

Research Paper

Evaluation of the Effect of Methanolic Extract of *Salvia Spinosa* L. Aerial Parts in Preventing H₂O₂-induced Cellular Senescence in Mouse Embryonic Fibroblast Cells (NIH/3T3)



Shadi Gholampour¹ , Mehdi Evazalipour² , Fatemeh Yousefbeyk³ , *Ehsan Zamani¹

1. Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

2. Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

3. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.



Citation Gholampour Sh, Evazalipour M, Yousefbeyk F, Zamani E. [Evaluation of the Effect of Methanolic Extract of *Salvia Spinosa* L. Aerial Parts in Preventing H₂O₂-induced Cellular Senescence in Mouse Embryonic Fibroblast Cells (NIH/3T3) (Persian)]. *Journal of Guilan University of Medical Sciences*. 2026; 34(4):346-359. <https://doi.org/10.32598/JGUMS.34.4.1676.3>

doi <https://doi.org/10.32598/JGUMS.34.4.1676.3>

Received: 12 Jan 2025

Accepted: 07 Apr 2025

Available Online: 01 Jan 2026

ABSTRACT

Background Stress-induced premature senescence, one of the main factors causing aging, is an irreversible process of cell proliferation that occurs in response to stressors. Studies have shown that H₂O₂ causes oxidative stress-induced cellular senescence. *Salvia spinosa* L. is known as a natural antioxidant due to phenolic and terpene compounds.

Objective This study evaluated the protective effect of the methanolic extract of *S. Spinosa* L. aerial parts, as an antioxidant source, on H₂O₂-induced cellular senescence in mouse embryonic fibroblast cells (NIH/3T3).

Methods Oxidative stress was evaluated by measuring the levels of malondialdehyde, glutathione, catalase, and superoxide dismutase. The qualitative β-galactosidase staining method was used to assess the senescence process.

Results H₂O₂-induced oxidative stress caused a significant increase in lipid peroxidation (P<0.05) and a significant decrease in glutathione (P<0.01), catalase (P<0.05), and superoxide dismutase (P<0.05) levels. The extract significantly reduced lipid peroxidation (P<0.01) and significantly increased superoxide dismutase level (P<0.05) in the H₂O₂-treated group. However, the levels of glutathione and catalase did not increase significantly in the group treated with extract and H₂O₂ compared to the H₂O₂ group. The β-galactosidase activity increased in the H₂O₂ group. The use of extract reduced the activity of the β-galactosidase compared to the H₂O₂ group.

Conclusion This study demonstrated that *S. Spinosa* L. extract, as an antioxidant, can have protective effects in preventing oxidative stress-induced senescence.

Keywords:

Salvia spinosa
L, Antioxidant,
Oxidative stress,
Ageing, fibroblast
cells

* Corresponding Author:

Ehsan Zamani, PhD.

Address: Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, Guilan University of Medical Science, Rasht, Iran.

Tel: +98 (13) 33486477

E-Mail: zamani2246@gmail.com



Copyright © 2026 The Author(s);
This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-BY-NC; <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode.en>),
which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

Extended Abstract

Introduction

Aging is a natural biological phenomenon that leads to the deterioration of cellular and tissue functions and structures over time. It is also a consequence of the damage caused by exposure to several stresses, which leads to age-related diseases [1, 2].

Cellular senescence is the most crucial process contributing to aging and age-related diseases. Senescent cells are characterized by the irreversible arrest of the cell cycle and a loss of proliferative capacity [3, 4].

Several studies have suggested that reactive oxygen species play a significant role in causing oxidative stress-induced cellular senescence. Hydrogen peroxide (H_2O_2) is widely used to induce cellular senescence in several models [5]. Various studies have shown that antioxidants may reduce oxidative stress by interrupting free radical propagation or preventing their formation. Plants contain many natural compounds with antioxidant activity [6].

The genus *Salvia*, belonging to the Lamiaceae family, contains more than 1000 species. *Salvia* reported in the flora of Iran are 61 species, of which 17 are endemic [7].

According to previous reports, *Salvia spinosa* L. is rich in bioactive compounds, such as terpenes and phenolic compounds. These phytochemicals make this species an appropriate candidate as an antioxidant to prevent aging and age-related diseases [7-9].

To date, the protective effects of *S. spinosa* L. on cellular senescence have not been evaluated. Therefore, the present study aimed to investigate the role of H_2O_2 in inducing premature cellular senescence and evaluate the antioxidative properties of the methanolic extract of *S. spinosa*, which attenuates cellular senescence in the mouse embryonic fibroblast cell line NIH/3T3.

Methods

The aerial parts of *S. spinosa* L. were collected from Rostamabad, Guilan, northern Iran. After collection, the aerial parts of the plant were dried in the shade and powdered. The powder was extracted with methanol using the percolation method.

NIH/3T3 cells were incubated at 37 °C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. After the third passage, the cells were seeded in a 6-well culture plate and then divided into the following groups: Control (NIH/3T3 cells cultured in dulbecco's modified eagle medium [DMEM] medium supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin/streptomycin), H_2O_2 (cells were exposed to H_2O_2 for 2 h), *S. spinosa*+ H_2O_2 (cells were treated with methanolic extract of the aerial parts of *S. spinosa* at a concentration of 80 µg. for 24 h, and then treated with 400 mM H_2O_2 for 2 h). Cells were subjected to an assay, senescence-associated β -galactosidase, which is detected by a blue color in cells using X-gal staining [10].

Oxidative stress was assessed by measuring lipid peroxidation, glutathione concentration, the activities of catalase, and superoxide dismutase. Malondialdehyde, an end product of lipid peroxidation, was measured using the thiobarbituric acid reaction. Catalase (CAT NO. ZB-CAT-96), superoxide dismutase (CAT NO. ZB-SOD-96), and glutathione levels (CAT NO. ZB-GSH-96) were calculated by colorimetry using commercial kits (ZellBio GmbH, Germany).

Finally, the statistical results were evaluated using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a post-hoc Tukey Test. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Senescence-associated β -galactosidase activity was verified by the appearance of the blue color. As expected, the cells treated with H_2O_2 showed the most blue color development than the control group. Conversely, the cells treated with *S. spinosa*+ H_2O_2 showed a lower blue color development than the H_2O_2 group. The results confirmed that *S. spinosa* inhibited H_2O_2 -induced cellular senescence.

Following the assessment of oxidative stress parameters, H_2O_2 -induced oxidative stress caused a significant increase in lipid peroxidation ($P < 0.05$) and a significant decrease in glutathione ($P < 0.01$), catalase ($P < 0.05$), and superoxide dismutase ($P < 0.05$) levels.

A significant decrease ($P < 0.01$) in the concentration of malondialdehyde was observed in the *S. spinosa*+ H_2O_2 group compared to the H_2O_2 group. Furthermore, superoxide dismutase activity significantly increased ($P < 0.05$) in the *S. spinosa*+ H_2O_2 group compared to the H_2O_2 group. However, glutathione levels and catalase enzyme activity in the *S. spinosa*+ H_2O_2 group did not significantly change compared to the H_2O_2 group.

Conclusion

Exposure of NIH/3T3 cells to H₂O₂ induced cellular senescence by triggering oxidative stress. Treatment with the methanolic extract of *S. spinosa* significantly reduced lipid peroxidation and increased superoxide dismutase activity, indicating the protective role of the extract of *S. spinosa* against oxidative stress-induced cellular senescence. However, the extract did not show a significant change in glutathione levels or catalase enzyme activity.

These findings confirm that the methanolic extract of aerial parts of *S. spinosa*, as a source of antioxidants, can reduce cellular senescence by inhibiting certain pathways involved in oxidative stress.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Ethics Committee of [Guilan University of Medical Sciences](#), Rasht, Iran (Code: IR-GUMS.REC.1402.450).

Funding

This study did not receive any financial support from funding organizations in the public, commercial, or non-profit sectors.

Authors contributions

Conceptualization and study design: Ehsan Zamani, Mehdi Evazalipour, and Fatemeh Yousefbeyk; Drafting of the manuscript: Ehsan Zamani and Shadi Gholampour; Statistical analysis and supervision: Mehdi Evazalipour and Ehsan Zamani; Data collection, data analysis and critical revision: All authors.

