# Identification of Chemical Compositions and Protective Effects of Essential Oil of Arvaneh (*Hymenocrater* platystegius) on Oxidative Stress Induced by $H_2O_2$ in PC12 Cells

**Shokufe Emrani[1], Rahele Zhiani[1*], Samane Dolatabadi[2]**

[1]Department of Chemistry, Neyshabur Branch, Islamic Azad Univenrsity, Neyshabur, Iran

[2]Department of Biology, Neyshabur Branch, Islamic Azad Univenrsity, Neyshabur, Iran

*Article Info:*

***Received:*** **28 Jun 2015** ***Accepted*****: 30 Jul 2015**

## ABSTRACT

***Introduction:*** *Hymenocrater* is an important genus of *Lamiaceae* family. *Hymenocrater platystegius* is one of species in this genus and this plant is endemic to Iran and it grows wildly in the north east of Iran. The aim of this study was to investigate the chemical composition of *Hymenocrater platystegius* and to study the neuroprotective effect of essential oil of this plant in $H_2O_2$-induced neurotoxicity in PC12 cells. ***Materials and Methods:*** The essential oil was extracted by hydrodistilation of air-dried sample for 5 hours. The essential oil composition of the aerial parts of *Hymenocrater platystegius* was studied by gas chromatography mass spectrometry. Finally, we treated PC12 cells with the essential oil of *Hymenocrater platystegius*. ***Results:*** The yield of essential oil was 0.1 % (w/w). Fifty-nine compounds were identified representing about 84.72% of the total oil. The major components of this oil were 1, 8-cineole (14.27%), ß-pinene (4.89%), Terpinolene (4.83%), and Sabinene (4.59%). In addition, the data showed that the essential oil decreased oxidative stress-induced PC12 cells death. ***Conclusion:*** The results suggest that *Hymenocrater platystegius* could be a potential candidate for treatment of neurodegenerative diseases.

***Key words:***

1. Oxidative Stress
2. PC12 Cells
3. Oils, Volatile

*** *Corresponding Author:*** Rahele Zhiani

**E-mail:** *R_zhiani2006@yahoo.com*

# شناسایی ترکیبات شیمیایی و اثرات حفاظتی اسانس گل اروانه (*Hymenocrater platystegius*) بر استرس اکسایشی القاء شده توسط پراکسید هیدروژن در سلول‌های PC12

**شکوفه عمرانی[۱]، راحله ژیانی[۱*]، سمانه دولت آبادی[۲]**

[۱]گروه شیمی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران
[۲]گروه زیست شناسی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

**اطلاعات مقاله:**
**تاریخ دریافت:** ۷ تیر ۱۳۹۴
**تاریخ پذیرش:** ۸ مرداد ۱۳۹۴

## چکیده

**مقدمه:** *Hymenocrater* یک جنس مهم از خانوادهٔ نعناعیان (Lamiaceae) است. گیاه اروانه یکی از گونه‌ها در این جنس است و این گیاه بومی ایران است و به‌طور گسترده در شمال شرق ایران رشد می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی ترکیب شیمیایی گیاه اروانه و مطالعهٔ اثر حفاظت عصبی اسانس این گیاه، در مرگ نورونی ناشی از پراکسید هیدروژن در سلول‌های PC12 بود. **مواد و روش‌ها:** اسانس توسط روش تقطیر با آب از نمونه‌های خشک شده در هوا به مدت ۵ ساعت استخراج شد. ترکیب عصاره از بخش‌های هوایی گیاه اروانه توسط طیف سنجی جرمی کروماتوگرافی گازی مطالعه شد. در نهایت ما سلول‌های PC12 را با اسانس گیاه اروانه تیمار کردیم. **یافته‌ها:** بازده اسانس (W/W) ۰/۱٪ بود. ۵۹ ترکیب شناسایی شدند، که حدود ۸۴/۷۲٪ از کل اسانس را نشان می‌دادند. ترکیبات اصلی این اسانس ۱، ۸-سینئول (۱۴/۲۷٪)، بتا پینن (۴/۸۹٪)، ترپینلن (۴/۸۳٪) و سابینن (۴/۵۹٪) بودند. علاوه بر این داده‌ها نشان دادند که اسانس، مرگ سلول‌های PC12 ناشی از استرس اکسیداتیو را کاهش داد. **نتیجه‌گیری:** یافته‌ها پیشنهاد می‌دهند که گیاه اروانه می‌تواند یک کاندیدای مناسب برای درمان بیماری‌های تحلیل برندهٔ عصبی باشد.

**کلید واژه‌ها:**
۱. استرس اکسیداتیو
۲. سلول‌های PC12
۳. روغن‌های فرار

* **نویسنده مسئول:** راحله ژیانی
**آدرس الکترونیکی:** *R_zhiani2006@yahoo.com*

## مقدمه

آنتی‌اکسیدان‌ها[1] عواملی هستند که سبب از بین رفتن رادیکال‌های آزاد و دیگر انواع واکنش‌پذیر شده و به‌عنوان سد دفاعی سلول در برابر استرس اکسیداتیو عمل می‌کنند. مجموع دفاع آنتی‌اکسیدانی را می‌توان در چهار گروه تقسیم‌بندی کرد:

الف) عواملی که در قالب آنزیم سبب حذف رادیکال آزاد و دیگر انواع واکنش‌پذیر اکسیژن می‌شوند. به‌عنوان نمونه می‌توان از آنزیم سوپراکساید دیسموتاز[2]، کاتالاز[3]، پراکسیداز و آنتی‌اکسیدان‌های اختصاصی برای گروه تیول[4] نام برد.

ب) پروتئین‌هایی که سبب کاهش دسترسی سلول به پیش اکسیدانت‌هایی چون یون آهن، مس و غیره می‌شوند. مهم‌ترین این پروتئین‌ها ترانسفرین[5]، هاپتوگلوبین[6]، هموپکسین[7] و متالوتیونئین[8] هستند.

ج) پروتئین‌هایی که مولکول‌های زیستی را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو حفظ می‌کنند مانند پروتئین‌های شوک حرارتی.

د) مولکول‌هایی که دارای وزن مولکولی پایین بوده و می‌توانند گونه‌های واکنشگر اکسیژن (ROS)[9] و گونه‌های واکنشگر نیتروژن (RNS)[10] را به دام اندازند. همانند: گلوتاتیون[11] و اسید اوریک[12].

مکانیسم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی نیز شامل ۳ سطح حفاظتی است:

- سطح ۱: جلوگیری از ایجاد انواع واکنش‌پذیر اکسیژن.
- سطح ۲: از بین بردن انواع واکنش‌پذیر اکسیژن.
- سطح ۳: برطرف کردن آسیب‌های ایجاد شده توسط گونهٔ واکنش‌پذیر اکسیژن (۱، ۲).

