

Research Paper

Study of Protective Effects of *Calendula Officinalis* L. Hydroethanolic Extract on Blood Parameters in Wistar Rats Treated With Cyclophosphamide*Naser Mirazi¹ , Aida Shahabi Baher¹ , Zahra Izadi² , Alireza Nourian³ , Samaneh Safari¹ 

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Bu Ali Sina University, Hamedan, Iran.
2. Department of Horticulture sciences and Engineering, Nahavand Higher Education Complex, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
3. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Bu Ali Sina University, Hamedan, Iran.



Citation Mirazi N, Shahabi Baher A, Izadi Z, Nourian A, Safari S. [Study of Protective Effects of *Calendula Officinalis* L. Hydroethanolic Extract on Blood Parameters in Wistar Rats Treated With Cyclophosphamide (Persian)]. Qom University of Medical Sciences Journal. 2022; 15(11):744-755. <https://doi.org/10.32598/qums.15.11.1757.3>

doi <https://doi.org/10.32598/qums.15.11.1757.3>



Received: 18 Dec 2021
Accepted: 23 Jan 2022
Available Online: 01 Feb 2022

Keywords:
Calendula, Blood
Parameters, Bone
Marrow,
Cyclophosphamide

ABSTRACT

Background and Objectives Some of drugs which used in chemotherapy have destructive effects on hemopoetic tissue. Cyclophosphamide is a drug for malignant cancers treatment with subversion effects on blood hemopoetic bone marrow. Medicinal plants with antioxidant effects have anti-inflammatory and protective effects on bone marrow tissue. The aim of this study is to investigate of protective effect of *Calendula officinalis* L. hydroethanolic extract (CHE) on blood parameters in Wistar male rats induced with cyclophosphamide.

Methods In this experimental study 35 male Wistar rats (200-220 g) were divided in 5 groups (n=7): control (0.5 ml saline normal), Cyclophosphamide (15 mg/kg), positive control 600 mg/kg, CHE), treatment 1 (Cyclophosphamide 15 mg/kg+300 mg/kg, CHE) and treatment 2 (Cyclophosphamide 15mg/kg +600 mg/kg, CHE). All injections were done intraperitoneally and the experiments were done for 15 days. At the end of experiments all animals were anesthetized (ketamine hydrochloride, 50mg/kg+xylazine hydrochloride 10 mg/kg) and blood samples and sternum bone tissue (fixed in 10% formaldehyde) were collected. All data were evaluated statistically by ANOVA and Tukey's method.

Results The results of this study were showed that cyclophosphamide has reduce effects on blood parameters (RBC, WBC, PL, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC) compare with control group significantly. CHE can protect and inhibit of cyclophosphamide damage effects on blood hemopoetic tissue.

Conclusion The use of CHE is able to protect of blood hemopoetic tissue in bone marrow and prohibit of cyclophosphamide effects.

* Corresponding Author:

Naser Mirazi, PhD.

Address: Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Bu Ali Sina University, Hamedan, Iran.

Tel: +98 (918) 8125741

E-Mail: mirazi205@gmail.com

مقاله پژوهشی

اثر محافظتی عصاره هیدروآتانولی گل گیاه همیشه بهار بر پارامترهای خونی در موش‌های صحرایی
نر درمان شده با سیکلوفسفامید* ناصر میرازی^۱، آیدا شهابی باهر^۱، زهرا ایزدی^۲، علیرضا نوریان^۳، سمانه صفری^۱

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

۲. گروه علوم و مهندسی باغبانی، مجتمع آموزش عالی نهبوند، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

۳. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پیرا دامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

Use your device to scan
and read the article online**Citation** Mirazi N, Shahabi Baher A, Izadi Z, Nourian A, Safari S. [Study of Protective Effects of Calendula Officinalis L. Hydroethanolic Extract on Blood Parameters in Wistar Rats Treated With Cyclophosphamide (Persian)]. Qom University of Medical Sciences Journal. 2022; 15(11):744-755. <https://doi.org/10.32598/qums.15.11.1757.3>**doi** <https://doi.org/10.32598/qums.15.11.1757.3>