Conflicts of interest

The authors declared no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors thank the Vic Chancellor for Research, Guilan University of Medical Sciences, and the Faculty of Pharmacy, [Guilan University of Medical Sciences](#), for their cooperation in conducting this study.



مقاله پژوهشی

بررسی اثر عصاره متانولی سرشاخه‌های هوایی مریم‌گلی خاردار (*Salvia spinosa* L) در پیشگیری از فرایند Senescence سلولی ناشی از پراکسید هیدروژن در سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش (NIH/3T3)

شادی غلام‌پور^۱، مهدی عوضعلی‌پور^۲، فاطمه یوسف‌بیک^۳، احسان زمانی^۱

۱. گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.

۲. گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.

۳. گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.

Use your device to scan and read the article online



Citation Gholampour Sh, Evazalipour M, Yousefbeyk F, Zamani E. [Evaluation of the Effect of Methanolic Extract of *Salvia spinosa* L. Aerial Parts in Preventing H₂O₂-induced Cellular Senescence in Mouse Embryonic Fibroblast Cells (NIH/3T3) (Persian)]. *Journal of Guilan University of Medical Sciences*. 2026; 34(4):346-359. <https://doi.org/10.32598/JGUMS.34.4.1676.3>

doi: <https://doi.org/10.32598/JGUMS.34.4.1676.3>

چکیده

زمینه: پیری و ناتوانی (Senescence) زودرس ناشی از استرس، به‌عنوان یکی از عوامل اصلی ایجادکننده پیری، فرایند غیرقابل‌برگشت تکثیر سلولی است که در پاسخ به عوامل استرس‌زا رخ می‌دهد. مطالعات نشان داده‌اند پراکسید هیدروژن با القای استرس اکسیداتیو سبب بروز پیری و ناتوانی سلولی می‌شود. گیاه مریم‌گلی خاردار (*Salvia spinosa* L) به‌واسطه ترکیبات فنولی و تریپنی به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی شناخته شده است.

هدف: در این مطالعه، اثر محافظتی عصاره متانولی سرشاخه‌های هوایی مریم‌گلی خاردار، به‌عنوان یک منبع آنتی‌اکسیدانی، در پیری و ناتوانی سلولی ناشی از پراکسید هیدروژن در سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش (NIH/3T3) مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: برای بررسی استرس اکسیداتیو سطوح مالون دی‌آلدهید، گلووتاتیون، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز اندازه‌گیری شد. برای ارزیابی فرایند پیری و ناتوانی، از روش کیفی رنگ‌آمیزی بتاگالاکتوزیداز استفاده شد.

یافته‌ها: استرس اکسیداتیو القا شده توسط پراکسید هیدروژن، سبب افزایش معنادار پراکسیداسیون لیپیدی ($P < 0.05$) و کاهش معنادار سطح گلووتاتیون ($P < 0.01$)، کاتالاز ($P < 0.05$) و سوپراکسید دیسموتاز ($P < 0.05$) شد. عصاره موجب کاهش معنادار پراکسیداسیون لیپیدی ($P < 0.01$) و افزایش معنادار سطح سوپراکسید دیسموتاز ($P < 0.05$) در گروه تحت تیمار با پراکسید هیدروژن شد. اما سطوح گلووتاتیون و کاتالاز در گروه تحت تیمار با عصاره و پراکسید هیدروژن نسبت به گروه پراکسید هیدروژن افزایش معناداری نداشتند. میزان فعالیت بتاگالاکتوزیداز در گروه پراکسید هیدروژن افزایش داشت. استفاده از عصاره، فعالیت بتاگالاکتوزیداز را نسبت به گروه پراکسید هیدروژن کاهش داد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد عصاره مریم‌گلی خاردار، به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان، می‌تواند اثرات محافظتی در پیشگیری از پیری و ناتوانی القا شده با استرس اکسیداتیو داشته باشد.

تاریخ دریافت: ۲۳ دی ۱۴۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۸ فروردین ۱۴۰۴

تاریخ انتشار: ۱۱ دی ۱۴۰۴

کلیدواژه‌ها:

مریم‌گلی خاردار، آنتی‌اکسیدانت، استرس اکسیداتیو، فیبروبلاست، پیری

* نویسنده مسئول:

دکتر احسان زمانی

نشانی: رشت، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دانشکده داروسازی، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی.

تلفن: ۳۳۴۸۶۴۷۷ (۱۳) ۰۹۸+

رایانامه: moc.liamg@6422inamaz



Copyright © 2026 The Author(s);

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-BY-NC: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode.en>), which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

مقدمه

پیری^۱ یک فرایند پیچیده است که بر جنبه‌های مولکولی، سلولی، بافتی و سیستمیک بدن انسان تأثیر می‌گذارد و در مجموع می‌تواند با گذشت زمان منجر به ظهور بیماری‌های مرتبط با افزایش سن شود [۱، ۲]. پیری و ناتوانی^۲ سلولی، به عنوان یکی از عوامل اصلی ایجادکننده پیری، فرایندی است که سلول به طور غیرقابل برگشت توانایی تکثیر خود را از دست می‌دهد [۳، ۴].

دو نوع پیری و ناتوانی سلولی وجود دارد: ۱. همانندسازی^۳ که ناشی از کوتاه شدن تلومرها است؛ ۲. زودرس القاشده توسط استرس^۴ که در اثر تجمع تولید رادیکال‌های آزاد، از جمله گونه‌های فعال اکسیژن^۵ رخ می‌دهد [۳]. رادیکال‌های آزاد به عنوان محصولات جانبی ناخواسته و سمی متابولیسم هوازی در نظر گرفته می‌شوند و به دلیل واکنش شیمیایی بالا منجر به آسیب اکسیداتیو به ماکرومولکول‌های سلولی مختلف می‌شوند [۵].

مطالعات حاکی از آن هستند که در میان عوامل مختلف استرس‌زا، استفاده از پراکسید هیدروژن^۶ به عنوان یکی از روش‌های رایج برای القای استرس اکسیداتیو محسوب می‌شود [۶]. پراکسید هیدروژن یک رادیکال آزاد نیست؛ زیرا الکترون‌های جفت‌نشده ندارد. اما رادیکال هیدروکسیل را در حضور یون‌های $+Fe^{2+}$ یا $+Cu^{2+}$ از طریق واکنش فنتون^۷ یا هابر - ویس^۸ تولید می‌کند. رادیکال هیدروکسیل بسیار واکنش‌پذیر است و به‌ویژه با فسفولیپیدهای غشای سلولی و پروتئین‌ها واکنش نشان می‌دهند [۷]. همچنین گزارش شده است که پراکسید هیدروژن با برانگیختن استرس اکسیداتیو و افزایش فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز^۹، موجب ایجاد پیری و ناتوانی زودرس در مدل‌های سلولی می‌شوند [۸].

به عدم تعادل بین رادیکال‌های آزاد و سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی حاصل از این عدم تعادل، استرس اکسیداتیو گفته می‌شود [۹]. یکی از کارآمدترین روش‌ها برای مقابله با استرس اکسیداتیو، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها است [۷]. آنتی‌اکسیدان‌ها مولکول‌های پایداری هستند که با اهدای یک الکترون به رادیکال‌های آزاد، آن‌ها را خنثی کرده و بدین ترتیب، ظرفیت تخریبی آن‌ها را کاهش می‌دهند. آنتی‌اکسیدان‌ها آسیب سلولی را به تأخیر انداخته و یا از ایجاد آن جلوگیری می‌کنند [۱۰].

