطقه ماژین پاعلم پل دختر لرستان جمع آوری و همان زمان توسط خانم دکتر زیبا جم زاد نام گذاری شد (Jamzad, 1994). مرزه گیاه چند ساله ای است که بومی مدیترانه شرقی و جنوب غربی آسیاست. برگ‌های آن نرم و متقابل و تقریباً بدون دمبرگ و باریک و نوک تیز و پوشیده از کرک و دارای تارهای غده‌ای فراوان اسانس دار است فرآوری اسانس مرزه از تقطیر با بخار آب از برگ‌ها و سرشاخه‌های برگدار حاصل می‌شود (Safarnavadeh & Rastegarpanah, 2011). این اسانس مایعی بی‌رنگ و یا مایل به زرد و دارای عطر و بوی تند و زننده‌ای و با مزه‌ای که طعم فلفل را به یاد می‌آورد، می‌باشد. این گیاه در ایران جزو سبزی‌های خوراکی است و به صورت خام و پخته در غذاها مصرف می‌شود دارای خاصیت بادشکن و همچنین دافع کرم می باشد. به صورت دم کردنی در رفع گرفتگی معده و روده مؤثر می باشد. گیاه مرزه خوزستانی به عنوان درد نشان و ضد عفونی کننده در بین مردم جنوب ایران استفاده می‌شود (Roosta et al., 2024). همچنین برای تسکین دندان درد، تقویت لثه دندان و بهبود زخم در مناطق جنوبی ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد. خاصیت ضد التهابی گیاه مرزه

خوزستانی به اثبات رسیده است و در طب سنتی نیز از این گیاه برای بهبود زخم و تسکین درد استفاده می‌شود. همچنین مطالعات فراوانی خاصیت ضد میکروبی این گیاه را به اثبات رسانده است (Amanlou et al., 2004; Yousefzadi et al., 2014). فنول‌ها از متابولیت‌های ثانویه مهم در گیاهان محسوب می‌شوند. فنول‌ها شامل گروه بزرگی از ترکیبات فعال بیولوژیکی (بیش از ۸۰۰۰ ترکیب) می‌شوند که از ملکول‌های ساده تا ساختارهای پلیمری با جرم ملکولی بالا را در برمی‌گیرند. فلاونوئیدها دسته مهمی از ترکیبات فنولی هستند که در قرن اخیر توجه زیادی به آن‌ها شده است. داده‌های زیادی مبنی بر این قضیه وجود دارد که لازمه ی پایداری اکسیداتیو و خواص ضد میکروبی غذاها وجود ترکیبات فنولی در آن‌هاست.

التهاب‌های طولانی مدت به عنوان التهاب مزمن شناخته می‌شود که طی آن ماهیت سلول‌ها تغییر کرده و موجب تخریب بیشتر بافت‌ها می‌شود. مغز از طریق پیام‌های عصبی و هورمونی به محرک‌های التهاب پاسخ می‌دهد و این پاسخ‌های مغز، منشأ بسیاری از بیماری‌های حاد و مزمن سیستم اعصاب مرکزی است (Kadatane et al., 2023). از بیماری‌های التهاب حاد سیستم اعصاب مرکزی می‌توان سکته مغزی را نام برد و از بیماری‌های التهاب مزمن سیستم اعصاب مرکزی می‌توان به سرخک، ایدز، مننژیت، ام اس و آلزایمر اشاره کرد. آلزایمر رایج‌ترین شکل زوال عقل است. علائم این بیماری با از دست دادن قدرت حفظ اطلاعات به خصوص حافظه موقت در دوران پیری آغاز شده و به تدریج با از دست دادن قدرت تشخیص زمان، افسردگی، از دست دادن قدرت تکلم، گوشه‌گیری و سرانجام مرگ در اثر ناراحتی‌های تنفسی به پایان می‌رسد (Ozansoy et al., 2023). مرگ پس از پنج تا ده سال از بروز علائم اتفاق می‌افتد.

درمان‌های دارویی رایج نتایج جالبی در درمان بیماری آلزایمر نشان نداده‌اند، لذا طب مکمل و به خصوص داروهای گیاهی می‌تواند دریچه‌امیدی برای درمان بیماری آلزایمر محسوب گردد. یک رژیم غذایی غنی از ترکیبات ضد التهاب و آنتی‌اکسیدان و محافظ سیستم عصبی خطر ابتلا به آلزایمر را کاهش می‌دهد (Deng et al., 2023).

سلول‌های PC₁₂ جدا شده از فنوکروموسایتمای موش صحرایی در سال ۱۹۷۱ توسط Greene و Tischler جداسازی و به عنوان یک رده سلولی معرفی شدند (Greene and Tischler, 1976). به عنوان سلول‌های کاتکول آمین، سلول‌های عصبی PC₁₂ می‌توانند مقادیر قابل توجهی از کاتکول آمین‌ها نظیر نوراپی نفرین و دوپامین را سنتز، ذخیره یا آزاد کنند. علاوه بر این شواهدی وجود دارد مبنی بر اینکه گیرنده‌های استیل کولین در سلول‌ها عصبی PC₁₂ بیان می‌شوند. از طرفی در بیماری آلزایمر سطح استیل کولین در سلول‌های عصبی کاهش می‌یابد. به همین دلیل این رده سلولی، مدل بسیار مناسبی برای ارزیابی فعالیت ترکیبات فعال بیولوژیکی در زمینه بیماری‌های مرتبط با اعصاب و روان نظیر آلزایمر می‌باشد (Xie et al., 2023).

با توجه به موارد مورد اشاره، در این مطالعه از گیاه مرزه خوزستانی دو نوع عصاره هیدروالکلی به دو روش مختلف به دست آمد. در روش اول از خیساندن یا ماسراسیون برای عصاره‌گیری استفاده شد. این روش جزو روش‌های سنتی عصاره‌گیری محسوب می‌گردد. در روش دوم از امواج مافوق صوت برای استخراج ترکیبات فعال موجود در گیاه مرزه خوزستانی استفاده شد. سپس دو عصاره حاصل از نظر محتوای فنلی کل، محتوای فلاونوئیدی کل و فعالیت آنتی اکسیدانی مورد بررسی قرار گرفتند. این

دو عصاره از نظر فعالیت محافظتی بر روی رده سلولی عصبی PC₁₂ نیز مقایسه شدند.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی DPPH، گالیک اسید، کوئرستین و DMSO از شرکت Merck آلمان، تریپسین و FBS از شرکت Gibco آمریکا و MTT از شرکت سیگما خریداری شدند.