چکیده

زمینه و هدف: برخی از داروهای مصرفی در شیمی‌درمانی در بافت خون‌ساز اثرات تخریبی به جا می‌گذارند. سیکلوفسفامید، از جمله داروهای مصرفی در گروهی از سرطان‌های بدخیم است که عوارض جانبی مخرب بر بافت خون‌ساز مغز استخوان‌ها دارد. گیاهان دارویی به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی خود بر بافت مغز استخوان اثر حفاظتی دارند. هدف از این مطالعه تجربی، بررسی اثرات حفاظتی عصاره گل گیاه همیشه بهار بر پارامترهای خونی در موش‌های صحرایی نر تیمار شده با سیکلوفسفامید است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۳۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۲۰-۲۴۰ گرم استفاده شد. موش‌ها در پنج گروه هفت سری به‌طور تصادفی تقسیم شدند: کنترل (روزانه ۰/۵ میلی‌لیتر نرمال سالین)، گروه آزمایش (سیکلوفسفامید، پانزده میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، گروه کنترل مثبت (روزانه ششصد میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره گل گیاه همیشه بهار)، تیمار ۱ (سیکلوفسفامید+عصاره گل گیاه همیشه بهار سصد میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، روزانه) و تیمار ۲ (سیکلوفسفامید+عصاره گل گیاه همیشه بهار ششصد میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، روزانه). سیکلوفسفامید به مدت پانزده روز تجویز شد. تمام تزریقات درون صفاقی انجام شد. در پایان آزمایش، حیوانات توسط کتامین هیدروکلراید+ایلازین بیهوش شده و خون‌گیری مستقیم از قلب جهت بررسی پارامترهای خونی تهیه شد. نمونه‌های بافت استخوان جناغ از موش‌ها جهت مطالعات هیستولوژیکی نیز تهیه و در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت. داده‌های به‌دست آمده با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست توکی ارزیابی شدند.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که سیکلوفسفامید اثرات کاهش‌دهندگی معناداری در تعداد گلبول‌های قرمز و گلبول‌های سفید، پلاکت‌ها، هموگلوبین و هماتوکریت در موش‌ها دارد. استفاده از عصاره گل گیاه همیشه بهار از اثرات مخرب سیکلوفسفامید بر بافت خون‌ساز جلوگیری کرد.

نتیجه‌گیری: مصرف عصاره هیدروآتانولی گل گیاه همیشه بهار می‌تواند اثرات محافظتی بر بافت خون‌ساز مغز استخوان اعمال کند و مانع اثرات توکسیک سیکلوفسفامید بر آن می‌شود.

تاریخ دریافت: ۲۷ آذر ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: ۰۳ بهمن ۱۴۰۰

تاریخ انتشار: ۱۲ بهمن ۱۴۰۰

کلیدواژه‌ها:

گل همیشه بهار،
پارامترهای خونی،
مغز استخوان، سیکلو
فسفامید

* نویسنده مسئول:

دکتر ناصر میرازی

نشانی: همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی.

تلفن: ۸۱۲۵۷۴۱ (۹۱۸) ۰۹۸

رایانامه: mirazi205@gmail.com

مقدمه

امروزه شیمی درمانی به عنوان یک روش درمانی تهاجمی و یکی از راه‌های مؤثر برای درمان انواعی از سرطان‌ها محسوب می‌شود، اما اثرات جانبی داروهای به‌کاررفته در این روش بسیار خطرناک و قابل تأمل است [۱].

سیکلوفسفامید، یکی از داروهای متعلق به گروه داروهای سیتوتوکسیک بوده که مورد مصرف آن در شیمی‌درمانی است. این دارو در بدن به متابولیت فعال آلکیل‌کننده تبدیل می‌شود. حاصل آن اضافه کردن یک الکیل به دی‌ان‌ای^۱ سلول و مانع از همانندسازی آن می‌شود. سیکلوفسفامید به خوبی از دستگاه گوارش جذب و در بافت‌ها و مایعات بدن توزیع می‌شود [۲].