آنتی‌اکسیدان‌ها در ۲ دسته درون‌زاد و برون‌زاد طبقه‌بندی می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌های درون‌زاد که توسط بدن تولید می‌شوند، مکانیسم دفاعی بدن در برابر استرس اکسیداتیو هستند. این آنتی‌اکسیدان‌ها را می‌توان براساس عملکرد بیولوژیکی خود در ۲ دسته آنزیمی (گلوکاتایون پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز) و غیر آنزیمی (گلوکاتایون، بیلی‌روبین، اسید اوریک، سرولوپلاسمین، ترانسفرین و کوآنزیم Q10) تقسیم کرد [۱۱]. منبع اصلی آنتی‌اکسیدان‌های برون‌زاد، از رژیم غذایی یا مکمل‌ها به دست می‌آیند و شامل عناصر معدنی مانند سلنیوم و روی، کاروتنوئیدها، ویتامین E، ویتامین C و مواد مغذی گیاهی هستند [۱۲].

بسیاری از گیاهان سرشار از آنتی‌اکسیدان‌هایی هستند که در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد نقش کلیدی ایفا می‌کنند و همچنین به تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی درون‌زاد بدن کمک می‌کنند. گیاهان متعلق به جنس مریم‌گلی (*Salvia*) که یکی از بزرگ‌ترین جنس‌های خانواده نعنائیان (*Lamiaceae*) هستند، به دلیل خواص دارویی، از دیرباز در طب سنتی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این جنس بیش از ۱۰۰۰ گونه در جهان دارد که ۶۱ گونه آن در ایران رویش دارد و از این میان، ۱۷ گونه از آن‌ها انحصاری ایران است [۱۳]. گونه *L. Salvia spinosa* با نام مریم‌گلی خاردار شناخته می‌شود [۱۴]. گیاه مریم‌گلی خاردار به طور سنتی به عنوان یک داروی گیاهی برای مشکلاتی نظیر اسهال، اختلالات ادراری و دردهای قفسه سینه و معده به کار می‌رود [۱۵]. تحقیقات نشان داده‌اند گونه‌های مختلف مریم‌گلی سرشار از ترکیبات زیست‌فعال متنوعی نظیر مونوترپن‌ها^{۱۰}، دی‌ترپن‌ها^{۱۱}، تری‌ترپن‌ها^{۱۲}، سزکویی‌ترپن‌ها^{۱۳} و فنولیک‌ها^{۱۴} هستند [۱۶]. در همین راستا با وجود این ترکیبات فیتوکمیکال^{۱۵}، فعالیت‌های زیستی گسترده‌ای مانند خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدتکثیر سلولی، ضدکولین استراز، ضدالتهاب، ضدویروسی، ضد میکروبی، ضد دیابتی، ضد مالاریا و ضد آلزایمر از این جنس گزارش شده است. علاوه بر این تحقیقات نشان داده‌اند گیاه مریم‌گلی خاردار نیز حاوی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی (آپی‌ژنین و لوتئین) و همچنین مقادیر بالایی از آلفا - ترپینولن است. از آنجایی که اغلب بین محتوای ترکیبات فنولی و ترپنوئیدی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی ارتباط مستقیم وجود دارد، خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی از این گونه در پیشگیری از بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو گزارش شده است [۱۳، ۱۷-۲۱].

10. Monoterpenes
11. Diterpenes
12. Triterpenes
13. Sesterpenoids
14. Phenolics
15. Phytochemicals

1. Aging
2. Senescence
3. Replicative Senescence 4 (RS)
4. Stress Induced Premature Senescence 5 (SIPS)
5. Reactive Oxygen Species (ROS)
6. Hydrogen Peroxidase (H_2O_2)
7. Fenton
8. Haber-Weiss
9. β -galactosidase

از سومین پاساژ، سلول‌های تکثیر یافته در فلاسک به پلیت‌های ۶ خانه (برای سنجش استرس اکسیداتیو و پیری و ناتوانی سلولی) منتقل شدند.

نمونه‌های آزمایشگاهی به صورت گروه‌های کنترل (سلول‌های NIH / 3T3 در محیط کشت DMEM-HG در تماس با حلال PBS)، گروه پراکسید هیدروژن (تیمار سلول‌های NIH / 3T3 با پراکسید هیدروژن با غلظت ۴۰۰ میکرومولار^{۲۱} به مدت ۲ ساعت) [۲۲] و گروه عصاره به همراه پراکسید هیدروژن (تیمار سلول‌های NIH / 3T3 با غلظت مؤثر عصاره متانولی سرشاخه‌های هوایی مریم‌گلی خاردار (IC₅₀ DPPH = ۸۰ μg) و پراکسید هیدروژن با غلظت ۴۰۰ میکرومولار) طبقه‌بندی شدند. گروه دریافت‌کننده عصاره به مدت ۲۴ ساعت در تماس با عصاره قرار گرفت. پس از آن، محیط کشت حاوی عصاره خارج شد و به مدت ۲ ساعت با پراکسید هیدروژن تیمار شد (IC₅₀ در تست DPPH، غلظتی از عصاره است که برای به دام اندازی ۵۰ درصد رادیکال آزاد DPPH نیاز است). در این مطالعه از غلظتی که طبق مطالعات قبلی محاسبه شده بود، استفاده شد [۲۳].

بررسی میزان پیری و ناتوانی در سلول‌ها

شناسایی کیفی فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز

یکی از بیومارکرهای پیری و ناتوانی سلولی، افزایش سطح آنزیم بتاگالاکتوزیداز است. در محیط کشت و بافت‌های پستانداران، می‌توان پیری و ناتوانی در سلول‌ها را توسط فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز در pH ۶ شناسایی کرد [۲۴]. در این تست، ابتدا نمونه سلول‌های تهیه شده با استفاده از بافر فسفات سالین برای ۲ بار شست‌وشو داده شدند و سپس محلول تثبیت‌کننده (۲۰ درصد فرمالدئید^{۲۲} ۲ درصد گلو تار آلدئید^{۲۳}) به آن اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. در مرحله بعد، محلول تثبیت‌کننده خارج شده و سلول‌ها ۲ بار با بافر فسفات سالین مشابه مرحله قبل شست‌وشو داده شدند. محلول رنگ‌آمیزی اضافه و سلول‌ها به مدت ۱۲ تا ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون^{۲۴}، سلول‌ها با بافر فسفات سالین (۲ مرتبه) و سپس با متانول (۱ مرتبه) شست‌وشو شدند. در نهایت، پلیت در مجاورت هوای محیط خشک شد. گروه‌ها با استفاده از میکروسکوپ اینورت مورد بررسی قرار گرفتند و به صورت تصادفی از بخش‌های مختلف هر چاهک عکس‌برداری شد (بزرگ‌نمایی: ×۴۰۰). مشاهده رنگ آبی تأییدکننده پیری و ناتوانی سلولی است [۲۵].

براین اساس، مطالعه حاضر با توجه به اهمیت گیاهان دارویی در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها و همچنین توجه به نقش گیاهان به عنوان منبعی مهم از آنتی‌اکسیدان‌ها، به بررسی اثر محافظتی عصاره متانولی سرشاخه‌های هوایی مریم‌گلی خاردار، به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در پیشگیری از فرایند پیری و ناتوانی سلولی در محیط برون‌تن، بر روی رده سلولی NIH/3T3 پرداخته است.

روش‌ها

مواد شیمیایی

محیط کشت DMEM و بافر PBS (تهیه شده از شرکت ایده زیست نو ترکیب، ایران)، دی متیل فراماید (تهیه شده از شرکت سیگما، سنت لوئیس)، فرمالدهید، گلو تار آلدهید، پتاسیم هگزاسیانوفرات، سیتریک اسید، سدیم فسفات، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، دی سدیم هیدروژن فسفات، پراکسید هیدروژن، دی متیل سولفوکسید^{۱۶} و این - بوتانول (تهیه شده از شرکت Merck، آلمان)، کیت رنگ‌سنجی^{۱۷}، کیت سنجش گلو تاتیون^{۱۸} و کیت سنجش سوپراکسید دیسموتاز^{۱۹} (تهیه شده از شرکت ZellBio، آلمان).