منابع گیاهی مورد استفاده: گیاه مرزه خوزستانی از مزرعه گیاهان دارویی شرکت دارو سازی خرمان، خرم آباد لرستان با مشخصات جغرافیایی 33°24'28.9"N 48°17'53.6"E جمع‌آوری شد و توسط بخش گیاه‌شناسی پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی توسط دکتر محمدرضا کنعانی مورد تأیید قرار گرفت (کد هرباریومی ۱۵۸۲:MPH).

تهیه عصاره گیاهی: بدین منظور ابتدا گیاه مرزه خوزستانی در دمای اتاق و به دور از نور خورشید، خشک گردید. سپس با استفاده از دستگاه آسیاب، گیاه خرد و آماده عصاره‌گیری شد. عصاره‌گیری به دو روش انجام گرفت. برای روش خسیاندن از روش Hua-Bin و همکاران با کمی تغییرات استفاده شد (Li et al., 2007). بدین منظور، به ۵۰ گرم از گیاه خرد شده مرزه خوزستانی، ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال (آب و اتانول به نسبت ۵۰:۵۰) اضافه شد. گیاه به مدت یک هفته در حلال خیسانده شد و سپس عصاره حاصل به کمک کاغذ صافی صاف شد و سپس به منظور خشک کردن عصاره از دستگاه روتاری استفاده شد. برای روش سونیک کردن از روش کار Vinatoru با اندکی اصلاحات استفاده شد (Vinatoru et al., 1997). در این راستا ۵۰ گرم از گیاه خرد شده مرزه خوزستانی و ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال (آب و اتانول به نسبت ۵۰:۵۰) در یک بشر ریخته شدند و بشر به مدت ۲ ساعت تحت

امواج مافوق صوت قرار گرفت، سپس عصاره صاف و خشک شد.

اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولی: از روش Folin-Ciocalteu برای اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولی استفاده شد. برای تهیه محلول استاندارد از ماده گالیک اسید محلول‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (حل شده در اتانول ۹۶ درصد) تهیه گردید (Tohma et al., 2019). در هر یک از خانه‌های پلیت ۹۶ تایی به ترتیب ۱۹۵/۵ میکرو لیتر آب دو بار تقطیر، ۲/۵ میکرو لیتر از محلول عصاره (محلول ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر حل شده در دی متیل سولفوکسید) و ۱۲/۴ میکرو لیتر معرف فولین اضافه گردید و بعد از گذشت ۳ دقیقه ۳۷/۲ میکرو لیتر از محلول ۷٪ کربنات سدیم اضافه شد. برای هر نمونه آزمایش ۳ بار تکرار شد. در نهایت پلیت ۹۶ تایی به مدت ۲ ساعت در دستگاه شیکر انکوباتور قرار گرفت و جذب در ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. با توجه به منحنی کالیبراسیون گالیک اسید، مقدار کل ترکیبات فنولی محاسبه گردید و بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم خشک عصاره گزارش شد. هر آزمایش سه بار تکرار شد.

اندازه‌گیری مقدار کل فلاونوئیدها: بدین منظور از روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید استفاده شد (Ali et al., 2024). در این روش جهت اندازه‌گیری مقدار کل فلاونوئیدهای موجود در گیاه، حجم‌های مساوی از محلول ۲ درصد متانولی آلومینیوم کلراید و محلول متانولی گیاه (۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مخلوط شدند. سپس جذب محلول بعد از ۱۰ دقیقه به هم خوردن در ۴۲۰ نانومتر خوانده شد. از فلاونوئید کوثرستین به عنوان استاندارد استفاده گردید و نتایج بر حسب میلی‌گرم اکوی والان کوثرستین به گرم خشک عصاره گزارش شد هر آزمایش سه بار تکرار شد.

تست اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانتی (DPPH)
فعالیت آنتی‌اکسیدانتی عصاره‌ها از طریق اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی (RSC) ۲،۲- دی فنیل -۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) مورد بررسی قرار گرفت (Khalil_Moghaddam et al., 2020). غلظت‌های مختلفی از عصاره‌ها (۸۰، ۲۰، ۴۰، ۱۰ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مورد روش خیساندن و غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ در مورد روش سونیک کردن) را به درون چاهک‌ها ریخته سپس ۱۶۸ میکرو لیتر متانول و ۶۲ میکرو لیتر از محلول ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر DPPH اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در تاریکی به هم خورد. علت تفاوت محدوده غلظت تست شده در دو روش مختلف عصاره‌گیری این است که ابتدا غلظت‌های مشابه در هر دو روش تست شد ولی مشخص شد باید برای روش سونیک کردن از غلظت‌های پایین تر برای رسم منحنی با دقت بالا استفاده کرد، در نتیجه محدوده غلظت برای عصاره حاصل از روش سونیک کردن کاهش یافت. سپس جذب محلول‌ها در ۵۱۷ نانومتر بعد از ۱ ساعت در مقابل شاهد (حاوی کلیه مواد به غیر از نمونه) اندازه‌گیری شد. درصد طبق معادله ۱ محاسبه گردید:

$$RSC(\%) = 100 \times \left(\frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \right) \quad (1)$$

در این فرمول A_{sample} به ترتیب میزان جذب شاهد و نمونه است. IC_{50} بیانگر غلظتی از نمونه است که موجب ۵۰٪ بازدارندگی در ظرفیت رادیکالی می‌شود و از طریق رسم مقادیر مختلف RSC در مقابل غلظت‌های مختلف نمونه به دست آمد. از BHT به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

ارزیابی اثر حفاظتی سلول‌ها به روش MTT: برای ارزیابی توان حیاتی سلول‌ها از روش رنگ سنجی (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) MTT استفاده گردید (Mirzababaeiy et al., 2018). سلول‌های PC₁₂