سیکلوفسفامید دارای عوارض متعددی مانند ایجاد کم‌خونی، نوتروپنی، ترومبوسیتوپنی، ایجاد تومورهای ثانویه و ایجاد ناهنجاری‌هایی در دستگاه تناسلی می‌شود [۳]. سیکلوفسفامید بر بافت هم‌بند و به‌خصوص در مغز استخوان‌ها اثر داشته و می‌تواند از تکثیر سلول‌های خون‌ساز و ایمنی جلوگیری کند [۴].

این دارو در آنکولوژی کودکان به عنوان بخشی از درمان استاندارد برای سرطان خون و تومورهای مغزی استفاده می‌شود [۵]. استفاده از مواد گیاهی و داروهای مکمل جهت کاهش عوارض ناخواسته ایجادشده توسط داروهای مصرفی در شیمی‌درمانی معقول است. این قبیل ترکیبات محافظت‌کننده هر چقدر از منابع طبیعی و گیاهان دارویی باشند، مفیدتر خواهند بود [۶]. گیاهان دارویی با اثرات حفاظت‌کنندگی خود قادر هستند از فعالیت‌های نابودکنندگی سلول‌ها و اثرات کشندگی برخی مواد شیمیایی و دارویی جلوگیری کنند [۷].

در اغلب گیاهان دارویی اثرات ایمنی‌سازی و مهارکنندگی از روند رشد غیرطبیعی سلولی به اثبات رسیده است [۸]. گیاه همیشه بهار^۲ از خانواده Asteraceae است که خواص متعدد دارویی دارد. گل همیشه بهار حاوی مقادیر کم اسانس روغنی فزّار ساپونین، رزین، اسیدهای آلی، کالان دولین، صمغ، مواد لعابی، آلومین، اینولین، اسید سالیسیلیک، اسید لوریک، اسید کاندولیک و اسید پالمیتیک است [۹].

روغن گل همیشه بهار و روغن دانه آن ترکیبات متقارن مشتق‌شده‌ای از فلاونوئیدها، تانن‌ها، کومارین‌ها، استرول‌ها، استروئیدها، مونوترپن‌ها، سسکوئیترپن‌های تری‌ترپن‌ها، توکوفرول‌های کینونی، اسیدهای آمینه و رزین‌ها دارد [۱۰]. عصاره این گیاه به عنوان ضد عفونی‌کننده، ضد التهاب و نیز ضد باکتری به کار برده می‌شود. یکی از متابولیت‌های ثانویه مهم گیاه همیشه بهار اولئانولیک اسید است که یک تری‌ترپنوئید

آب‌گریز با اثرات مختلف حفاظت از کبد در برابر آسیب ناشی از مواد شیمیایی حاد فیبروز کبدی سیروز و آنتی‌اکسیدان است. اولئانولیک اسید در شرایط آزمایشگاهی با مهار فعالیت پروتئازی از همانندسازی نقص ایمنی انسانی نوع ۱^۴ در سیستم‌های سلولی است [۱۱].

عصاره گل این گیاه اسیدهای چرب غیراشباع، مواد معدنی، ویتامین C22 و پلی فنولیک و کاروتن دارد. مطالعات تجربی و بالینی نشان داده که مکمل آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مانند ملاتونین، کورکومین، ویتامین C، ویتامین E27 و کوئرستین محافظت در برابر آسیب کلیوی ناشی از دارو را فراهم می‌کند [۱۲].