ROS ها، انواعی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن از قبیل سوپر اکسید، هیدروکسیل و مولکول‌های غیر رادیکالی مثل پراکسید هیدروژن[13] (آب اکسیژنه: $H_2O_2$) را شامل می‌شوند (۳). در مقابل؛ استرس نیتراتیو[14] ناشی از تولید RNS ها مانند نیتریک اسید، نیتروژن دی اکسید و واسطه‌های واکنشگر آن‌ها می‌باشد (۳). این مولکول‌ها به ماکرو مولکول‌های حیاتی از قبیل پروتئین‌ها، لیپیدها و اسیدهای چرب حمله کرده و باعث آغاز استرس اکسیداتیو در بدن می‌شوند. استرس اکسیداتیو در علم زیست‌شناسی به‌طور کلی برای بیان شرایطی به کار می‌رود که میزان اکسیدان‌ها بالا باشد و یا میزان آنتی‌اکسیدان‌ها در سلول کم باشد. این شرایط به‌گونه‌ای است که غلظت رادیکال آزاد اکسیژن بالاتر از سطوح بیولوژیک می‌باشد (۴، ۵).

تغییرات اکسیداتیو اجزای سلول در طی اثر رادیکال‌های آزاد اکسیژن یکی از فرایندهای آسیب‌رسان بالقوهٔ بسیار مخرب در عملکرد سلول است که ممکن است منجر به مرگ سلول از طریق نکروز یا مرگ برنامه‌ریزی شده گردد (۶، ۷). در بدن انسان، تعادل ظریفی بین تولید و حذف ROS ها به‌عنوان پروآکسیدان (پروآکسیدان‌ها ترکیبات شیمیایی هستند که استرس اکسیداتیو را القاء می‌کنند. پروآکسیدان‌ها این عمل را یا از طریق ایجاد ROS ها یا مهار سیستم آنتی‌اکسیدانی اعمال می‌کنند) وجود دارد. پروآکسیدان‌ها یا از فرایندهای متابولیک ایجاد می‌شوند و یا از منابع خارجی تأمین می‌گردند که می‌توانند به‌طور بالقوه با مولکول‌های بدن وارد واکنش شوند (۸، ۹). مواد آنتی‌اکسیدان، قبل از اینکه آسیبی به مولکول‌های اصلی بدن وارد شود، آن‌ها را از محیط پاک می‌کنند (۱۰). اما در عین حال، حدود ۱٪ از پروآکسیدان‌ها در طول روز نشت می‌کنند و سبب آسیب اکسیداتیو می‌شوند. این مسئله می‌تواند به دلیل کاهش نسبی آنتی‌اکسیدان‌ها در طول روز باشد (۱۱). استرس اکسیداتیو نتیجهٔ عدم تعادل بین چندین فاکتور پروآکسیدان و آنتی‌اکسیدان است (۱۲-۱۴).

متابولیسم اکسیژن که منجر به تولید رادیکال‌های آزاد می‌گردد، نقش بسیار مهمی در فیزیولوژی و پاتولوژی سیستم عصبی دارد. با گذشت زمان محیط ردوکس[15] ایجاد شده در نورون‌ها به سمت شرایط اکسیداتیو می‌رود. به نظر می‌رسد که استرس اکسیداتیو ایجاد شده یک فاکتور عمومی در فرایند پیری سیستم‌های بیولوژیک است (۱۵). تولید بیش از حد ROS از طریق واکنش با پروتئین‌ها، لیپیدهای موجود در ساختار غشاء و نیز اسید نوکلئیک موجب آسیب سلولی می‌گردد. از این‌رو صدمات اکسیداتیو نه‌تنها مکانیسم درگیر در فرایند منتهی به از دست رفتن عملکرد طبیعی حسی و حرکتی در طی روند پیری است بلکه همچنین در روند بیماری‌های نورولوژیکی از جمله آلزایمر و پارکینسون نیز نقش دارد (۱۶).

در بررسی‌های In vitro، برای شبیه‌سازی شرایط استرس اکسیداتیو از آب اکسیژنه که قادر به نفوذ به سلول است، استفاده می‌شود (۱۷، ۱۸). پراکسید هیدروژن یک رادیکال آزاد نیست اما می‌تواند به‌راحتی از غشاهای زیستی عبور کند و باعث آسیب شدید به ماکرو مولکول‌های ضروری شود. پراکسید هیدروژن در حضور فلزاتی مانند آهن و مس، رادیکال بسیار فعال هیدروکسیل را تولید می‌کند. در تحقیقات مختلفی با استفاده از آب اکسیژنه اثرات استرس اکسیداتیو بر ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک سلول مورد بررسی قرار گرفته است. Akaishi و همکاران نشان دادند که آب اکسیژنه در سلول‌های گرانولی شکنج دندانه‌دار موجب افزایش جریان کانال‌های کلسیمی نوع L می‌شود (۱۹). Meng و Nie اثر این عامل مولد استرس اکسیداتیو را در سلول‌های هیپوکامپ مورد بررسی قرار دادند و ثابت کردند که آب اکسیژنه جریان سدیمی را افزایش می‌دهد (۲۰). بنابراین به نظر می‌رسد که استرس اکسیداتیو خواص الکتروفیزیولوژیک سلول‌های عصبی را تغییر می‌دهد.

[1] Antioxidants
[2] Superoxide dismutase enzyme
[3] Catalase
[4] Thiol
[5] Transferrin
[6] Haptoglobin
[7] Hemopexin
[8] Metallothionein
[9] Reactive oxygen species (ROS)
[10] Reactive nitrogen species (RNS)
[11] Glutathione
[12] Uric acid
[13] Hydrogen peroxide
[14] Nitrative stress
[15] Redox

استرس اکسیداتیو تنها یک عامل پاتولوژیک نبوده و در اعمال فیزیولوژیک نورونی نیز نقش دارد. به‌طور مثال تحقیقات نشان دادند که ROS برای القای LTP[16] مورد نیاز است و از طریق ایجاد تغییرات ردوکس در مولکول‌های پروتئینی در مسیرهای پیام‌رسانی[17] نقش دارد (۱۷).

Hong و Liu اثر محافظتی آنتی‌اکسیدانی با نام اسکوتلارین[18] را در سلول‌های PC12 در مقابل آب اکسیژنه مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که این آنتی‌اکسیدان مانع از افزایش کلسیم داخل سلولی، صدمهٔ اکسیداتیو به مولکول‌های لیپیدی سلول و ازدیاد ROS درون سلول می‌گردد. اثراتی که همه به‌وسیلهٔ آب اکسیژنه ایجاد شده بود. مرگ نورونی ناشی از آب اکسیژنه با استفاده از این آنتی‌اکسیدان مهار گردید (۲۱).

ردهٔ سلولی فئوکروموسیتومای[19] موش‌صحرایی PC12 به‌صورت گسترده‌ای در مطالعات عصبی و مسیرهای پیام‌رسان سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۲). همچنین نشان داده شده است که افزایش ROS در رده‌های سلولی مختلف از جمله PC12 سبب مرگ سلولی می‌گردد (۲۳).