جدا شده از فئوکروموسایتومای موش صحرایی که در محیط کشت، ویژگی‌های سلول عصبی را بروز می‌دهد، در محیط کشت کامل در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد که حاوی پنج درصد گاز دی اکسید کربن بود، کشت داده شدند. سلول‌های کشت داده شده را از انکوباتور بیرون آورده، محیط کشت خارج شده و مقدار ۳ میلی‌لیتر محلول PBS استریل برای شستشوی سلول‌ها وارد فلاسک شد. سپس PBS از درون فلاسک خارج شد. ۲ میلی‌لیتر محلول تریپسین را با فشار روی سلول‌ها ریخته شد تا تمام سلول‌ها از کف فلاسک کنده شود. در ادامه روی سلول‌ها میلی لیتر ۳ محیط کشت ریخته (تقریباً دو برابر میزان تریپسین اضافه شده) تا اثر تریپسین خنثی شود و سپس کل محتویات فلاسک به یک لوله فالکون استریل منتقل شد. محیط رویی خارج شده و روی رسوب حاصل، ۲ میلی‌لیتر محیط کشت ریخته و کاملاً یکنواخت شد. در ادامه سلول‌ها شمارش شده و سوسپانسیون سلولی طوری رقیق گردید که در هر چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت با ۱۰٪ سرم (FBS) که حاوی ۱۰/۰۰۰ سلول است، ریخته شود. پس از کاشت، سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور نگه داشته شدند تا به کف پلیت بچسبند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت محیط کشت از چاهک‌ها خارج شده و به سلول‌ها غلظت‌های متفاوتی از عصاره (۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) را اثر داده تا هم میزان کشندگی عصاره به دست آید و هم با ایجاد استرس توسط هیدروژن پراکساید، اثر عصاره در مهار مرگ سلولی در اثر استرس، به دست آید. به این صورت که مقداری معین از عصاره‌ی مورد نظر، در محیط کشت ۱۰٪ سرم حل گردیده به طوری که در نهایت ۱۰۰ میکرو لیتر از آن به هر چاهک اضافه شود (به خانه‌های کنترل به جای عصاره، تنها ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت اضافه می‌شود). بعد از

۲۴ ساعت به پلیت‌هایی که برای بررسی سمیت سلول در نظر گرفته شده‌اند، ۱۰ میکرو لیتر محلول MTT، در هر چاهک اضافه شده و پلیت به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید تا زمان کافی برای فرایند تبدیل MTT به فرمازان توسط سلول‌های زنده فراهم شود. پس از این مدت پلیت را از انکوباتور خارج کرده، محیط روی سلول‌ها تخلیه شده و سپس برای حل شدن فرمازان تولید شده به هر خانه ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO اضافه گردید. در نهایت، جذب محلول فرمازان را توسط دستگاه الیزا ریدر و در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد. با استفاده از میزان جذب نمونه‌های تیمار شده و کنترل (حاوی سلول و محیط کشت)، درصد توان حیاتی سلول‌ها پس از تیمار با عصاره، با استفاده از معادله ۲ به دست می‌آید:

$$(۲) \quad \text{توان حیاتی} \% = \frac{\text{جذب نمونه}}{\text{جذب کنترل}} \times ۱۰۰$$

به سری دیگر از پلیت‌ها که برای بررسی اثر حفاظتی عصاره‌ها در نظر گرفته شده‌اند، ۸/۰۶ میکرو لیتر هیدروژن پراکساید ۱۵۰ میکرومولار به هر چاهک اضافه می‌شود که موجب ایجاد استرس و التهاب در سلول‌ها می‌شود. بعد از ۲۴ ساعت در هر چاهک ۱۰ میکرو لیتر محلول MTT اضافه شده و بقیه مراحل طبق مراحل فوق انجام شده و طبق فرمول بالا توان حیاتی سلول‌ها بدست آمد. هر آزمایش سه بار تکرار شد.

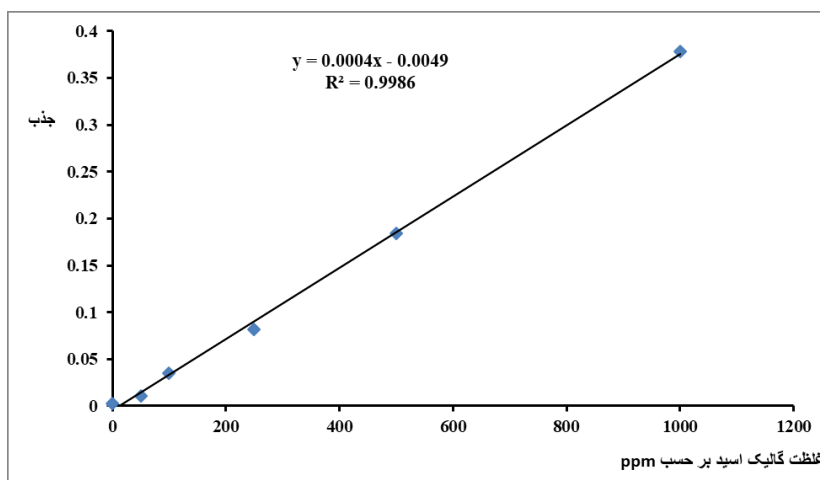
آنالیز آماری

طرح آماری مورد استفاده کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد و نتایج به صورت میانگین و انحراف استاندارد گزارش شدند. همچنین از نرم افزار SPSS، آنالیز واریانس یک طرفه آنوا (one-way ANOVA) برای آنالیز آماری داده‌ها استفاده شد و سطح معناداری برای هر کدام از داده‌ها تعریف شد.

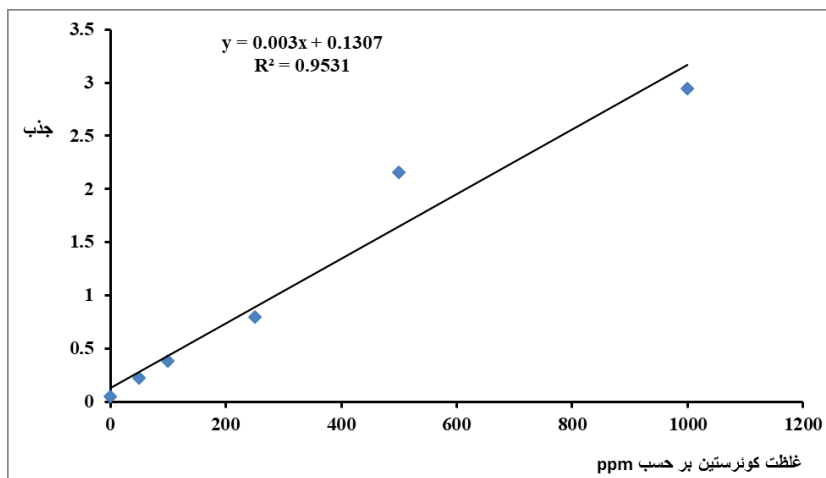
نتایج

محتوای فنول کل و فلاونوئید کل: در این مطالعه به دو روش مختلف امواج مافوق صوت و خیساندن عصاره‌گیری انجام شد و تست‌های فنول و فلاونوئید تام بر روی این دو عصاره انجام گرفت. منحنی کالیبراسیون گالیک اسید به همراه معادله خط برای محاسبه محتوای فنول تام در شکل ۱ و همچنین منحنی کالیبراسیون کوئرستین برای محاسبه محتوای قلاونوئیدی تام به همراه معادله خط در شکل ۲ نمایش داده شده است. نتایج حاصل در جدول ۱ نمایش داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌گردد، محتوای

فنولی و فلاونوئیدی عصاره هیدروالکلی مرزه خوزستانی در روش امواج مافوق صوت (سونیک کردن)، بالاتر است. میزان محتوای فنولی در روش خیساندن $398/5 \pm 26/5$ (میلی گرم معادل گالیک اسید / گرم عصاره) می‌باشد در حالیکه این میزان برای روش سونیک کردن $705/8 \pm 28/8$ (میلی گرم معادل گالیک اسید / گرم عصاره) است. همچنین میزان محتوای فلاونوئیدی عصاره هیدروالکلی مرزه خوزستانی در روش‌های خیساندن و سونیک کردن به ترتیب برابر با $33/35 \pm 2/5$ و $49/33 \pm 2/5$ (میلی گرم معادل کوئرستین / گرم عصاره) می‌باشد.



شکل ۱: منحنی کالیبراسیون گالیک اسید برای محاسبه محتوای فنولی تام

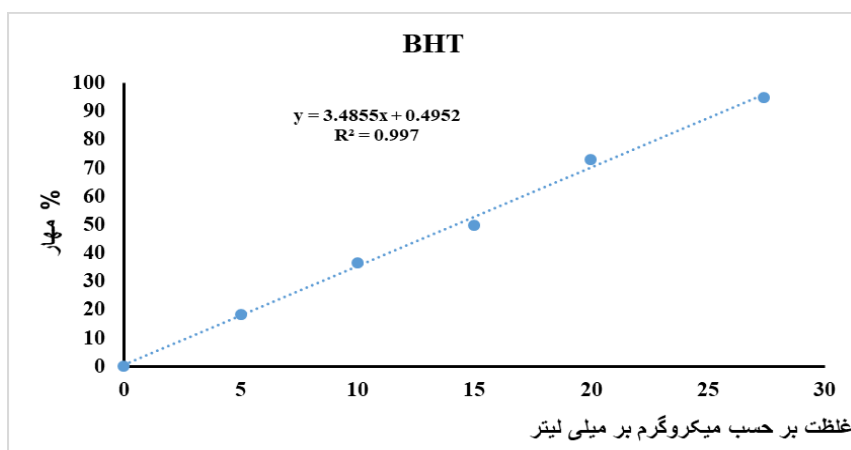


شکل ۲: منحنی کالیبراسیون کوئرستین برای محاسبه محتوای فلاونوئیدی تام

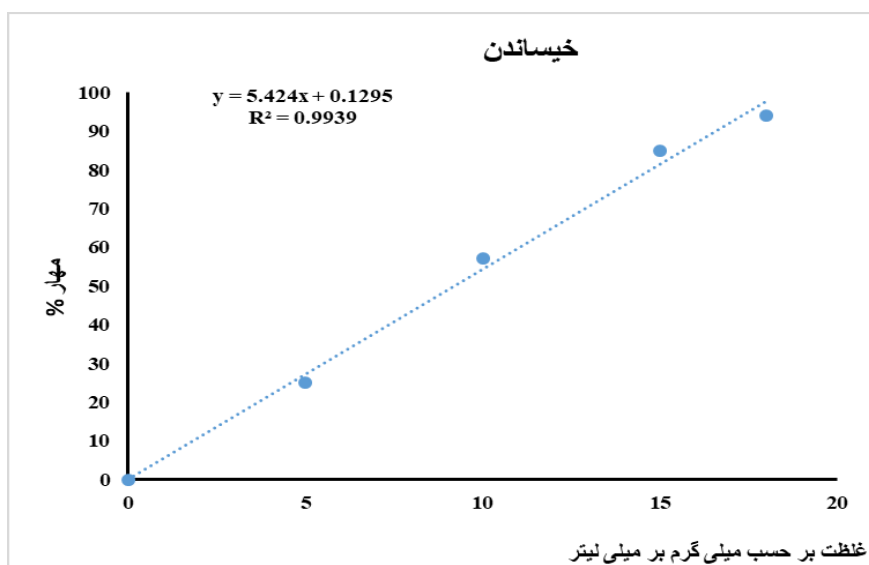
جدول ۱: محتوای فنول کل و فلاونوئیدی عصاره هیدروالکلی مرزه خوزستانی با دو روش مختلف عصاره‌گیری

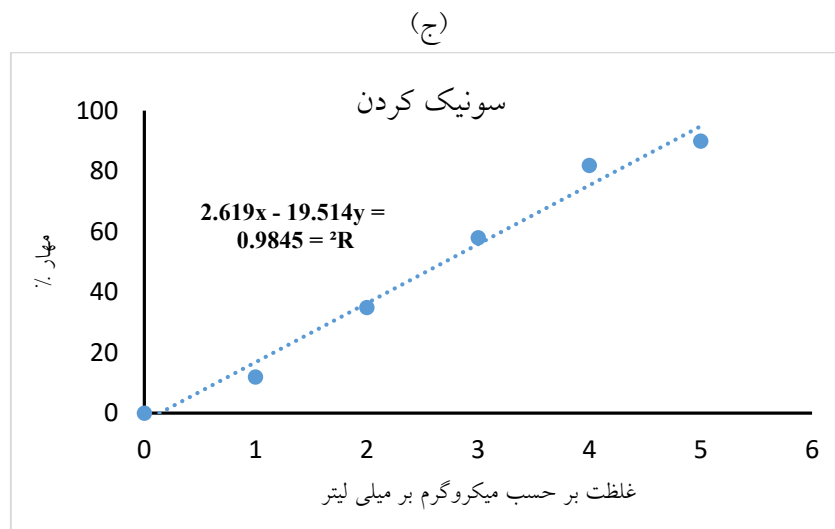
روش عصاره‌گیری	محتوای فنولی تام (میلی گرم معادل گالیک اسید / گرم عصاره)	محتوای فلاونوئیدی تام (میلی گرم معادل کوئرستین/گرم عصاره)
خیساندن	$398/5 \pm 26/5$	$33/35 \pm 3/6$
سونیک ۲ ساعت	$705/8 \pm 28/8$	$49/33 \pm 2/5$