آنتی‌اکسیدان‌ها، اولین خط دفاعی برای مقابله با رادیکال‌های آزاد یا گونه‌های فعال اکسیژن/نیتروژن^۴ هستند. اندازه‌گیری وضعیت آنتی‌اکسیدانی کل^۵، نتایج وضعیت اکسیدان کل^۶ و شاخص استرس اکسیداتیو^۷ در پلاسما یا بافت‌های بدن، عملکرد جمعی همه آنتی‌اکسیدان‌ها و اکسیدان‌های موجود در بدن را فراهم می‌کند. عصاره اتانولی گل همیشه بهار پتانسیل محافظتی بیشتری نسبت به عصاره گل آبی دارد و ممکن است به دلیل محتوای پلی فنلی و B- کاروتن بالاتر در عصاره اتانولی باشد [۱۳]. عصاره‌های متانولی و اتانولی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک استاندارد فلوکونازول، فعالیت ضدقارچی بهتری را از خود نشان داده است [۱۴].

از آنجا که تاکنون اثرات محافظتی عصاره این گیاه در بافت مغز استخوان موش‌هایی که با سیکلوفسفامید درمان شده‌اند، بررسی نشده است، بر آن شدیم تا در این مطالعه درباره این موضوع تحقیق کنیم.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، تعداد ۳۵ سر موش صحرایی نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۲۰ گرم از دانشگاه علوم پزشکی همدان خریداری شد. موش‌ها به مدت یک هفته جهت سازگاری با محیط و دمای ۲۰±۲ درجه سانتی‌گراد و چرخه روزانه دوازده ساعت روشنایی تاریکی و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. در این مطالعه همه موارد اخلاقی در پژوهش رعایت شده و تمام اعمال جراحی و نمونه‌گیری‌ها در حیوانات تحت بیهوشی کامل صورت گرفته است. همچنین سعی شده تا از کمترین تعداد نمونه قابل قبول استفاده شود. ملاحظات اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی نیز توسط کمیته اخلاق دانشگاه بوعلی سینا با کد IR.BASU.REC.1398,024 تصویب شد.

3. Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV1)
4. Reactive Oxygen Species/Reactive Nitrogen Species(ROS/RNS)
5. Total Antioxidant Status (TAS)
6. Total Oxidant Status (TOS)
7. Oxidative stress index (OSI)

1. Deoxyribonucleic acid (DNA)

۲. با نام علمی: Calendula Officinalis L.



موش‌ها به طور تصادفی به پنج گروه هفت سری به شکل زیر تقسیم‌بندی شدند:

گروه کنترل: دریافت‌کننده سالیین نرمال (۵/۰ میلی لیتر)

گروه آزمایش: دریافت‌کننده سیکلوفسفامید (پانزده میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن روزانه به مدت پانزده روز)

گروه کنترل مثبت: دریافت‌کننده عصاره میوه تمشک (ششصد میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن روزانه به مدت پانزده روز)

گروه تیمار ۱: دریافت‌کننده سیکلوفسفامید (پانزده میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن +عصاره میوه تمشک (سیصد میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، روزانه، به مدت پانزده روز)

گروه تیمار ۲: دریافت‌کننده سیکلوفسفامید (پانزده میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن +عصاره میوه تمشک (ششصد میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، روزانه، به مدت پانزده روز)

تزریقات انجام‌شده به صورت داخل صفاقی صورت گرفت. پس از پایان آزمایش موش‌ها توسط کتامین هیدروکلراید (پنجاه میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به همراه زایلازی (ده میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. سپس خون‌گیری به‌طور مستقیم از قلب حیوانات تهیه و در لوله‌های حاوی ماده ضدانعقاد^۸ ریخته شد. نمونه‌های خون جهت انجام آزمایشات به آزمایشگاه ارسال و شمارش گلبول‌های قرمز، سفید، پلاکت، هموگلوبین، هماتوکریت، میانگین هموگلوبین سلولی^۹، میانگین حجم سلول^{۱۰} و میانگین غلظت هموگلوبین سلولی^{۱۱} انجام شد.