روش تهیه عصاره متانولی گیاه مریم‌گلی خاردار

گیاه مریم‌گلی خاردار از رستم‌آباد گیلان، شمال ایران، جمع‌آوری شد. پس از شناسایی، در هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی گیلان با کد HGUM 112 نگهداری شد. سرشاخه‌های هوایی مریم‌گلی خاردار در برابر جریان هوا و به دور از نور مستقیم آفتاب خشک و سپس با آسیاب برقی خرد شدند. سپس عصاره‌گیری با مقدار معینی از پودر آسیاب شده گیاه (۵۰۰ گرم) به روش پرکولاسیون برای ۴۸ و ۷۲ ساعت با متانول انجام شد و حلال به دست آمده توسط دستگاه تقطیرکننده چرخان تبخیر شد. عصاره بعد از خشک شدن کامل در ظرف شیشه‌ای در بسته در یخچال نگهداری شد.

کشت سلولی

در این پژوهش از سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش استفاده شد. این سلول‌ها در همه ارگان‌های حیوان یافت می‌شود. سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش رده سلولی NIH / 3T3 از انستیتو پاستور ایران (ATCC Number: RL 1658) تهیه شد. این سلول‌ها در محیط کشت سلولی DMEM-HG^{۲۰} و انکوباتور با دمای ۳۷ درجه و دی اکسید کربن ۵ درصد تکثیر شدند. پس

21. Micromolar
22. Formaldehyde
23. Glutaraldehyde
24. Incubation

16. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
17. Catalase (CAT)
18. Glutathione
19. Superoxide Dismutase
20. DMEM-HG: Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose

اندازه‌گیری پارامترهای مرتبط با استرس اکسیداتیو

ارزیابی لیپید پراکسیداسیون^{۲۵} (سنجش مالون دی‌آلدید)^{۲۶}

پراکسیداسیون لیپیدی نوعی تخریب اکسیداسیونی است که حاصل حمله رادیکال‌های آزاد به اسیدهای چرب غیراشباع است. برای بررسی میزان آسیب اکسیداتیو به غشاهای لیپیدی، غلظت محصول نهایی لیپید پراکسیداسیون، یعنی مالون دی‌آلدید، از طریق روش تیوباربتوریک اسید^{۲۷} مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش، نمونه سلول‌های تهیه‌شده هموزن و با ۲۰۰ میکرولیتر اسید فسفریک و ۲۵ میکرولیتر از معرف تیوباربتوریک اسید مخلوط شدند و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شدند. سپس ۴۰۰ میکرولیتر آن - بوتانول به آن‌ها اضافه شد و با دور ۳۵۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در نهایت، میزان جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت‌ریدر^{۲۸} خوانده شد. همچنین تترامتوکسی پروپان به‌عنوان استاندارد برای سنجش غلظت مالون دی‌آلدید استفاده شد [۲۶].

اندازه‌گیری محتوای گلوکاتایون

گلوکاتایون یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌ها و همچنین کوفاکتور در متابولیسم بسیاری از مواد مختلف محسوب می‌شود. تولید بیش‌ازحد رادیکال‌های آزاد می‌تواند منجر به کاهش سطح گلوکاتایون احیا و یا تجمع گلوکاتایون اکسید در سلول شود و چنانچه به هر دلیلی سطح آن در سلول کاهش یابد، نشان‌دهنده بروز آسیب اکسیداتیو در سلول است [۲۷]. در پژوهش حاضر، اندازه‌گیری محتوای گلوکاتایون با استفاده از پروتکل کیت رنگ‌سنجی (CAT) (ZellBio GmbH, Ulm, Germany) (NO. ZB-GSH-96) انجام شد و در نهایت میزان جذب در طول موج ۴۱۲ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌ریدر خوانده شد [۲۸].

اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز

کاتالاز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که تقریباً در تمام موجودات هوازی که در معرض اکسیژن قرار می‌گیرند، وجود دارد. کاتالاز ۲ مولکول پراکسید هیدروژن را در یک واکنش دو مرحله‌ای به ۱ مولکول اکسیژن و ۲ مولکول آب تجزیه می‌کند [۲۹]. در پژوهش حاضر، برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از پروتکل کیت (CAT) (ZellBio GmbH, Ulm, Germany) (NO. ZB-CAT-96) استفاده شد و جذب آن در ۴۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌ریدر خوانده شد [۳۰].

25. Lipid peroxidation
26. MDA
27. TBA
28. EpochTM Microplate Spectrophotometer, Biotec, USA

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

سوپراکسید دیسموتازها گروهی از متالوآنزیم‌ها هستند که در تمام موجودات یافت می‌شوند و تجزیه آنیون سوپراکسید را به اکسیژن و پراکسید هیدروژن کاتالیز می‌کنند [۳۱]. در پژوهش حاضر، برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از پروتکل کیت (SOD) (ZellBio GmbH, Ulm, Germany) (CAT NO. ZB-SOD-96) استفاده شد و جذب آن در ۴۲۰ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت‌ریدر خوانده شد [۳۲].

تحلیل آماری

نتایج برحسب میانگین $\pm$ انحراف معیار حاصل از ۳ بار تکرار آزمایش گزارش شد. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸ انجام شد. تجزیه و تحلیل با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی انجام شد. سطح معناداری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

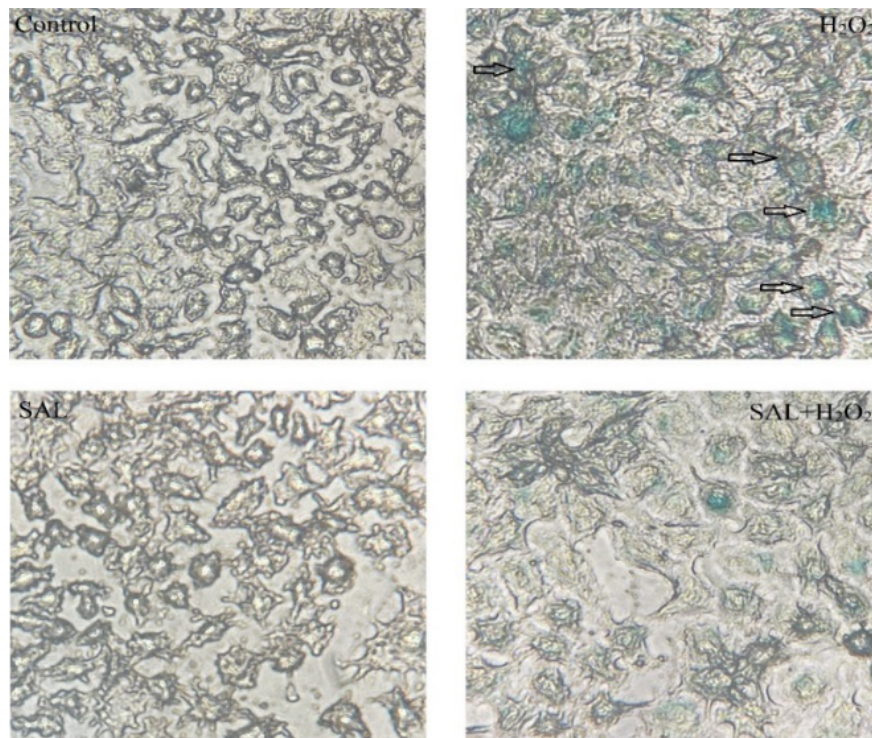
یافته‌ها

نتایج ارزیابی میزان بروز Senescence در سلول‌ها

همان‌طور که گفته شد، فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز یکی از نشانگرهای مهم در سنجش میزان Senescence سلولی است. باتوجه به تصویر شماره ۱ در نتیجه رنگ‌آمیزی، توسعه رنگ آبی در سلول‌های تیمار شده با پراکسید هیدروژن (مشخص شده با فلش توخالی) بیشتر از سایر گروه‌ها مشاهده شد که نشانگر افزایش سطح بتاگالاکتوزیداز است. از طرف دیگر، گروه سلول‌های تیمار شده با پراکسید هیدروژن و عصاره، موجب کاهش توسعه رنگ آبی و در نتیجه کاهش سطح فعالیت بتاگالاکتوزیداز شد. از این نتایج می‌توان استنباط کرد پراکسید هیدروژن سبب بروز Senescence در سلول‌ها شده و استفاده از عصاره سبب کاهش بروز Senescence در سلول‌ها شده است (تصویر شماره ۱).