(الف)



(ب)

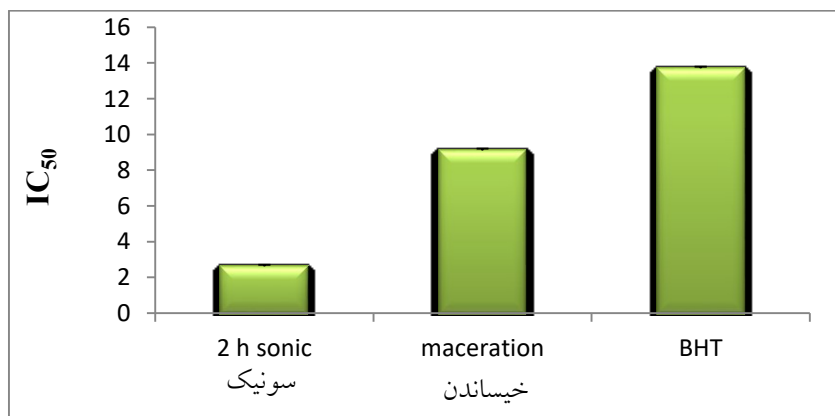




شکل ۳: منحنی‌های درصد مهار فعالیت آنتی اکسیدانی غلظت‌های مختلف از (الف) استاندارد BHT، (ب) عصاره حاصل از روش خیساندن و (ج) عصاره حاصل از روش سونیک کردن

اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل وجود دارد. نتایج تست آنتی اکسیدان نیز مانند نتایج محتوای فنولی و فلاونوئیدی، حاکی از این است که روش سونیک کردن نتایج بهتری از خیساندن دارد. میزان IC_{50} برای عصاره حاصل از روش خیساندن 9.0 ± 1.1 میکروگرم بر میلی لیتر بود در حالی که این عدد برای عصاره حاصل از روش سونیک کردن 2.6 ± 0.1 میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد. همچنین میزان IC_{50} برای استاندارد BHT برابر با 13.7 ± 0.3 میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد.

نتایج آزمون آنتی اکسیدانت (DPPH): این آزمون نیز بر روی عصاره‌های بدست آمده از دو روش خیساندن و سونیک کردن انجام شد. منحنی درصد مهار در برابر غلظت‌های مختلف برای استاندارد BHT، عصاره مرزه به روش سونیک کردن و روش خیساندن در شکل ۳ نمایش داده شده است، همچنین نتایج IC_{50} در شکل ۴ نمایش داده شده است. طبق نتایج حاصل از شکل ۴، عصاره‌های هیدروالکلی مرزه خوزستانی نسبت به کنترل یعنی BHT بسیار بهتر عمل کرده‌اند و در هر دو روش سونیک و خیساندن

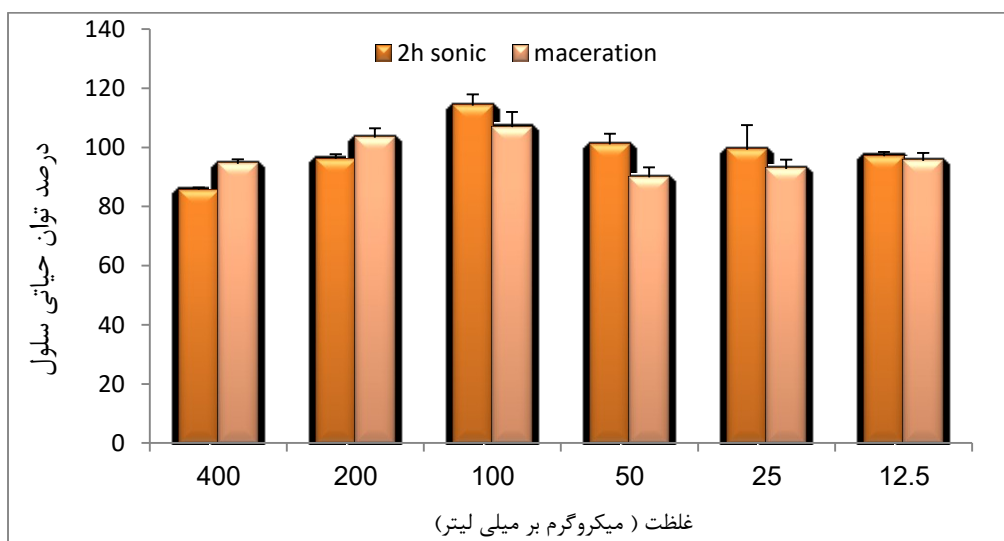


شکل ۴: نتایج آزمون آنتی اکسیدان به روش DPPH برای عصاره هیدروالکلی مرزه خوزستانی حاصل از دو روش مختلف عصاره‌گیری

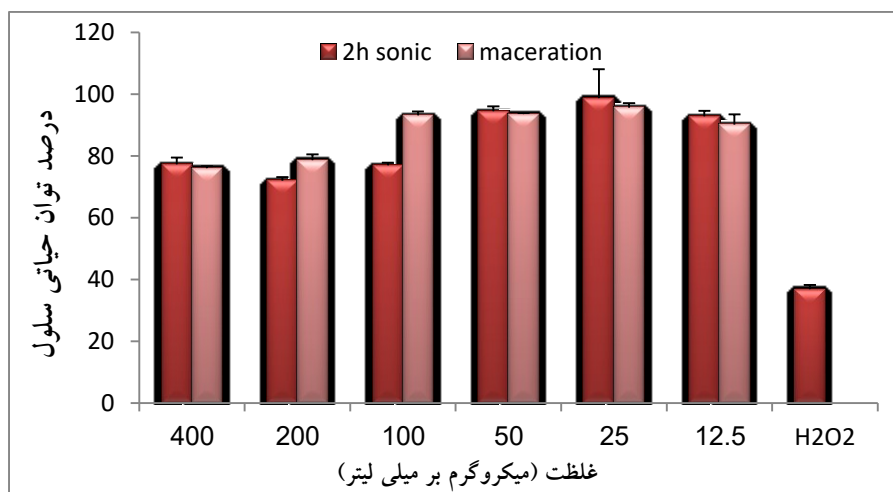
نتایج آزمون MTT: آزمون MTT بر روی دو عصاره که با دو روش سونیک و خیساندن به دست آمده بود انجام شد. ابتدا میزان سمیت این عصاره‌ها بر روی سلول‌های عصبی PC₁₂ اندازه‌گیری شد (شکل ۵). نتایج حاصل از درصد توان حیاتی سلول‌های عصبی در برابر مقادیر متفاوت از عصاره‌های هیدروالکلی مرزه خوزستانی نشان داد که عصاره این گیاه سمیت سلولی ندارد و حتی در برخی غلظت‌ها می‌تواند به رشد بهتر سلول‌های عصبی کمک کند. به عنوان مثال ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره حاصل از روش سونیک کردن درصد توان حیاتی سلول را به ۱۱۴/۰۸٪ افزایش داده است.