گل و گیاه همیشه بهار در اواخر فصل بهار قابل برداشت است. پس از شناسایی گیاه و رقم مورد نظر توسط متخصص گیاه‌شناس آب‌گیری گل انجام شد. سپس گل به همراه کاسبرگ بعد از خشک شدن به منظور جداسازی بهتر و مؤثرتر مواد فعال موجود در آن توسط آسیاب برقی به پودر تبدیل شد. پودر آماده‌شده تقریباً به وزن پانصد گرم در داخل بشر ریخته شده و برای جداسازی مواد مؤثر و فعال آن، اتانول ۸۰ درصد به آن افزوده شد.

این پودر کاملاً با اتانول مخلوط شده و به آرامی هم زده شد و سپس دهانه بشر با پارافیلیم پوشانده شد. سپس ظرف حاوی مخلوط را در مکان تاریک و سرد (داخل یخچال) به مدت یک هفته قرار گرفت. بعد از این مدت محتویات بشر به وسیله قیف بوختر و ارلن خلأ در مرحله اول صاف شد. بعد از این مرحله محلول درون بالن ریخته شد و به منظور جداسازی حلال از عصاره در دستگاه روتاری (IKA RV10 digital) با دمای حداکثر پنجاه درجه سانتی گراد با دور متوسط قرار داده شد.

8. EDTA
9. Mean corpuscular hemoglobin (MCH)
10. Mean Cell Volume (MCV)
11. mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)

بعد از جداسازی حلال، مایع غلیظ با ویسکوزیته بالا به دست آمد که درون پلیت شیشه‌ای به صورت گسترده توزیع و جهت تبخیر آب قرار گرفت و مواد فرّار، در زیر هود به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. در پایان کار برای جلوگیری از نفوذ هوا و خشک شدن عصاره در پلیت را پوشیده و تا زمان مصرف در فریزر نگهداری شد.

پس از پایان آزمایشات، موش‌ها توسط داروی کتامین هیدروکلراید (پنجاه میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (ده میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. سپس محوطه شکمی و سینه‌ای با چاقوی جراحی باز شد و توسط سرنگ ده میلی لیتری اقدام به خون‌گیری مستقیم از قلب شد. خون‌ها بلافاصله به داخل لوله‌های آزمایش حاوی ماده ضدانعقاد ریخته شد و جهت انجام مراحل اندازه‌گیری پارامترهای خونی به آزمایشگاه ارسال شد.

برداشت نمونه‌های استخوان جناق نیز انجام شد و جهت تثبیت بافتی در ظرف حاوی فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. نمونه‌های استخوان جناغ موش‌ها بعد از مراحل مختلف روند تهیه بافت توسط دستگاه میکروتوم (Leica RM2145) به ضخامت ۵-۶ میکرومتر برش داده شدند.

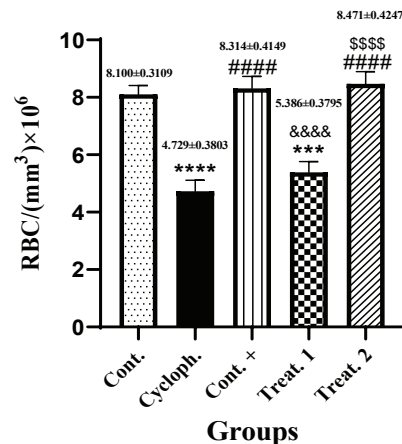
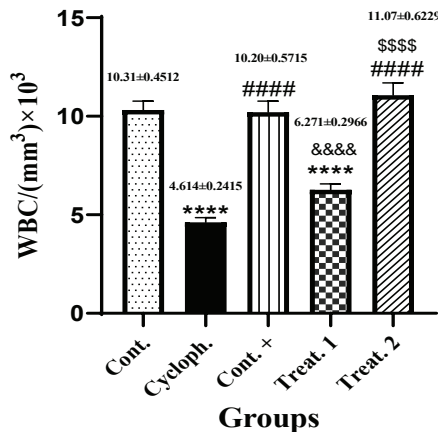
برش‌های بافتی حاصل روی لام قرار گرفته و به روش همانوکسیلین آئوزین رنگ‌آمیزی شدند. بررسی و آنالیز نمونه‌های بافت توسط پاتولوژیست و با استفاده از یک دستگاه میکروسکوپ نوری (CX41 Olympus) مجهز به دوربین دیجیتال (DP25, Olympus) انجام شد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ ارزیابی آماری شدند. از آزمون کولموگروف اسمیرنف جهت اطمینان از توزیع نرمال داده‌ها و آزمون واریانس یک‌طرفه آنووا برای آنالیز آماری اطلاعات و مقایسه میانگین گروه‌های تحت مطالعه بعد از بررسی پیش‌فرض‌های اساسی و تست تعقیبی توکی سطح معناداری $P < 0.05$ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