پژوهش‌ها نشان می‌دهند که در سطح مولکولی، فنل‌های گیاهی از قبیل فلاونوئیدها، فلاونولیگنان‌ها و اسیدهای فنولیک می‌توانند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های مؤثر عمل کنند (۲۴). گل ارواله با نام علمی *Hymenocrater platistegius*، گیاهی معطر، چند ساله و پایا است که به‌صورت بوته‌ای و با ارتفاع ۶۰-۲۰ سانتی‌متر دیده می‌شود. از مهم‌ترین کاربردهای دارویی ارواله می‌توان به اثرات ضد التهابی، ضد اسپاسمی، ضد نفخی و تسکینی آن اشاره نمود (۲۵). مطالعهٔ حاضر جهت تعیین ترکیبات شیمیایی و بررسی اثرات محافظت‌کنندگی احتمالی اسانس گل ارواله در مرگ سلولی ناشی از پراکسید هیدروژن در سلول‌های عصبی PC12 به‌عنوان یک مدل آزمایشگاهی مناسب در مطالعات عصبی انجام گردید.

## مواد و روش‌ها

### روش اسانس گیری از گیاه

در این بررسی گل‌های ارواله از شهرستان کاشمر واقع در استان خراسان رضوی جمع‌آوری شدند و توسط هرباریوم[20] گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد، با نام علمی *Hymenocrater platystegius* مورد تأیید قرار گرفتند. گل‌های ارواله پس از خشک شدن در سایه، به‌صورت پودر درآمدند، سپس عمل اسانس گیری از آن‌ها به روش تقطیر با آب[21] توسط دستگاه کلونجر[22] به مدت ۵ ساعت انجام شد. اسانس به دست آمده، در ظرف شیشه‌ای برای رطوبت‌گیری ریخته شد. برای گرفتن آب موجود در اسانس از مادهٔ رطوبت‌گیر سولفات سدیم (Germany، Merck) استفاده گردید (۲۷، ۲۶)، سپس به‌منظور شناسایی و تعیین درصد ترکیبات تشکیل‌دهندهٔ اسانس، اقدام به تزریق اسانس به دستگاه طیف سنجی جرمی کروماتوگرافی گازی (GC-MS)[23] گردید.

[24] Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)
[25] Fetal bovine serum (FBS)
[26] Retinoic acid (RA)
[27] Morphogens
[28] Viability
[29] 3-(4, 5- Dimethylthiazol-2yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)

### کشت سلول

سلول‌های PC12 که از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به‌صورت فلاسک آماده و نیز ویال فریز شده خریداری گردیده بودند، در محیط کشت DMEM[24] (UK، Sigma) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS)[25]-(UK، Sigma) و آنتی‌بیوتیک ۱٪ (UK، Sigma) و در شرایط ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵٪ و فشار ۵٪ $CO_2$ کشت داده شدند.

### تمایز سلول‌ها با رتینوئیک اسید

این سلول‌ها به مدت ۸ روز در مجاورت رتینوئیک اسید (RA)[26] با غلظت ۱۰ میکرومولار قرار گرفتند. RA (Germany، Merck) در اتانول حل شد و در تاریکی به محیط کشت سلول‌ها اضافه گردید (۲۹، ۲۸). RA یکی از مهم‌ترین مورفوژن‌ها[27] است و توزیع آن با تمایز نورون‌ها و ویژگی مکانی آن‌ها در سیستم عصبی مرکزی در حال تکوین، مرتبط می‌باشد و اثر القائی RA بر سلول‌های PC12 در شرایط In vitro موجب تولید سلول‌هایی با فنوتیپ شبه عصبی می‌شود (۳۰).

محیط سلول‌ها یک روز در میان تعویض شد و در هنگام تمایز از محیط حاوی سرم ۱٪ استفاده گردید. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شدند.

### گروه‌های مورد مطالعه

**گروه کنترل:** در این گروه فقط سلول‌های PC12، در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی و آنتی‌بیوتیک ۱٪ کشت داده شدند.

**گروه پراکسید هیدروژن:** در این گروه، سلول‌های PC12 جهت ایجاد تنش اکسیداتیو به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت حاوی $H_2O_2$ ۳۰۰ میکرومولار کشت داده شدند.

**گروه‌های مختلف غلظت اسانس ارواله:** در این گروه‌ها، به محیط کشت حاوی سلول‌های PC12، غلظت‌های مختلف اسانس ارواله (۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار) اضافه گردید.

**گروه‌های اسانس ارواله + $H_2O_2$:** گروه‌هایی که سلول‌های PC12 ابتدا با غلظت‌های مختلف ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار اسانس ارواله تیمار شدند، سپس جهت ایجاد تنش اکسیداتیو در سلول‌ها به محیط کشت، $H_2O_2$ ۳۰۰ میکرومولار اضافه شد و در نهایت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. لازم به ذکر است که تعداد تکرار در تمامی گروه‌ها به‌صورت سه بار می‌باشد (n=۳).

### اثر اسانس بر بقاء سلول‌های شبه نورونی PC12

به‌منظور تعیین میزان بقای[28] سلول‌های PC12 تیمار شده با اسانس گل ارواله، از آزمون MTT[29] استفاده شد. مبنای آزمون

[16] Long-term potentiation (LTP)
[17] Signaling
[18] Scutellarin
[19] Pheochromocytoma
[20] Herbarium
[21] Hydrodistillation
[22] Clevenger apparatus
[23] Gas chromatography mass spectrometry

MTT احیای مادهٔ تترازولیم[30]، با رنگ مشخص زرد، به مادهٔ فورمازان[31] بنفش رنگ توسط آنزیم‌های سلول زنده است. پس از تمایز سلول‌ها با RA، سوسپانسیون سلولی حاوی $10^4$ cells/ml تهیه شد و به هرکدام از چاهک‌های پلیت کشت سلولی ۹۶ خانه (۱۵ چاهک)، ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی اضافه شد. به‌منظور چسباندن سلول‌ها به کف پلیت، پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت. روز بعد ابتدا هر یک از غلظت‌های مورد نظر از اسانس (۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار) در ویال‌های جداگانه تهیه شدند. بعد از آماده‌سازی غلظت‌ها، محیط کشت رویی چاهک‌ها تخلیه شد و چاهک‌ها با ۱۰۰ میکرو لیتر از غلظت‌های مختلف اسانس پر شدند. برای هر غلظت اسانس، سه چاهک تیمار شدند و سه چاهک فاقد اسانس نیز به‌عنوان چاهک‌های گروه کنترل در نظر گرفته شدند. سپس پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت.