در ادامه، میزان اثر حفاظتی عصاره‌ها بر روی سلول‌های عصبی PC₁₂ مورد بررسی قرار گرفت

(شکل ۶). بدین منظور به کمک هیدروژن پراکساید به سلول‌ها استرس وارد شد و نقش عصاره‌های گیاه مرزه خوزستانی در برابر حفاظت از سلول‌های عصبی سنجیده شد. در روش سونیک کردن در تمامی غلظت‌ها اختلاف معناداری با هیدروژن پراکساید وجود دارد ($P < 0/0001$). در روش خیساندن نیز تمامی غلظت‌ها اختلاف معناداری با گروه کنترل هیدروژن پراکساید داشتند. در این تست نیز روش سونیک نتایج بهتری نسبت به خیساندن داشت. میزان توان حیاتی سلول تحت شرایط استرس اکسیداتیو هیدروژن پراکساید $36/91 \pm 1/3$ ٪ بود در حالیکه در اثر حفاظت سلول‌ها به کمک عصاره هیدروالکلی مرزه خوزستانی این میزان به ترتیب به $98/8 \pm 1/3$ و $95/7 \pm 1/4$ ٪ در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره در روش‌های سونیک کردن و خیساندن رسید.



شکل ۵: نتایج حاصل از بررسی سمیت عصاره‌های هیدروالکلی مرزه خوزستانی بر سلول‌های عصبی PC₁₂



شکل ۶: نتایج حاصل از بررسی اثر حفاظتی عصاره‌های هیدروالکلی مرزه خوزستانی بر سلول‌های عصبی PC_{۱۲}

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که روش سونیک کردن بسیار کاراتر از روش سنتی خیساندن عمل کرده است و محتوای ترکیبات فولی تام، فلاونوئیدی تام و فعالیت آنتی اکسیدانی در روش سونیک کردن به طور قابل توجهی بالاتر از روش خیساندن است. دلیل عملکرد بهتر روش یونیک کردن می‌تواند به این دلیل باشد که در این روش، امواج مافوق صوت با قدرت فراوان به دیواره سلولی برخورد می‌کند و موجب تخریب دیواره سلولی می‌شود. این امر به خروج بهتر متابولیت‌های ثانویه از گیاه کمک می‌کند. امواج مافوق صوت انتقال جرم از درون سلول به بیرون را افزایش می‌دهد و موجب دسترسی بهتر حلال به محتوای درون سلول گیاهی می‌شود (Jacques et al., 2007). همچنین مطالعات پیشین نشان داده است که روش سونیک کردن به استخراج بهتر ترکیبات فعال فنولی گیاه کمک می‌کند. در ضمن مقایسه رو روش خیساندن و سونیک کردن نشان می‌دهد که روش خیساندن زمان‌برتر است و در برابر آن روش سونیک کردن سریع‌تر و مؤثرتر است (Irfan et al., 2022). عواملی مانند نوع حلال و نسبت پودر گیاه به حلال در بازدهی هر دو روش مؤثر هستند و عواملی مانند قدرت

دستگاه، مدت زمان اعمال امواج، ضخامت پراب و حجم کلی استخراج در بازده و همچنین عملکرد روش سونیک کردن تأثیرگذار هستند (Mousavi et al., 2022).

گیاه مرزه خوزستانی یک گیاه دارویی باارزش اندمیک کشور ایران است و دارای خواص بیشماری است. مطالعات فراوانی در زمینه بررسی فیتوشیمیایی و بیولوژیکی عصاره و اسانس گیاه مرزه خوزستانی وجود دارد. به عنوان مثال در یک مطالعه محتوای فنولی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس و عصاره اتانولی و آبی مرزه خوزستانی مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج حاصل، عصاره اتانولی بالاترین محتوای فلاونوئیدی را داشت و اسانس آن بیشترین میزان محتوای فنولی را از خود نشان داد. بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی حاکی از این بود که عصاره اتانولی با ۰.۵ IC برابر با ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر بهترین فعالیت آنتی اکسیدانی را نسبت به استاندارد BHT با ۰.۵ IC برابر با ۱۸ میکروگرم بر میلی لیتر نشان داده است (Mahboubi & Kazempour, 2017). مقایسه نتایج این مطالعه با پژوهش حال حاضر نشان می‌دهد که میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره هیدروالکلی مرزه خوزستانی فعالیت آنتی اکسیدانی

ترکیبات فنولی گیاه مرزه خوزستانی با مؤثر بودن آن در برابر استرس اکسیداتیو ارتباط معناداری دارد (Kruk et al., 2022).

تأثیر عصاره گیاه مرزه خوزستانی بر رده‌های سلولی مختلف ارزیابی شده است. در نزدیکترین مطالعه به پژوهش حال حاضر، عصاره اتانولی گیاه مرزه خوزستانی به روش خیساندن بدست آمد و نقش عصاره در مهار بیماری دیابت مورد بررسی قرار گرفت. برای ارزیابی فعالیت ضد دیابتی در روش کشت سلولی از سلول‌های عصبی PC_{۱۲} که تحت تنش قند بسیار بالا با گلوکوز قرار گرفته بودند استفاده شد. غلظت‌های ۲۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره توانست از آسیب ایجاد شده توسط غلظت‌های بالای گلوکوز محافظت ایجاد کند. مقایسه مطالعه حال حاضر با مطالعه پیشین تفاوت‌های زیادی را در این دو پژوهش نشان می‌دهد. از جمله اینکه در مطالعه حاضر عصاره هیدروالکی از گیاه مرزه خوزستانی تهیه شده است و نه اتانولی، از طرفی از دو روش مختلف عصاره‌گیری استفاده شده است. مهم‌تر آنکه بیماری هدف در مطالعه حال حاضر درمان بیمای آلزایمر و در مطالعه پیشین بیماری دیابت است. اگرچه هر دو مطالعه به خوبی به نقش محافظتی عصاره مرزه خوزستانی اذعان دارند (Kaeidi et al., 2013). در مطالعات مبتنی بر کاربرد عصاره گیاه مرزه خوزستانی می‌توان به مطالعاتی اشاره کرد که اثرات ضد سرطان این عصاره را بررسی کردند. از جمله اینکه در یک مطالعه مشخص شد که عصاره متانولی مرزه خوزستانی دارای سمیت سلولی بر علیه رده سلولی MCF-7 است (Khojasteh et al., 2019). یک مقاله مروری در سال ۲۰۱۹ به جمع‌بندی خواص بیولوژیکی گیاهان جنس مرزه پرداخته است و به این موضوع اشاره داشته است که جنس مرزه حاوی گونه‌های زیادی است که دارای خواص آنتی اکسیدانی بالا