نتایج ارزیابی لیپید پراکسیداسیون (سنجش مالون دی‌آلدید)

تصویر شماره ۲ بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدی را در گروه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد. باتوجه به تصویر شماره ۲، غلظت مالون دی‌آلدید در گروه پراکسید هیدروژن نسبت به گروه کنترل به‌طور معناداری ($P < 0.05$) افزایش یافته است. علاوه بر این، غلظت این ماده در گروه پراکسید هیدروژن و عصاره نسبت به گروه پراکسید هیدروژن کاهش معناداری ($P < 0.01$) داشت. باتوجه به یافته‌های این سنجش، می‌توان نتیجه گرفت پراکسید هیدروژن از طریق القای استرس اکسیداتیو سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی در سلول‌ها و در نتیجه افزایش سطح مالون دی‌آلدید شده است. همچنین استفاده از عصاره به‌طور معناداری پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش داده و با اثرات پراکسید هیدروژن مقابله کرده است (تصویر شماره ۲).



تصویر ۱

تصویر ۱. رنگ آمیزی آنزیم بتاگالاکتوزیداز در سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش در pH ۶ فلش‌های توخالی نشان‌دهنده فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز در سلول‌های دچار Senescence در گروه‌های تحت تیمار با پراکسید هیدروژن است.

نتایج اندازه‌گیری محتوای گلوکاتینون

یکی دیگر از پارامترهای مورد ارزیابی در این مطالعه، سطح گلوکاتینون سلولی در سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش بوده است. **تصویر شماره ۳**، سطح گلوکاتینون را در گروه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد. براساس این تصویر، سطح گلوکاتینون سلولی در گروه تحت تیمار با پراکسید هیدروژن به‌طور معناداری ($P < 0.01$) نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. در گروه تحت تیمار با پراکسید هیدروژن و عصاره، سطح گلوکاتینون سلولی نسبت به گروه پراکسید هیدروژن افزایش معناداری نداشت. باتوجه به نتایج، پراکسید هیدروژن با القای استرس اکسیداتیو، سطح گلوکاتینون به فرم احیا را کاهش داده است. باین‌حال استفاده از عصاره نتوانسته به‌صورت معنادار سطح گلوکاتینون را افزایش دهد و با اثرات پراکسید هیدروژن مقابله کند (**تصویر شماره ۳**).

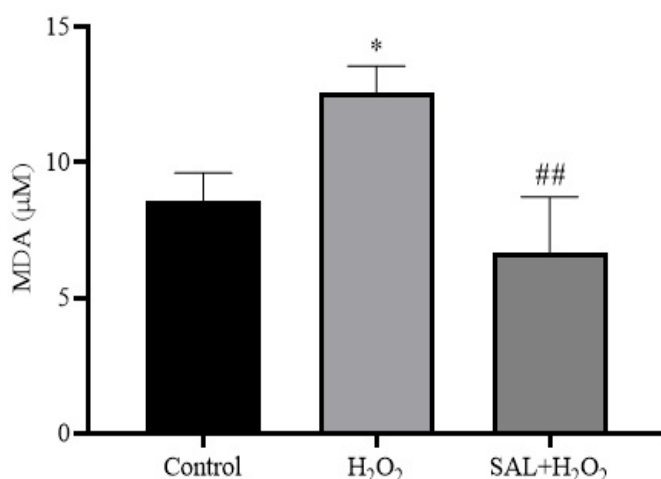
نتایج اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز

در مطالعه حاضر، سطح آنزیم کاتالاز مورد بررسی قرار گرفت. **تصویر شماره ۴** سطح آنزیم کاتالاز را در گروه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد. براساس یافته‌های این تصویر، سطح آنزیم کاتالاز در گروه تحت تیمار با پراکسید هیدروژن به‌طور معناداری ($P < 0.05$) نسبت به گروه کنترل کاهش داشت. در گروه تحت

تیمار با پراکسید هیدروژن و عصاره، سطح آنزیم نسبت به گروه پراکسید هیدروژن افزایش معناداری نداشت. باتوجه به نتایج، پراکسید هیدروژن به‌واسطه افزایش میزان استرس اکسیداتیو، سطح آنزیم کاتالاز را کاهش داده است. باین‌حال استفاده از عصاره نتوانسته به‌طور معنادار سطح کاتالاز را افزایش دهد و از این طریق از ایجاد استرس اکسیداتیو جلوگیری کند (**تصویر شماره ۳**).

نتایج اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

در مطالعه حاضر، سطح آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز سنجش شد. **تصویر شماره ۵**، سطح آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را در گروه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد. باتوجه به تصویر، سطح سوپراکسید دیسموتاز در گروه تحت تیمار با پراکسید هیدروژن به‌طور معناداری ($P < 0.05$) نسبت به گروه کنترل کاهش داشت. در مقابل، سطح سوپراکسید دیسموتاز در گروه تحت تیمار با عصاره و پراکسید هیدروژن، در مقایسه با گروه پراکسید هیدروژن افزایش معناداری ($P < 0.05$) نشان داد. از یافته‌های فوق می‌توان نتیجه گرفت عصاره گیاه به‌واسطه افزایش سطح آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، موجب کاهش استرس اکسیداتیو می‌شود (**تصویر شماره ۵**).



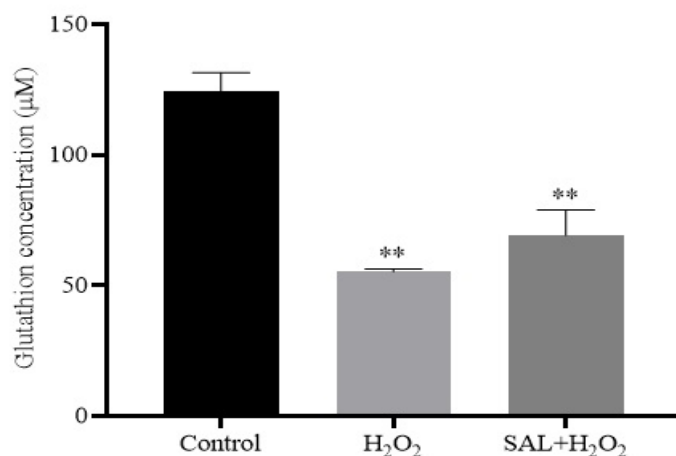
مجله دانشگاه علوم پزشکی کیران

تصویر ۲. نمودار بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدی در سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش در گروه‌های مورد مطالعه. داده‌ها به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین بیان شده است. *: اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل ($P < 0.05$). ##: اختلاف معنادار نسبت به گروه پراکسید هیدروژن ($P < 0.01$). SAL: عصاره متانولی مریم‌گلی خاردار ($80 \mu\text{g. ml}^{-1}$). H₂O₂: پراکسید هیدروژن (400 میکرومولار).

بحث

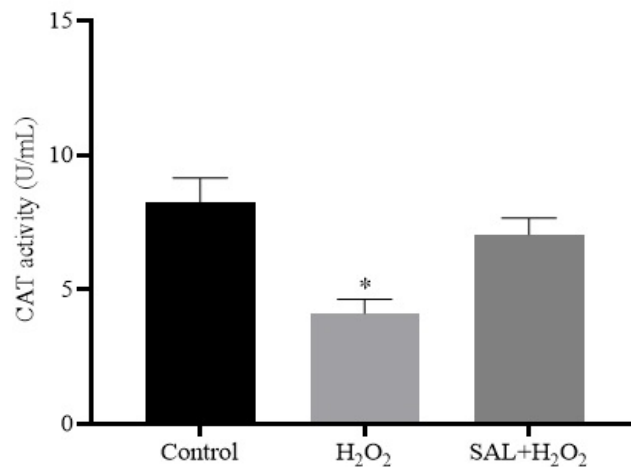
آنزیم بتاگالاکتوزیداز یکی از رایج‌ترین نشانگرهای تشخیص پیری و ناتوانی سلولی است [۳۴]. در مطالعه حاضر، نتایج نشان داد فعالیت این آنزیم در سلول‌های تحت تیمار با پراکسید هیدروژن افزایش یافته و در این گروه، بیشترین میزان توسعه رنگ آبی مشاهده شد. همچنین گروه‌های تحت تیمار با عصاره متانولی گیاه مریم‌گلی خاردار با کاهش فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز از بروز پیری و ناتوانی سلولی جلوگیری کردند. در مطالعه دوان و همکاران، فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز در پیری و ناتوانی سلولی مورد بررسی قرار گرفته و مشخص شده است که پراکسید هیدروژن ($100 - 200$ میلی‌مولار) فعالیت این آنزیم و القای پیری و ناتوانی در سلول‌های دیپلوئید انسانی (2B2) را افزایش می‌دهد [۳۵]. همچنین در مطالعه‌ای بر روی گونه‌ای دیگر از جنس مریم‌گلی (*Salvia aurea* L) نشان داده شد