پس از انکوباسیون سلول‌ها با اسانس، با استفاده از سمپلر، چاهک‌های حاوی سلول به‌طور کامل تخلیه شدند و به هر یک از آن‌ها ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت تازه اضافه گردید. سپس به هر یک از چاهک‌ها ۴۰ میکرو لیتر از محلول استوک MTT (Company Applichem، Germany) نیز اضافه گردید، به‌طوری‌که غلظت نهایی MTT در محیط کشت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در نهایت پلیت به مدت ۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از مدت زمان انکوباسیون، محتویات رویی هر چاهک خارج شد و به هر یک ۱۰۰ میکرو لیتر محلول دی متیل سولفوکساید (DMSO)[32] برای حل شدن بلورهای فورمازان اضافه گردید، سپس جذب نوری توسط دستگاه ELISA Reader (Model: Elx800، BioTek، USA) در طول موج‌های ۶۳۰-۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۳۱) و از روی جذب نمونه‌ها، میزان سلول‌های زنده به‌طور نسبی تعیین شد. هر چقدر تعداد سلول‌های زنده بیشتر باشد، این تبدیل بیشتر صورت گرفته و فورمازان بیشتری تولید می‌شود که در نهایت ما شاهد افزایش جذب خوانده شده خواهیم بود.

### اثر اسانس گل ارواله بر سلول‌های شبه نورونی PC12 تیمار شده با $H_2O_2$

جهت این بررسی نیز سوسپانسیون سلولی حاوی $10^4$ cells/ml تهیه شد و ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون به ۱۸چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه شد ( ۱۲ چاهک مربوط به گروه‌های اسانس ارواله + $H_2O_2$، سه چاهک مربوط به گروه کنترل و سه چاهک نیز مربوط به گروه $H_2O_2$ بود). بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، محیط کشت رویی چاهک‌ها تخلیه شد و ۱۰۰ میکرو لیتر از هر یک از غلظت‌های اسانس (۵، ۱۰ ، ۲۵ و۵۰ میکرومولار) به چاهک‌ها افزوده شد. چاهک‌های مربوط به گروه کنترل و گروه $H_2O_2$ فاقد اسانس بودند و به ازای هر غلظت اسانس نیز، سه چاهک تیمار شدند، بنابراین در کل ۱۲ چاهک با اسانس تیمار شدند. در مرحلهٔ بعد ۵۰ میکرو لیتر محلول $H_2O_2$ (۳۰۰ میکرومولار) به تمام چاهک‌ها به‌جز چاهک‌های کنترل افزوده شد و سپس پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از مدت زمان انکوباسیون میزان بقای سلولی به‌وسیلهٔ اندازه‌گیری فورمازان تولید شده از احیای MTT مورد ارزیابی قرار گرفت (۳۱).

### آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۱ و روش Oneway ANOVA انجام شد. تمام نتایج به‌صورت میانگین به همراه انحراف معیار (Mean ± SEM) از سه نمونه گزارش شدند. تفاوت میانگین‌ها در سطح $P<0/05$ معنی‌دار تلقی گردید.

## یافته‌ها

### ترکیبات شیمیایی اسانس ارواله

نتایج این تحقیق که با بررسی دقیق مؤلفه‌های مختلف و ترکیب‌های استاندارد صورت گرفته است، در جدول ۱ آمده است. تجزیه و تحلیل کروماتوگرام[33] به دست آمده، وجود ۵۹ ترکیب را نشان می‌دهد که در مجموع ۸۴/۷۲ درصد از کل اسانس را تشکیل می‌دهند. از میان ترکیب‌های شناسایی شده ۱، ۸-سینئول[34] (۱۴/۲۷٪) بالاترین درصد را دارا می‌باشد و بعد از آن بتا پینن[35] (۴/۸۹٪)، ترپینلن[36] (۴/۸۳٪) و سابینن[37] (۴/۵۹٪) ترکیبات عمدهٔ این گیاه می‌باشند. طیف کروماتوگرام گازی به دست آمده در نمودار ۱ نشان داده شده است.

### اثر اسانس گل ارواله بر روی سلول‌های شبه نورونی PC12

نتایج حاصل (نمودار۲) نشان می‌دهد که در هیچ‌کدام از سلول‌های تیمار شده با اسانس ارواله با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۵ و۵۰ میکرومولار (گروه‌های غلظت‌های مختلف اسانس ارواله) پس از ۲۴ ساعت، مرگ قابل ملاحظه و معنی‌داری نسبت به سلول‌های گروه کنترل دیده نشد ($P>0/05$). بنابراین اسانس در هیچ‌یک از غلظت‌های عنوان شده، اثر سمی بر سلول‌های PC12 ندارد.

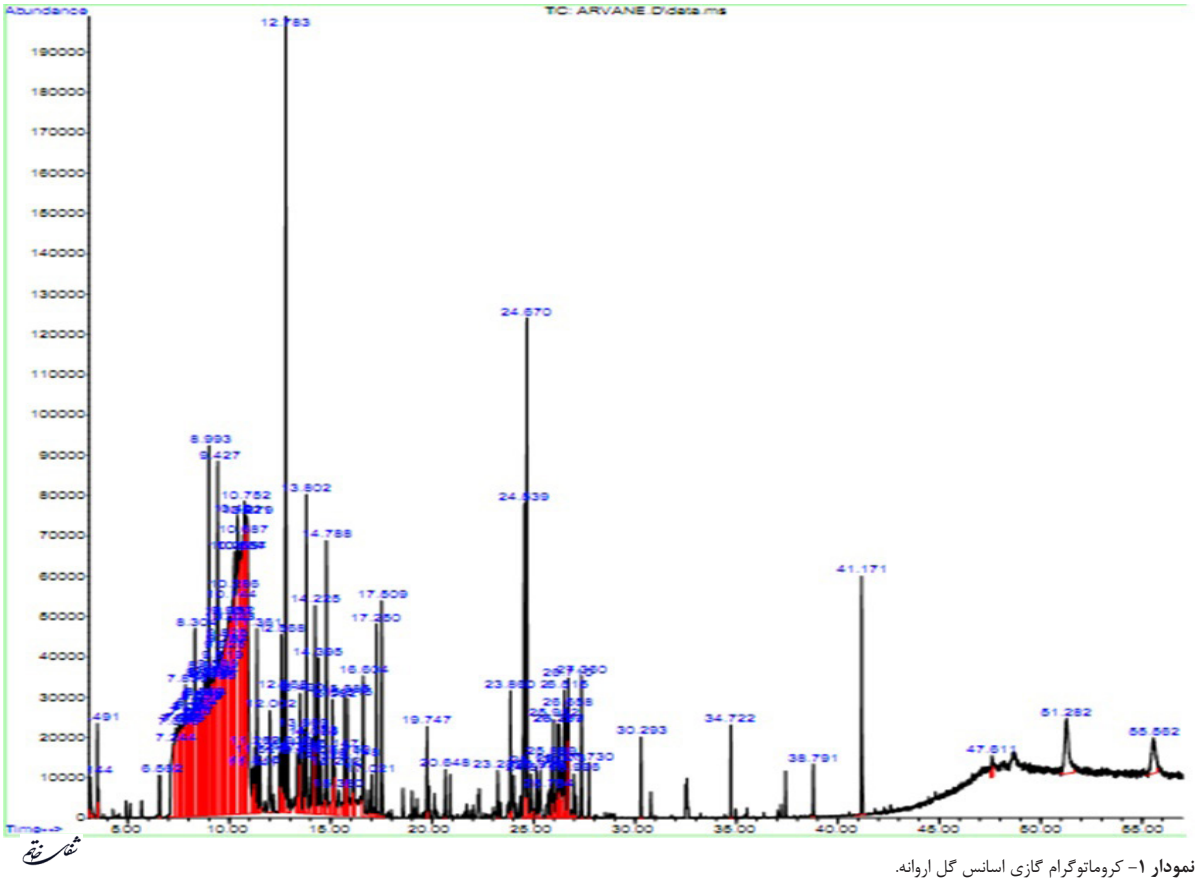
### اثر اسانس گل ارواله بر سلول‌های شبه نورونی PC12 تیمار شده با $H_2O_2$