بسیار بالاتری از خود نشان داده است. به ویژه در روش سونیک کردن میزان IC برابر با 0.1 ± 0.26 میکروگرم بر میلی لیتر بود که این عدد بسیار کمتر از اعداد مطالعه پیشین است. همچنین در مطالعه دیگری فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی به روش FRAP مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که این عدد برای عصاره برابر با 12.99 میلی مول آهن دوبار مثبت بر لیتر می‌باشد (Alrekaby et al., 2023). در یک پژوهش فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس گیاه مرزه خوزستانی در دو مرحله قبل از گلدهی و بعد از گلدهی به دو روش DPPH و FRAP مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که اسانس مرزه خوزستانی دارای فعالیت مهاري بالاتری قبل از گلدهی است (Alizadeh, 2015).

مطالعه حاضر حاکی از این است که عصاره هیدروالکی مرزه خوزستانی اثر محافظتی بالایی در برابر استرس اکسیداتیو اعمال شده بر سلول‌های عصبی ایجاد می‌کند. دلیل این اثربخشی می‌تواند به ترکیبات موجود در عصاره این گیاه باشد. در سال ۲۰۲۲، ترکیبات مؤثره موجود در عصاره متانولی گیاه مرزه خوزستانی شناسایی شد و مشخص شد که عصاره این گیاه غنی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی نظیر روتین، رزمارینیک اسید، کافئیک اسید، سچورجین و لینارین است (Davoodi et al., 2022). از طرفی مطالعه حاضر نیز نشان داد که محتوای فنولی و فلاونوئیدی تام عصاره هیدروالکی گیاه مرزه خوزستانی بسیار بالا است و این گیاه غنی از ترکیبات پلی فنول است. لذا می‌توان ارتباط معناداری بین محتوای ترکیبات فنولی و مقابله با استرس اکسیداتیو مشاهده کرد. در یک مطالعه به اثر محافظتی فلاونوئیدها بر سلول‌های عصبی PC_{۱۲} در برابر استرس اکسیداتیو اشاره شده است (Pavlica & Gebhardt, 2010). به‌طور کلی اثر آنتی اکسیدانی بالای

هستند. و این ویژگی باعث شده است که این جنس در درمان بیماری آلزایمر نیز مؤثر واقع شود (Hamidpour et al., 2019). لذا با توجه به تحقیقات پیشین در زمینه خواص گیاه مرزه خوزستانی و نتایج مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که عصاره هیدروالکلی حاصل از روش سونیک کردن با توجه به فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجه و داشتن اثر حفاظتی مناسب بر سلول‌های عصبی قابلیت استفاده در درمان بیماری آلزایمر را دارد. اگرچه نیاز به مطالعات بیشتری در این زمینه برای تأیید این مطلب وجود دارد.

نتیجه‌گیری نهایی

گیاه مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica*) به عنوان یک گیاه اندمیک ایران، دارای پتانسیل بالایی در زمینه‌های دارویی و درمانی است. این مطالعه با هدف بررسی روش‌های مختلف عصاره‌گیری (خیساندن و سونیک کردن) و ارزیابی محتوای فنولی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های هیدروالکلی این گیاه انجام شد. همچنین، اثرات محافظتی عصاره‌ها بر روی سلول‌های عصبی ۱۲ PC در شرایط استرس اکسیداتیو مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که

روش سونیک کردن به دلیل استفاده از امواج مافوق صوت، بازدهی بالاتری در استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی دارد. عصاره حاصل از این روش دارای محتوای فنولی و فلاونوئیدی به مراتب بیشتر و فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری نسبت به روش خیساندن بود. علاوه بر این، عصاره هیدروالکلی مرزه خوزستانی سمیت سلولی قابل توجهی بر روی سلول‌های عصبی ۱۲ PC نشان نداد و حتی در غلظت‌های مشخصی توانست از سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو محافظت کند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که عصاره مرزه خوزستانی، به‌ویژه عصاره حاصل از روش سونیک کردن، می‌تواند به عنوان یک ترکیب طبیعی با پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و محافظت‌کننده عصبی در درمان بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو، از جمله آلزایمر، مورد توجه قرار گیرد. با توجه به نتایج این مطالعه، پیشنهاد می‌شود در آینده تحقیقات بیشتری بر روی مدل‌های حیوانی و انسانی برای تأیید اثربخشی عصاره مرزه خوزستانی در درمان بیماری‌های عصبی مانند آلزایمر انجام شود. همچنین، بررسی مکانیسم‌های دقیق اثر این عصاره بر سلول‌های عصبی و ترکیبات فعال موجود در آن می‌تواند زمینه‌ساز توسعه داروهای طبیعی با پایه گیاهی باشد.

References

- Ali, Q., Kurubas, M. S., Mujtaba, M., Nazari, A. W., Dogan, A., Kaya, M., Oner, E. T., Yilmaz, B. A., & Erkan, M. (2024). Shelf life of cocktail tomato extended with chitosan, chia mucilage and levan. *Scientia Horticulturae*, 323(September 2023), 112500. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112500>
- Alizadeh, A. (2015). Essential oil composition, phenolic content, antioxidant, and antimicrobial activity of cultivated *Satureja rechingeri* Jamzad at different phenological stages. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 70(3-4), 51-58. <https://doi.org/10.1515/znc-2014-4121>
- Alrekaby, F. F. M., Alkhatib, A. J., Abubakar, H., & Shokri, S. (2023). Evaluation of phytochemical properties and antioxidant activity of methanol extract of *Ziziphus spina-christi*, *Satureja khuzistanica*, and *Salvia Rosmarinus* using FT-IR method. *Journal of Biochemicals and Phytomedicine*, 2(2), 47-53.
- Amanlou, M., Fazeli, M. R., Arvin, A., Amin, H. G., & Farsam, H. (2004). Antimicrobial activity of crude methanolic extract of *Satureja khuzistanica*. *Fitoterapia*, 75(7), 768-770.
- Davoodi, M., Nejad-Ebrahimi, S., Rustaiyan, A., & Esmaeili, D. (2022). The chemical composition and antibacterial activity of a methanolic extract of *Satureja khuzistanica*.

- Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58, e19233.
- Deng, M., Yan, W., Gu, Z., Li, Y., Chen, L., & He, B. (2023). Anti-neuroinflammatory potential of natural products in the treatment of Alzheimer's disease. *Molecules*, 28(3), 1486.
- Greene, L. A., & Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(7), 2424–2428.
- Hamidpour, R., Hamidpour, S., & Doostmohamadi, P. (2019). Chemistry, Pharmacology and Medicinal Property of Savory (*Satureja L.*) to Prevent and Cure Illnesses such as Diabetes, Cardiovascular Disease, Alzheimer's Disease, and Cancer. *Cancer Sci Res*, 2(1), 1–5.
- Irfan, S., Ranjha, M. M. A. N., Nadeem, M., Safdar, M. N., Jabbar, S., Mahmood, S., Murtaza, M. A., Ameer, K., & Ibrahim, S. A. (2022). Antioxidant activity and phenolic content of sonication-and maceration-assisted ethanol and acetone extracts of *Cymbopogon citratus* leaves. , 9(9), 244.
- Jacques, R. A., dos Santos Freitas, L., Pérez, V. F., Dariva, C., de Oliveira, A. P., de Oliveira, J. V., & Caramão, E. B. (2007). The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparison with maceration. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(1), 6–12.
- Jafari, F., Ghavidel, F., & Zarshenas, M. M. (2016). A Critical Overview on the Pharmacological and Clinical Aspects of Popular *Satureja* Species. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 9(3), 118–127. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jams.2016.04.003>
- Jamzad, Z. (1994). A new species of the genus *Satureja* (Labiatae) from Iran. *Iran J Bot*, 6(2), 215–218.
- Kadatane, S. P., Satariano, M., Massey, M., Mongan, K., & Raina, R. (2023). The role of inflammation in CKD. *Cells*, 12(12), 1581.
- Kaeidi, A., Esmaeili-Mahani, S., Abbasnejad, M., Sheibani, V., Rasoulilian, B., Hajializadeh, Z., & Pasban-Aliabadi, H. (2013). *Satureja khuzestanica* attenuates apoptosis in hyperglycemic PC12 cells and spinal cord of diabetic rats. *Journal of Natural Medicines*, 67, 61–69.
- Khalil Moghaddam, S., Shahvelayati, A. S., & Aliahmadi, A. (2020). Synthesis and antioxidant properties of two new derivatives of Indeno-Benzofuran. *Journal of Chemical Health Risks*, 10(1), 75–80. <https://doi.org/10.22034/jchr.2020.671485>
- Khojasteh, A., Metón, I., Camino, S., Cusido, R. M., Eibl, R., & Palazon, J. (2019). In vitro study of the anticancer effects of biotechnological extracts of the endangered plant species *Satureja khuzistanica*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 2400.
- Kruk, J., Aboul-Enein, B. H., Duchnik, E., & Marchlewicz, M. (2022). Antioxidative properties of phenolic compounds and their effect on oxidative stress induced by severe physical exercise. *The Journal of Physiological Sciences*, 72(1), 19.
- Li, H.-B., Jiang, Y., Wong, C.-C., Cheng, K.-W., & Chen, F. (2007). Evaluation of two methods for the extraction of antioxidants from medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388, 483–488.
- Mahboubi, M., & Kazempour, N. (2017). Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja khuzistanica* Jamzad essential oil, ethanol and aqueous extracts. *Biharean Biologist*, 1–12.
- Malmir, M., Serrano, R., Reza Gohari, A., & Silva, O. (2014). Characterization of *Satureja khuzestanica* leaf as a herbal medicine. *Microscopy and Microanalysis*, 20(5), 1425–1435.
- Mirzababaeiy, S. A., Mahmoodi, M., & Mohebat, R. (2018). Synthesis and Characterization of Hydrogel Loaded Curcumin Encapsulated Chitosan Nanoparticles as Novel Wound Dressing. *Journal of Advanced Materials and Technologies*, 7(1), 53–63. https://www.jamt.ir/article_91681_en.html
- Mousavi, S. A., Nateghi, L., Javanmard Dakheli, M., Ramezan, Y., & Piravi-Vanak, Z. (2022). Maceration and ultrasound-assisted methods used for extraction of phenolic compounds and antioxidant activity from *Ferulago angulata*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(3), e16356.
- Ozansoy, M., Mikati, H., Velioglu, H. A., & Yulug, B. (2023). Exosomes: A missing link between chronic systemic inflammation and Alzheimer's disease? *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 159, 114161.

- Pavlica, S., & Gebhardt, R. (2010). Protective effects of flavonoids and two metabolites against oxidative stress in neuronal PC12 cells. *Life Sciences*, 86(3), 79–86. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.10.017>
- Roosta, S., Ghasemi, F., Mokhayeri, Y., Choobkar, S., Nikbakht, M. R., & Falahi, E. (2024). Effects of Satureja Khuzestanica supplementation on glycemic indices and lipid profile in type 2 diabetes patients: a randomized controlled clinical-trial. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 24(1), 201.
- Safarnavadeh, T., & Rastegarpanah, M. (2011). Antioxidants and infertility treatment, the role of Satureja Khuzestanica: A mini-systematic review. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 9(2), 61.
- Tohma, H., Altay, A., Köksal, E., Gören, A. C., & Gülçin, İ. (2019). Measurement of anticancer, antidiabetic and anticholinergic properties of sumac (*Rhus coriaria*): analysis of its phenolic compounds by LC–MS/MS. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(2), 1607–1619. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00077-9>
- Vinatoru, M., Toma, M., Radu, O., Filip, P. I., Lazurca, D., & Mason, T. J. (1997). The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrasonics Sonochemistry*, 4(2), 135–139.
- Xie, D., Deng, T., Zhai, Z., Sun, T., & Xu, Y. (2023). The cellular model for Alzheimer's disease research: PC12 cells. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15, 1016559.
- Yousefzadi, M., Riahi-Madvar, A., Hadian, J., Rezaee, F., Rafiee, R., & Biniaz, M. (2014). Toxicity of essential oil of Satureja khuzistanica: In vitro cytotoxicity and anti-microbial activity. *Journal of Immunotoxicology*, 11(1), 50–55.