پیری یک فرایند پیچیده و چندوجهی است که با کاهش تدریجی عملکرد اندام‌ها و افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های مرتبط با افزایش سن و مرگ‌ومیر همراه است [۳۳]. یکی از بارزترین نشانه‌های پیری، پیری و ناتوانی سلولی زودرس ناشی از عوامل استرس‌زا است [۳]. این مطالعه نشان داد پراکسید هیدروژن یک القاکننده برون‌زای پیری و ناتوانی سلولی در سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش (NIH / 3T3) است. همچنین نتایج نشان داد عصاره متانولی گیاه مریم‌گلی خاردار با خواص آنتی‌اکسیدانی، ضمن کاهش فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز، کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، بروز پیری و ناتوانی سلولی را کاهش داد.



مجله دانشگاه علوم پزشکی کیران

تصویر ۳. نمودار بررسی سطح گلووتاتیون در سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش در گروه‌های مورد مطالعه. داده‌ها به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین بیان شده است. **: اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل ($P < 0.01$). SAL: عصاره متانولی مریم‌گلی خاردار ($80 \mu\text{g. ml}^{-1}$). H₂O₂: پراکسید هیدروژن (400 میکرومولار).



مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

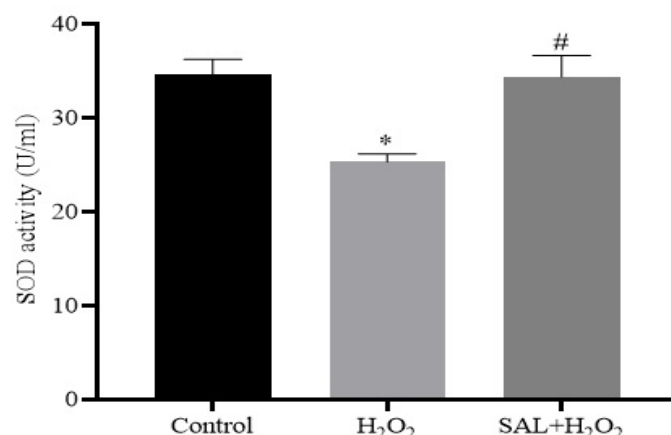
تصویر ۴. نمودار بررسی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش در گروه‌های مورد مطالعه. داده‌ها به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین بیان شده است. *: اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل ($P < 0.05$). SAL: عصاره متانولی مریم‌گلی خاردار ($80 \mu\text{g. ml}^{-1}$). H₂O₂: پراکسید هیدروژن ($400 \mu\text{g. ml}^{-1}$).

پراکسیداسیون لیپید، نقش مهمی در افزایش استرس اکسیداتیو در مغز موش‌های مسن ایفا می‌کنند [۴۰]. یافته‌های حاصل از مطالعات مذکور نشان دادند استرس اکسیداتیو نقش مهمی در بروز پیری دارد. همچنین در مطالعه حاضر نشان داده شد پراکسید هیدروژن به عنوان یک مدل از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو منجر به بروز پیری و ناتوانی سلولی می‌شود که یکی از عوامل مهم در ایجاد پیری است.

مطالعات نشان داده‌اند گیاهان منبع غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان هستند و می‌توانند نقش مهمی در پیشگیری از پیری و ناتوانی سلولی و محافظت از سلامتی داشته باشند [۴۱]. گونه‌های مختلف مریم‌گلی منابع فیتوکمیکال‌های تقویت‌کننده سلامتی با خواص آنتی‌اکسیدانی هستند و از بروز پیری و بیماری‌های وابسته به سن جلوگیری می‌کنند. [۱۶] در طی

این گیاه از طریق کاهش فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز، پتانسیل پیشگیری از Senescence سلولی در سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش (NIH/3T3) را دارد [۳۶]. نتایج این پژوهش‌ها با مطالعه حاضر همسو بودند.

عوامل مختلفی در بروز فرایند پیری و ناتوانی سلولی نقش دارند که یکی از مهم‌ترین آن‌ها استرس اکسیداتیو است [۳۷]. در طول سال‌ها، مطالعات متعددی به بررسی نقش استرس اکسیداتیو در بروز فرایند پیری و ناتوانی پرداخته‌اند که آسیب‌های مرتبط با سن را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۳۸]. در یک تحقیق بر بافت موش‌های صحرایی نر نشان دادند افزایش سن منجر به کاهش سطوح گلوتاتیون و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود [۳۹]. در مطالعه‌ای دیگر، مو جی کیو و همکاران نشان دادند رادیکال‌های آزاد با کاهش آنزیم‌های اکسیداتیو و همچنین افزایش



مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تصویر ۵. نمودار بررسی میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش در گروه‌های مورد مطالعه. داده‌ها به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین بیان شده است. *: اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل ($P < 0.05$). #: اختلاف معنادار نسبت به گروه پراکسید هیدروژن ($P < 0.05$). SAL: عصاره متانولی مریم‌گلی خاردار ($80 \mu\text{g. ml}^{-1}$). H₂O₂: پراکسید هیدروژن ($400 \mu\text{g. ml}^{-1}$).

نتیجه‌گیری

قرار گرفتن رده سلولی NIH / 3T3 در معرض پراکسید هیدروژن به واسطه القای استرس اکسیداتیو موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز) و گلوتاتیون و همچنین افزایش سطح پراکسیداسیون لیپید (مالون دی‌آلدهید) و در نتیجه بروز Senescence سلولی می‌شود. تیمار سلول‌های مورد مطالعه با عصاره متانولی گیاه مریم‌گلی خاردار با کاهش معنادار سطح پراکسیداسیون لیپید (مالون دی‌آلدهید) و افزایش معنادار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز منجر به کاهش استرس اکسیداتیو و در نتیجه کاهش بروز Senescence شد. اما عصاره گیاه مورد مطالعه تغییر معناداری در سطح پارامترهای گلوتاتیون و آنزیم کاتالاز نداشتند. در نتیجه این مطالعه، عصاره متانولی گیاه مریم‌گلی خاردار، به‌عنوان یک منبع مهم آنتی‌اکسیدان، از طریق مهار برخی از مسیرهای دخیل در استرس اکسیداتیو، می‌تواند موجب کاهش بروز Senescence شود. برای دستیابی به نتایج بهتر، استفاده از دامنه‌ای از غلظت‌های عصاره گیاه، بررسی اثرات سمی عصاره گیاه و همچنین بررسی سایر مکانیسم‌های دخیل در ایجاد پیری، در مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی گیلان با کد اخلاق (IR.GUMS.REC.1402.450) تصویب شد.

حامی مالی

این تحقیق هیچ‌گونه کمک مالی از سازمان‌های تأمین مالی در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرد.

مشارکت‌نویسندگان

مفهوم‌سازی: احسان زمانی، مهدی عوضعلی‌پور، فاطمه یوسف بیک؛ تحقیق و بررسی: احسان زمانی، مهدی عوضعلی‌پور، فاطمه یوسف بیک، شادی غلام‌پور؛ نگارش پیش‌نویس: احسان زمانی، مهدی عوضعلی‌پور، فاطمه یوسف بیک، شادی غلام‌پور؛ ویراستاری و نهایی‌سازی نوشته: احسان زمانی، مهدی عوضعلی‌پور؛ اعتبارسنجی: احسان زمانی، مهدی عوضعلی‌پور؛ بصری‌سازی: احسان زمانی، شادی غلام‌پور؛ مدیریت پروژه: احسان زمانی، مهدی عوضعلی‌پور؛ ویراستاری و نهایی‌سازی نوشته: احسان زمانی، مهدی عوضعلی‌پور؛ تحلیل تحقیق و بررسی: مهدی عوضعلی‌پور، احسان زمانی، شادی غلام‌پور.