با مقایسهٔ درصد زنده ماندن سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار از اسانس با گروه کنترل، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>0/05$) اما این غلظت‌های اسانس باعث افزایش معنی‌دار درصد زنده ماندن سلول‌ها در مقایسه با گروه $H_2O_2$ شدند ($P<0/05$). در مقابل درصد زنده ماندن سلول‌های تیمارشده با $H_2O_2$ و اسانس با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار، در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود ($P<0/05$) ولی درصد زنده ماندن این گروه از سلول‌ها در مقایسه با گروه $H_2O_2$ معنی‌دار نبود. بنابراین نتایج حاصل از این آزمایش نشان می‌دهد که اسانس روغنی گل

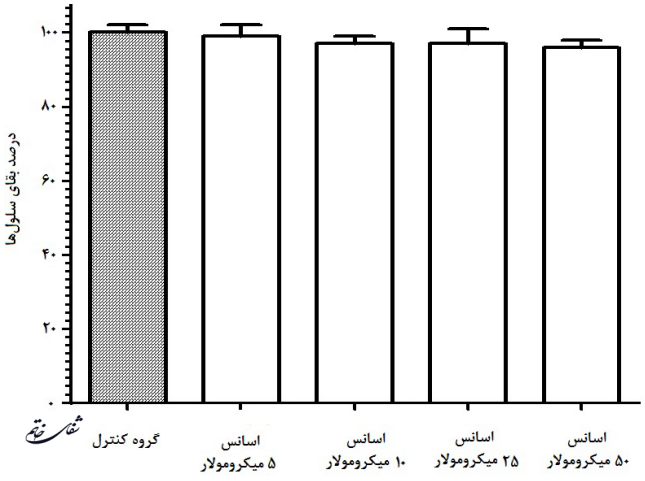
[30] Tetrazolium
[31] Formazan
[32] Dimethyl sulfoxide (DMSO)
[33] Chromatogram
[34] 1,8-Cineole
[35] ß-pinene
[36] Terpinolene
[37] Sabinene

**جدول ۱**- شناسایی اجزای اسانس گل اروانه به وسیلهٔ GC-MS.

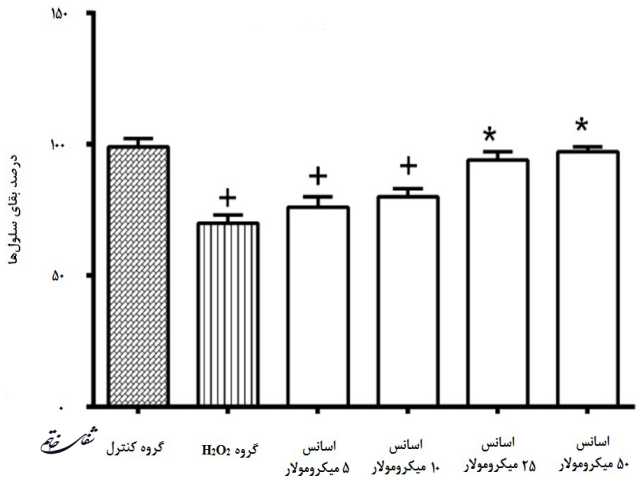
| ردیف | ترکیبات شیمیایی | ناحیه (٪) | شاخص بازداری | ردیف | ترکیبات شیمیایی | ناحیه (٪) | شاخص بازداری |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | 2-Hexenal | ۰/۲۹ | ۸۶۸ | ۳۱ | Terpinen-4-ol | ۰/۲۵ | ۱۱۷۵ |
| ۲ | Anisole | ۳/۰۱ | ۹۱۶ | ۳۲ | 4-Terpineol | ۱/۵۴ | ۱۱۷۹ |
| ۳ | α-Thujene | ۱/۲۷ | ۹۲۸ | ۳۳ | Naphthalene | ۰/۲۲ | ۱۱۸۱ |
| ۴ | α-Pinene | ۴/۲۷ | ۹۳۵ | ۳۴ | Alpha.terpineol | ۰/۹۷ | ۱۱۹۲ |
| ۵ | α -Fenchene | ۲/۵۱ | ۹۴۵ | ۳۵ | Myrtenal | ۰/۸۲ | ۱۱۹۶ |
| ۶ | Camphene | ۱/۲۰ | ۹۴۷ | ۳۶ | Verbenone | ۱/۶۴ | ۱۲۰۸ |
| ۷ | 2,4(10)-Thujadien | ۱/۳ | ۹۴۸ | ۳۷ | p-Cymen-3-ol | ۰/۳۱ | ۱۲۰۹ |
| ۸ | Benzaldehyde | ۰/۲۰ | ۹۵۵ | ۳۸ | Cumin aldehyde | ۰/۴۷ | ۱۲۱۴ |
| ۹ | Verbenene | ۱/۶۱ | ۹۶۱ | ۳۹ | trans-Carveol | ۰/۵۹ | ۱۲۱۹ |
| ۱۰ | Sabinene | ۴/۵۹ | ۹۷۰ | ۴۰ | Pulegone | ۰/۵۸ | ۱۲۳۸ |
| ۱۱ | β-Pinene | ۴/۸۹ | ۹۷۴ | ۴۱ | Neral | ۰/۲۶ | ۱۲۴۱ |
| ۱۲ | 3-Octanone | ۰/۲۴ | ۹۸۰ | ۴۲ | Carvone | ۰/۵۹ | ۱۲۴۲ |
| ۱۳ | Myrcene | ۰/۸۱ | ۹۸۶ | ۴۳ | Geranial | ۰/۹۹ | ۱۲۶۹ |
| ۱۴ | 2-Carene | ۲/۰۵ | ۹۹۶ | ۴۴ | Phellandral | ۱/۰۰ | ۱۲۷۴ |
| ۱۵ | α-Terpinene | ۲/۶۳ | ۱۰۱۳ | ۴۵ | Trans-anethole | ۰/۲۲ | ۱۲۸۳ |
| ۱۶ | *p*-Cymene | ۱/۲۹ | ۱۰۲۰ | ۴۶ | Bornyl acetate | ۰/۷۶ | ۱۲۸۵ |
| ۱۷ | Limonene | ۱/۸۱ | ۱۰۲۵ | ۴۷ | Thymol | ۰/۴۹ | ۱۲۹۰ |
| ۱۸ | 1,8-Cineole | ۱۴/۲۷ | ۱۰۲۷ | ۴۸ | Carvacrol | ۰/۲۹ | ۱۲۹۹ |
| ۱۹ | γ-Terpinene | ۲/۷۳ | ۱۰۵۷ | ۴۹ | Azulene | ۰/۳۱ | ۱۳۰۰ |
| ۲۰ | trans Sabinene hydrate | ۰/۳۱ | ۱۰۶۴ | ۵۰ | Beta bourbonene | ۰/۴۲ | ۱۳۸۰ |
| ۲۱ | n-Octanol | ۱/۴۹ | ۱۰۶۷ | ۵۱ | β-Ylangene | ۱/۱۸ | ۱۴۲۳ |
| ۲۲ | Terpinolene | ۴/۸۳ | ۱۰۸۷ | ۵۲ | Aromadendrene | ۰/۳۰ | ۱۴۳۴ |
| ۲۳ | Linalool | ۱/۹۷ | ۱۰۹۹ | ۵۳ | (E)-β-Farnesene | ۰/۲۵ | ۱۴۵۱ |
| ۲۴ | trans-Pinocarveol | ۰/۹۴ | ۱۱۳۹ | ۵۴ | Alloaromadendrene | ۰/۴۳ | ۱۴۵۹ |
| ۲۵ | trans-Sabinol | ۰/۳۴ | ۱۱۳۹ | ۵۵ | β-Selinene | ۰/۳۳ | ۱۴۸۶ |
| ۲۶ | Cis-verbenol | ۰/۵۲ | ۱۱۴۰ | ۵۶ | 2-Pentadecanone | ۰/۳۲ | ۱۵۰۰ |
| ۲۷ | trans-Verbenol | ۳/۹۳ | ۱۱۴۴ | ۵۷ | δ-Cadinene | ۰/۳۸ | ۱۵۱۷ |
| ۲۸ | Pinocarvone | ۰/۲۶ | ۱۱۶۳ | ۵۸ | Elemol | ۰/۵۲ | ۱۵۵۵ |
| ۲۹ | Borneol | ۰/۳۵ | ۱۱۶۶ | ۵۹ | Germacrene B | ۰/۸۵ | ۱۵۶۰ |
| ۳۰ | Menthol | ۱/۵۳ | ۱۱۷۴ | مجموع | | ٪۸۴/۷۲ | |




**نمودار ۱**- کروماتوگرام گازی اسانس گل اروانه.




**نمودار ۲**- میزان بقاء سلول‌های PC12 تیمارشده با غلظت‌های مختلف اسانس گل ارواته.




**نمودار ۳**- اثر حفاظتی اسانس گل ارواته بر استرس اکسایشی ایجاد شده توسط $H_2O_2$ در سلول‌های PC12. + ($P<۰/۰۵$) اختلاف در برابر گروه کنترل و * ($P<۰/۰۵$) اختلاف در برابر گروه $H_2O_2$ را نشان می‌دهد.

ارواته می‌تواند به‌طور مؤثر و به‌صورت وابسته به دوز از سلول‌های عصبی PC12 در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از $H_2O_2$ محافظت نماید (نمودار ۳).

## بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعهٔ حاضر ابتدا به بررسی کیفی و کمّی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس گل ارواته پرداخته شد. ترکیبات شیمیایی اسانس به دست آمده از سایر گونه‌های ارواته نیز پیشتر گزارش شده است.

در بررسی که توسط اخلاقی در سال ۲۰۱۴، بر روی اسانس گل ارواته انجام شد، دوازده ترکیب که ۸۰/۴٪ از کل اسانس را تشکیل می‌دادند، شناسایی شدند و ترکیبات اصلی این گیاه طی این تحقیق آلفا پینن[38] (۲۵/۸٪)، لیمونن[39] (۲۰/۹٪)، بتا پینن (۱۲/۲٪) گزارش شدند (۳۲).

ثابت تیموری و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲، ترکیبات شیمیایی گل ارواته جمع‌آوری شده از شش منطقهٔ بزنگان، بزد، بزق، گلمکان، کلات و زشک را شناسایی و با یکدیگر مقایسه کردند. در این تحقیق نشان داده شد که بالاترین درصد اسانس را ارواتهٔ زشک (۲/۳٪) و پایین‌ترین درصد اسانس را ارواته گلمکان (۰/۰۴۵٪) دارا بود.

بین ۶۴ ترکیب شناسایی شده از اسانس‌ها ترکیبات بتا کاریوفیلن[40]، اسپاتولنول[41]، فیتول[42]، هنیکوسان[43] ، لینالول[44]، هگزاکسان[45] و یوکالیپتول[46] در بزد درصدهای ( ۳/۵۵، ۲/۱۸، ۰/۶۲، ۰/۰، ۰/۶، ۰/۱۸ و ۰/۰)، در بزق (۶/۱۵، ۲/۲۸، ۰/۵۱، ۰/۰، ۰/۲۹، ۰/۹۴ و ۰/۳۲)، در بزنگان (۳/۱۶، ۲/۶۶، ۰/۸۵، ۰/۰، ۰/۱۲، ۰/۴۵ و ۰/۰)، در زشک (۲/۲۵، ۲/۶۹، ۰/۱۸، ۳/۰۸، ۰/۱۳، ۰/۵۳ و ۰/۴۳)، در کلات (۳/۸۸، ۲/۱۲، ۰/۱۲، ۴/۱۴، ۰/۲، ۰/۲ و ۰/۰) و در گلمکان (۲/۴۹، ۲/۲۷، ۰/۶۵، ۰/۰، ۰/۳۸، ۲/۰۶ و ۰/۱) را به ترتیب دارا بودند. ترکیب جرماکرن دی[47] نیز فقط در اسانس بزنگان (۳/۰۵٪) و کلات (۲/۲۵٪) مشاهده شد (۳۳). در مطالعه‌ای نیز ترکیبات اصلی یافت شده در اسانس گیاه ارواته با نام علمی *Hymenocrater elegans* bunge، شامل اسپاتولنول (۴۹/۵٪) و کاریوفیلن اکسید[48] (۱۲/۹٪) بودند (۳۴).

در مطالعه‌ای دیگر گیاه *H. calycinus boiss* از سه منطقهٔ یکه شاخ شهرستان بجنورد (نمونهٔ A)، نوده (نمونهٔ B) و جنگل گلستان (نمونهٔ C) در شمال شرق ایران جمع‌آوری شدند و ترکیبات اسانس آن‌ها شناسایی شد. ترکیبات اصلی شامل: آلفا پینن (۱۰/۵٪) و سابینن (۱۰/۵٪) در نمونهٔ A، اسپاتولنول (۳۵/۴٪) و abietadiene (۱۳/۴٪) در نمونهٔ B و بتا کاریوفیلن (۳۲/۸٪) و کاریوفیلن اکسید (۱۶/۱٪) در نمونهٔC بودند (۳۵).