مطالعات، بهادری و همکاران به اثرات آنتی‌اکسیدانی گیاهان از جنس مریم‌گلی، به‌ویژه عصاره متانولی گیاه مریم‌گلی خاردار، به دلیل محتوای بالای فنول و فلاونوئید اشاره کردند [۱۳]. [۴۲]. در مطالعه حاضر، عصاره گیاه مریم‌گلی خاردار با خواص آنتی‌اکسیدانی، به‌طور معناداری میزان پراکسیداسیون لیپید را کاهش و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را به‌طور معناداری افزایش داد. این تغییرات منجر به کاهش بروز Senescence شد. همچنین در مطالعه کیم و همکاران بر رده سلولی ماکروفاژ (RAW ۲۶۴.۷) نشان داده شد یک فنول استخراج‌شده از گیاه *Salvia plebeia* با اثر آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را به‌صورت معنادار افزایش می‌دهد و از بروز التهاب جلوگیری می‌کند [۴۳]. جشان و همکاران نیز به این نتیجه رسیدند گیاه مریم‌گلی خاردار با اثر آنتی‌اکسیدانی، باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و اکسیداسیون گلوتاتیون می‌شود و اثر محافظتی بر نفروپاتی موش‌های دیابتی دارد [۱۸].

در مطالعه‌ای دیگر جدیدی و همکارانش نشان دادند عصاره جوشانده برگ *Salvia officinalis*^{۲۹} موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی، افزایش سطح گلوتاتیون و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، مانند سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز شده و از این طریق از آسیب‌های کبدی و کلیوی ناشی از استرس اکسیداتیو در موش‌ها جلوگیری می‌کند [۴۴]. همچنین در مطالعه فولاد و همکاران مشخص شد عصاره گیاه *Salvia sahendica* با اثرات آنتی‌اکسیدانی خود، با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و همچنین سطح گلوتاتیون و کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدی، می‌تواند از آپوپتوز ناشی از بتا‌آمیلوئید در هیپوکامپ موش جلوگیری کرده و بروز بیماری آلزایمر را کاهش دهد [۴۵]. در مطالعه یو و همکاران نیز مشخص شده است گیاه *Salvia miltiorrhiza* با اثرات آنتی‌اکسیدانی، باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز می‌شود و به‌طور قابل توجهی سمیت قلبی و کبدی ناشی از آدریامایسین را کاهش می‌دهد [۴۶].

نتایج بررسی میزان پراکسیداسیون لیپید و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در مطالعه حاضر با سایر مطالعات همسو بودند. با این حال نتایج حاصل از بررسی سطح گلوتاتیون و کاتالاز در پژوهش‌های فوق با مطالعه حاضر مغایرت داشت. علل احتمالی آن می‌تواند ناشی از تفاوت در گونه گیاه مورد مطالعه، ترکیبات فعال عصاره‌ها، رده سلولی به کار رفته و همچنین تفاوت در شرایط انجام تست‌ها به‌صورت درون تن و برون تن باشد.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از حمایت معاونت تحقیقات **دانشگاه علوم پزشکی گیلان** و دانشکده داروسازی گیلان که در این پژوهش ما را همراهی کردند، تشکر و قدردانی کنند.

References

- [1] Keilich SR, Bartley JM, Haynes L. Diminished immune responses with aging predispose older adults to common and uncommon influenza complications. *Cellular Immunology*. 2019; 345:103992. [DOI:10.1016/j.cellimm.2019.103992] [PMID]
- [2] Bartleson JM, Radenkovic D, Covarrubias AJ, Furman D, Winer DA, Verdin E. SARS-CoV-2, COVID-19 and the ageing immune system. *Nature Aging*. 2021; 1(9):769-82. [DOI:10.1038/s43587-021-00114-7] [PMID]
- [3] Silwal P, Nguyen-Thai AM, Mohammad HA, Wang Y, Robbins PD, Lee JY, et al. Cellular senescence in intervertebral disc aging and degeneration: Molecular mechanisms and potential therapeutic opportunities. *Biomolecules*. 2023; 13(4):686. [DOI:10.3390/biom13040686] [PMID]
- [4] Xu J, Shao T, Lou J, Zhang J, Xia C. Aging, cell senescence, the pathogenesis and targeted therapies of intervertebral disc degeneration. *Frontiers in Pharmacology*. 2023; 14:1172920. [DOI:10.3389/fphar.2023.1172920] [PMID]
- [5] Bratic A, Larsson NG. The role of mitochondria in aging. *The Journal of Clinical Investigation*. 2013; 123(3):951-7. [DOI:10.1172/jci64125] [PMID]
- [6] Savvidou MG, Georgiopoulou I, Antoniou N, Tzima S, Kontou M, Louli V, et al. Extracts from *Chlorella vulgaris* protect mesenchymal stromal cells from oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Plants*. 2023; 12(2):361. [DOI:10.3390/plants12020361] [PMID]
- [7] Pieńkowska N, Bartosz G, Pichla M, Grzesik-Pietrasiewicz M, Gruchala M, Sadowska-Bartos I. Effect of antioxidants on the H₂O₂-induced premature senescence of human fibroblasts. *Aging*. 2020; 12(2):1910-27. [DOI:10.18632/aging.102730] [PMID]
- [8] Wang Z, Wei D, Xiao H. Methods of cellular senescence induction using oxidative stress. *Methods in Molecular Biology*. 2013; 1048:135-44. [DOI:10.1007/978-1-62703-556-9_11] [PMID]
- [9] Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2011; 25(3):287-99. [DOI:10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016] [PMID]
- [10] Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*. 2010; 4(8):118-26. [DOI:10.4103/0973-7847.70902] [PMID]
- [11] Warraich UE, Hussain F, Kayani HUR. Aging - oxidative stress, antioxidants and computational modeling. *Heliyon*. 2020; 6(5):e04107. [DOI:10.1016/j.heliyon.2020.e04107] [PMID]
- [12] Korczowska-Łącka I, Słowikowski B, Piekut T, Hurła M, Banaszek N, Szymanowicz O, et al. Disorders of endogenous and exogenous antioxidants in neurological diseases. *Antioxidants*. 2023; 12(10):1811. [DOI:10.3390/antiox12101811] [PMID]
- [13] Bahadori MB, Valizadeh H, Asghari B, Dinparast L, Farimani MM, Bahadori S. Chemical composition and antimicrobial, cytotoxicity, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Salvia spinosa* L. *Journal of Functional Foods*. 2015; 18:727-36. [DOI:10.1016/j.jff.2015.09.011]
- [14] Mozaffarian V. [A dictionary of Iranian plant names (Persian)]. Tehran: Farhang Moaser, 1996. [Link]
- [15] Flamini G, Cioni PL, Morelli I, Bader A. Essential oils of the aerial parts of three *Salvia* species from Jordan: *Salvia lanigera*, *S. spinosa* and *S. syriaca*. *Food Chemistry*. 2007; 100(2):732-5. [DOI:10.1016/j.foodchem.2005.10.032]
- [16] Iacopetta D, Ceramella J, Scumaci D, Catalano A, Sinicropi MS, Tundis R, et al. An update on recent studies focusing on the antioxidant properties of *salvia* species. *Antioxidants*. 2023; 12(12):2106. [DOI:10.3390/antiox12122106] [PMID]
- [17] Bahadori MB, Dinparast L, Zengin G, Sarikurkcü C, Bahadori S, Asghari B, et al. Functional components, antidiabetic, anti-Alzheimer's disease, and antioxidant activities of *Salvia syriaca* L. *International Journal of Food Properties*. 2017; 20(8):1761-72. [DOI:10.1080/10942912.2016.1218893]
- [18] Jeshan M, Yousefbeyk F, Rahmati H, Hosein Shoormeij A, Rezazadeh M, Zamani E. *Salvia spinosa* L. Protects against Diabetes-Induced Nephropathy by Attenuation of Mitochondrial Oxidative Damage in Mice. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*. 2021; 2021:4657514. [DOI:10.1155/2021/4657514] [PMID]
- [19] Miura K, Kikuzaki H, Nakatani N. Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50(7):1845-51. [DOI:10.1021/jf011314o] [PMID]
- [20] Xiang X, Cai HD, Su SL, Dai XX, Zhu Y, Guo JM, et al. *Salvia miltiorrhiza* protects against diabetic nephropathy through metabolome regulation and wnt/ β -catenin and TGF- β signaling inhibition. *Pharmacological Research*. 2019; 139:26-40. [DOI:10.1016/j.phrs.2018.10.030] [PMID]
- [21] Farhadi F, Sahebkar A, Eghbali S. Chemical composition and biological activity of the essential oils of three *Salvia* species from South Khorasan: *Salvia macrosiphon* Boiss., *Salvia spinosa* L., and *Salvia sharifii* Rech. f. & Esfand. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2023; 26(3):695-704. [DOI:10.1080/0972060X.2023.2234418]
- [22] Baeeri M, Mohammadi-Nejad S, Rahimifard M, Navaei-Nigjeh M, Moeini-Nodeh S, Khorasani R, et al. Molecular and biochemical evidence on the protective role of ellagic acid and silybin against oxidative stress-induced cellular aging. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2018; 441(1-2):21-33. [DOI:10.1007/s11010-017-3172-0] [PMID]
- [23] Motavallian A, Yousefbeyk F, Shoormeij A, Jeshan M, Rahmati H, Evazalipour M, et al. The therapeutic effect of *Salvia spinosa* on diabetic neuropathy induced by STZ via attenuation of the oxidative pathway. *Comparative Clinical Pathology*. 2023; 32(2):201-9. [DOI:10.1007/s00580-022-03426-1]
- [24] Tomizawa M, Tsumaki K, Sone M. Characterization of the activity of β -galactosidase from *Escherichia coli* and *Drosophila melanogaster* in fixed and non-fixed *Drosophila* tissues. *Biochimie Open*. 2016; 3:1-7. [DOI:10.1016/j.bioopen.2016.06.001] [PMID]