در سال ۲۰۰۸ اکرمیان و همکاران، در یک مطالعه ترکیبات شیمیایی *Hymenocrater platystegius Rech.f.* جمع‌آوری شده از اخلمد واقع در استان خراسان رضوی (ایران) را شناسایی نمودند. مطابق با نتایج حاصل از این پژوهش ۴۲ ترکیب که حدود ۹۹/۸٪ از کل اسانس را تشکیل می‌دادند، شناسایی شدند. هیدروکربن‌های مونوترپنی (۴۵/۳٪) بخش عمدهٔ اسانس را تشکیل دادند و بعد از آن مونوترپن‌های اکسیژن‌دار (۲۶/۷٪) بخش اصلی اسانس بودند. ترکیبات اصلی یافت شده در اسانس ارواته تحقیق شده در این پژوهش آلفا پینن (۲۰/۶٪)، ۱و ۸-سینئول (۱۸/۶٪)، بتا پینن (۱۲/۳٪)، وای کادینین[49] (۴/۲٪)، مایرسین[50] (۳/۵٪) و لینالول (۳/۳٪) بودند (۳۶).

[38] α-Pinene
[39] Limonene
[40] ß-Caryophyllene
[41] Spathulenol
[42] Phytol
[43] Heneicosane
[44] Linalool
[45] Hexacosane
[46] Eucalyptol
[47] Germacrene-D
[48] Caryophyllene oxide
[49] Y-Cadinene
[50] Myrcene

در این تحقیق نیز ترکیبات موجود در اسانس با استفاده از دستگاه GC-MS شناسایی شدند. در اسانس گل اروانهٔ مورد مطالعه ۵۹ ماده از ۸۴/۷۲ درصد کل ترکیبات شناسایی شدند. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که بیشترین مقدار اجزای اسانس را ترکیبات ۱، ۸-سینئول، بتا پینن، ترپینلن و سابینن تشکیل می‌دهند. بنابراین ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و ترپنوئیدی از جمله ترکیبات مهم این گیاه می‌باشند که این ترکیبات، خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی دارند (۳۷).

همچنین در گزارشی نیز خاصیت آنتی‌اکسیدانی و میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی *Hymenocrater calycinus* بررسی و ارزیابی شده است (۳۸).

در این بررسی نیز پس از شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس این گیاه و اندازه‌گیری کمّی این ترکیبات، به بررسی اثر اسانس بر روی سلول‌های PC12 تحت استرس اکسیداتیو پرداخته شد. ردهٔ سلولی PC12 برخی از ویژگی‌های سلول عصبی را در محیط کشت نشان می‌دهد و در پژوهش‌های متعددی نیز به‌عنوان مدل سلول عصبی استفاده شده است (۳۹).

نتایج حاصل نشان داد که اسانس اروانه به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی قادر است در غلظت‌های بهینهٔ ( ۲۵ و ۵۰ میکرومولار) سلول‌های شبه نورونی PC12 را از مرگ سلولی ناشی از پراکسید هیدروژن حفاظت نماید. استرس اکسیداتیو عامل اصلی تخریب نورونی در بسیاری از اختلالات عصبی می‌باشد (۴۰، ۴۱). استرس اکسیداتیو منجر به آسیب DNA، افزایش اکسیداسیون لیپید و چربی می‌شود و عامل اصلی در بیماری‌های تخریب نورونی می‌باشد (۴۱). در بررسی‌های In vitro، گاهی برای شبیه‌سازی شرایط استرس اکسیداتیو از آب اکسیژنه که قادر به نفوذ به سلول است، استفاده می‌شود (۱۸، ۱۷).

سالانه میلیون‌ها نفر دچار بیماری‌های تخریب نورونی می‌شوند (۴۲). طیف وسیعی از آنتی‌اکسیدان‌ها در بررسی‌های In vitro و In vivo در مدل‌های مرگ نورونی و تحلیل عصبی[51] مورد پژوهش قرار گرفته و اثرات قابل قبولی از خود نشان داده‌اند، به‌عنوان مثال در تحقیقات متعددی اثر آنتی‌اکسیدانی مشتق از چای سبز با نام EGCG[52] مورد بررسی قرار گرفته و اثرات حفاظت عصبی[53] آن به اثبات رسیده است (۴۳).

بنابراین استفاده از گیاهان دارویی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی در جهت کاهش استرس اکسیداتیو و در نتیجه کاهش تخریب نورونی می‌تواند یکی از راهکارهای درمان این اختلالات عصبی باشد (۴۴، ۴۵). در مطالعه‌ای نیز Hong و Liu اثر محافظتی آنتی‌اکسیدانی با نام اسکوتلارین را در سلول‌های PC12 در مقابل آب اکسیژنه مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که این آنتی‌اکسیدان مانع از افزایش کلسیم داخل سلولی، صدمهٔ اکسیداتیو به مولکول‌های لیپیدی سلول و ازدیاد ROS درون سلول می‌گردد؛ اثراتی که همه به‌واسطهٔ آب اکسیژنه ایجاد شده بود. مرگ نورونی ناشی از آب اکسیژنه با استفاده از این آنتی‌اکسیدان‌ها مهار گردید (۴۶).

مطالعهٔ حاضر نیز شواهدی را فراهم می‌کند که بیان‌کنندهٔ خاصیت دارویی اسانس گل اروانه در اختلالات عصبی می‌باشد و افق جدیدی را برای آزمایشات بیشتر در این زمینه به روی محققین علوم اعصاب می‌گشاید.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله، مراتب تشکر و قدردانی خود را از گروه میکروبیولوژی و گروه شیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور، به سبب فراهم آوردن امکانات پژوهشی و همچنین معاونت پژوهشی دانشگاه به‌موجب تأمین مالی پروژه، اعلام می‌دارند.

## منابع

1. Bhattacharya K, Davoren M, Boertz J, Schins R, Hoffmanna E, Dopp E. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. Part Fibre Toxicol. 2009; 6: 17. doi: 10.1186/1743-8977-6-17.

2. Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P, Schiestl R. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. Cancer Res. 2009; 69(22): 8784-9.

3. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? J Neurochem. 2006; 97: 1634-58.

4. Gonzalez-Flecha B, Reides C, Cutrin JC, Llesuy SF, Boveris A. Oxidative stress produced by suprahepatic occlusion and reperfusion. Hepatology. 1993; 18(4): 881-9.

5. Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. Curr Med Chem. 2001; 8(7): 851-62.

6. Sarafian TA, Bredesen DE. Is apoptosis mediated by reactive oxygen species? Free Radic Res. 1994; 21(1):1-8.

7. Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. Hum Reprod. 1998; 13(4): 998-1002.

8. Dean RT, Fu SM, Stoker R. Biochemistry and pathology of radical-Mediated protein oxidation. Biochem J. 1997; 324: 1-18.

9. Stadtman ER. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by

[51] Neurodegeneration
[52] Epigallocatechin gallate
[53] Neuroprotective

metal-catalyzed reactions. Annu Rev Biochem. 1993; 62: 797-821.

10. Morrissey PA. Dietary antioxidants in health and disease. Int Dairy J. 1998; 8: 463-72.

11. Berger MM. Can oxidative damage be treated nutritionally? Clin Nutr. 2005; 24: 172-83.

12. Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. New York: Oxford Univ Press. 1999; 936-40.

13. Habdous M, Herbeth B, Vincent-Viry M, Lamont JV, Fitzgerald PS, Visvikis S, et al. Serum total antioxidant status, erythrocyte superoxide dismutase and whole-blood glutathione peroxidase activities in the stanislas cohort: influencing factors and reference intervals. Clin Chem Lab Med. 2003; 41(2): 209-15.

14. Alamdari DH, Paletas K, Pegiou T, Sarigianni M, Befani C, Koliakos G. A novel assay for the evaluation of the prooxidant-antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients. Clin Biochem. 2007; 40(3-4): 248-54.

15. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol. 1956, 11: 298-300.

16. Annunziato L, Pannaccione A, Cataldi M, Secondo A, Castaldo P, Di Renzo G, et al. Modulation of ion channels by reactive oxygen and nitrogen species. a pathophysiological role in brain aging? Neurobiol Aging. 2002; 23: 819-34.

17. Cui K, Luo X, Xu K, Ven Murthy MR. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. Progr Neuro Psycho Pharmocol Biol Psychiat. 2004; 28: 771-99.

18. Dringen R, Pawlowski P, Hirrlinger J. Peroxide detoxification by brain cells. J Neurosci Res. 2005; 79: 157-65.

19. Akaishi T, Nakazawa K, Sato K, Saito H, Ohno Y, Ito Y. Hydrogen peroxide modulates whole cell currents through L-type channels in cultured rat dentate granule cells. Neurosci Lett. 2004; 356: 25-8.

20. Meng Z, Nie A. Effects of hydrogen peroxide on sodium current in acutely isolated rat hippocampal CA1 neurons. Toxicol Lett. 2004; 147: 45-52.

21. Hong H, Liu GQ. Scutellarin protects PC12 cells from oxidative stress induced apoptosis. J Asian Nat Prod Res. 2006; 8: 471-9.

22. Reimann-Philipp U, Ovase R, Weigel PH, Grammas P. Mechanisms of cell death in primary cortical neurons and PC12 cells. J Neurosci Res. 2001; 64: 654-60.

23. Craig WJ. Health-promoting properties of common herbs. Am J Clin Nutr. 1999; 70: 491-9.

24. Matsuoka I, Mizuno N, Kurihara K. Cholinergic differentiation of clonal rat pheochromocytoma cells (PC12) induced by retinoic acid increase of choline acetyltransferase activity and decrease of tyrosine hydroxylase activity. Brain Res. 1989; 1: 53-60.

25. Akhlaghi H, Saiidi Asl MR, Mohamad-Hosseini M. Composition of the essential oil of Hymnocrater platystegius in Iran. Chem Nat Comp. 2009; 45(3): 448-52.

26. Ebrahimabadi AH, Mazoochi A, Kashi FJ, Djafari-Bidgoli Z, Batooli H. Essential oil composition and antioxidantand antimicrobial properties of the aerial parts of salvia eremophila boiss. Iran Food Chem. Toxicol. 2010; 48: 1371-6.

27. Shahsavari N, Barzegar M, Sahari MA, Naghdibadi H. Antioxidant activity of essential oil of Zataria multiflora Boiss in soy oil. J Med Plants. 2008; 28: 56-68.

28. Scheibe RJ, Ginty DD, Wagner JA. Retinoic acid stimulates the differentiation of PC12 cells that are deficient in cAMP dependent protein kinase. J Cell Biol. 1991; 5: 1173-82.

29. Gohari A, Saeidnia S, Shahverdi A, Yassa N, Malmir M, Mollazade K. Phytochemistry and antimicrobial compounds of Hymenocrater calycinus. EurAsia J BioSci. 2009; 3: 64-8.

30. Bain G, Kitchens D, Yao M, Heuttner JE, Jottlieb DL. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. Dev Bio. 1995; 168(2): 342-57.

31. Shi da H, Wu JH, Ge HM, Tan RX. Protective effect of hopeahainol A, a novel acetylcholinesterase inhibitor, on hydrogen peroxide-induced injury in PC12 cells. Environ Toxicol Pharmacol. 2009; 28(1): 30-6.

32. Akhlaghi H. Flower essential oil of hymnocrater platystegius rech.f, a labiate herb indigenous in Iran. JPHS. 2014; 2(3): 125-8.

33. Sabet Teimouri M, Koocheki A, Nassiri Mahallati M. Composition of essential oil percent of Gol-e-Arvaneh Bezghi (Hymenocrater platistegius Rech. F.) in six habitats of Khorasan province, Iran. Intl J Agri Crop Sci. 2012; 4(10): 643-6.

34. Firouznia A, Rustaiyan A, Masoudi S, Rahimzadeh

M, Bigdeli M, Tabatabaeianaraki M. Volatile constituents of Salvia limbata, Stachys turcomanica, Scutellaria litwinowii and Hymenocrater elegans four Lamiaceae Herbs from Iran. J Essent Oil Bear Plants. 2009; 12(4): 482-9.

35. Firouznia A, Rustaiyan A, Nadimi M, Masoudi S, Bigdeli M. Composition of the essential oil of hymnocrater calycinus (Boiss.) Benth from Iran. J Essent Oil Res. 2005; 17(5): 527-9.

36. Akramian M, Nejad Ebrahimi S, Joharchi MR. Essential oil composition of Hymenocrater platystegius Rech.f. from Iran. J Essent Oil Res. 2008; 11(2): 199-202.

37. Naghibi F, Mosaddegh M, Mohammadi Motamed M, Ghorbani A. Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. Iran J Pharm Res. 2005; 2: 63-79.

38. Cao X, Shoichet MS. Defining the concentration gradient of nerve growth factor for guided neurite outgrowth. Neuroscience. 2001; 103(3): 831-40.

39. Soodmand M, Mohamadi SA, Jalilvand M. Phytochemical analysis, total phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity from aerial parts of Hymenocrater Calycinus (Boiss). J Appl Environ Bio Sci. 2015; 4(11S): 141-5.

40. Sims NR. Energy metabolism, oxidative stress and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. Neurodegeneration. 1996; 5(4): 435-40.

41. Behl C. Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. Prog Neurobiol. 1999; 57(3): 301-23.

42. Dorsey ER, George BP, Leff B, Willis AW. The coming crisis: obtaining care for the growing burden of neurodegenerative conditions. Neurology. 2013; 80(21): 1989-96.

43. Kelsey NA, Wilkins HM, Linseman DA. Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. Molecules. 2010; 15: 7792-814.

44. Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. Life Sci. 2005; 78: 431-41.

45. Behl C. Vitamin E and other antioxidants in neuroprotection. Int J Vitam Nutr Res. 1999; 3: 213-9.

46. Hong H, Liu GQ. Protection against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells by scutellarin. Life Sci. 2004; 74(24): 2959-73.