- [25] Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature Protocols*. 2009; 4(12):1798-806. [DOI:10.1038/nprot.2009.191] [PMID]
- [26] Shokrzadeh M, Zamani E, Mehrzad M, Norian Y, Shaki F. Protective effects of propofol against methamphetamine-induced neurotoxicity. *Toxicology International*. 2015; 22(1):92-9. [DOI:10.4103/0971-6580.172250] [PMID]
- [27] Santacroce G, Gentile A, Soriano S, Novelli A, Lenti MV, Di Sabatino A. Glutathione: Pharmacological aspects and implications for clinical use in non-alcoholic fatty liver disease. *Frontiers in Medicine*. 2023; 10:1124275. [DOI:10.3389/fmed.2023.1124275] [PMID]
- [28] Zamani E, Shaki F, AbedianKenari S, Shokrzadeh M. Acrylamide induces immunotoxicity through reactive oxygen species production and caspase-dependent apoptosis in mice splenocytes via the mitochondria-dependent signaling pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017; 94:523-30. [DOI:10.1016/j.biopha.2017.07.033] [PMID]
- [29] Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N. Role of catalase in oxidative stress- and age-associated degenerative diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019; 2019:9613090. [DOI:10.1155/2019/9613090] [PMID]
- [30] Jamshidi HR, Zeinabady Z, Zamani E, Shokrzadeh M. Attenuation of diabetic nephropathy by carvedilol through antioxidant effects in alloxan-induced diabetic rats. *Research Journal of Pharmacognosy*. 2018; 5(2):57-64. [DOI:10.22127/rjp.2018.58508]
- [31] Younus H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *International Journal of Health Sciences*. 2018; 12(3):88-93. [PMID]
- [32] Ebrahimi M, Ahangar N, Zamani E, Shaki F. L-Carnitine prevents behavioural alterations in ketamine-induced schizophrenia in mice: Possible involvement of oxidative stress and inflammation pathways. *Journal of Toxicology*. 2023; 2023:9093231. [DOI:10.1155/2023/9093231] [PMID]
- [33] López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*. 2023; 186(2):243-78. [DOI:10.1016/j.cell.2022.11.001] [PMID]
- [34] Yang NC, Hu ML. The limitations and validities of senescence associated-beta-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Experimental Gerontology*. 2005; 40(10):813-9. [DOI:10.1016/j.exger.2005.07.011] [PMID]
- [35] Duan J, Duan J, Zhang Z, Tong T. Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2005; 37(7):1407-20. [DOI:10.1016/j.biocel.2005.01.010] [PMID]
- [36] Alves-Silva JM, Maccioni D, Cocco E, Gonçalves MJ, Porcedda S, Piras A, et al. Advances in the phytochemical characterisation and bioactivities of *Salvia aurea* L. Essential Oil. *Plants*. 2023; 12(6):1247. [DOI:10.3390/plants12061247] [PMID]
- [37] Reddy VP. Oxidative stress in health and disease. *Biomedicines*. 2023; 11(11):2925. [DOI:10.3390/biomedicines11112925] [PMID]
- [38] Pole A, Dimri M, Dimri GP. Dimri, oxidative stress, cellular Senescence and ageing. *AIMS Molecular Science*. 2016; 3(3):300-24. [DOI:10.3934/molsci.2016.3.300]
- [39] Farooqui MY, Day WW, Zamorano DM. Glutathione and lipid peroxidation in the aging rat. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry*. 1987; 88(1):177-80. [DOI:10.1016/0305-0491(87)90097-6] [PMID]
- [40] Mo JQ, Hom DG, Andersen JK. Decreases in protective enzymes correlates with increased oxidative damage in the aging mouse brain. *Mechanisms of Ageing and Development*. 1995; 81(2-3):73-82. [DOI:10.1016/0047-6374(95)01586-o] [PMID]
- [41] Škrovnáková S, Mišurcová L, Machů L. Antioxidant activity and protecting health effects of common medicinal plants. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2012; 67:75-139. [DOI:10.1016/b978-0-12-394598-3.00003-4] [PMID]
- [42] Bonesi M, Loizzo MR, Acquaviva R, Malfa GA, Aiello F, Tundis R. Anti-inflammatory and antioxidant agents from *Salvia* Genus (Lamiaceae): An assessment of the current state of knowledge. *Anti-inflammatory & Anti-allergy Agents in Medicinal Chemistry*. 2017; 16(2):70-86. [DOI:10.2174/1871523016666170502121419] [PMID]
- [43] Kim M, Kim JY, Yang HS, Choe JS, Hwang IG. Nepetoidin B from *Salvia plebeia* R. Br. Inhibits inflammation by modulating the NF- κ B and Nrf2/HO-1 Signaling pathways in macrophage cells. *Antioxidants*. 2021; 10(8):1208. [DOI:10.3390/antiox10081208] [PMID]
- [44] Jedidi S, Aloui F, Selmi S, Selmi H, Sammari H, Ayari A, et al. Antioxidant properties of *salvia officinalis* decoction extract and mechanism of its protective effects on ethanol-induced liver and kidney injuries. *Journal of Medicinal Food*. 2022; 25(5):546-56. [DOI:10.1089/jmf.2021.0134] [PMID]
- [45] Foolad F, Khodagholi F. Dietary supplementation with *Salvia sahendica* attenuates acetylcholinesterase activity and increases mitochondrial transcription factor A and antioxidant proteins in the hippocampus of amyloid beta-injected rats. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013; 65(10):1555-62. [DOI:10.1111/jphp.12116] [PMID]
- [46] You JS, Pan TL, Lee YS. Protective effects of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) on adriamycin-induced cardiac and hepatic toxicity in rats. *Phytotherapy Research*. 2007; 21(12):1146-52. [DOI:10.1002/ptr.2225] [PMID]