اندازه‌گیری تعداد گلبول‌های قرمز در خون موش‌های مورد آزمایش نشان داد که در گروه آزمایش (سیکلوفسفامید پانزده میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) نسبت به گروه کنترل گلبول‌های قرمز کاهش معناداری ($P < 0.001$) وجود داشت.

مقایسه تعداد گلبول‌های قرمز در گروه کنترل مثبت (دریافت‌کننده عصاره گل همیشه بهار ششصد میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) نسبت به گروه آزمایش، تعداد گلبول‌های قرمز خون افزایش معناداری داشتند ($P < 0.001$). تعداد گلبول‌های قرمز در خون موش‌های گروه تیمار ۱ (دریافت‌کننده داروی سیکلوفسفامید پانزده میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن



مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

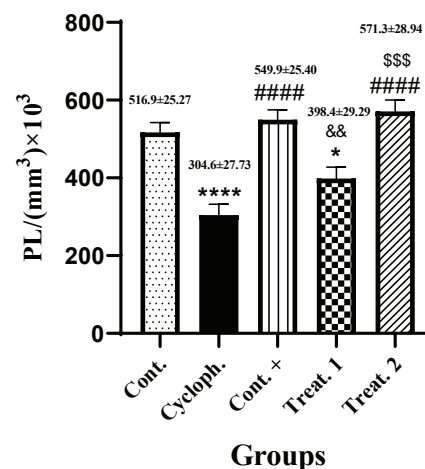
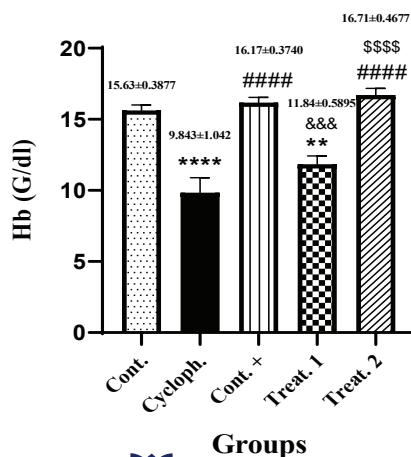
تصویر ۲. مقایسه داده‌های حاصل از شمارش گلبول‌های سفید در گروه‌های مورد آزمایش
* بیانگر وجود اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل. # بیانگر وجود اختلاف معنادار نسبت به گروه آزمایش. & بیانگر وجود اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل مثبت. \$ بیانگر وجود اختلاف معنادار نسبت به گروه تیمار ۱. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شده است.
(***P<0/001), (####P<0/0001), (&&&P<0/001), (\$\$\$\$P<0/0001)

خون موش‌های گروه تیمار ۲ نسبت به گروه آزمایش افزایش معناداری (P<0/001) نشان داد. گروه تیمار ۲ (دریافت‌کننده داروی سیکلوفسفامید پانزده میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و عصاره گل همیشه بهار ششصد میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) نسبت به گروه تیمار ۱ افزایش معناداری در

مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۱. مقایسه میانگین داده‌های حاصل از شمارش گلبول‌های قرمز در گروه‌های مورد آزمایش
* بیانگر وجود اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل. # بیانگر وجود اختلاف معنادار نسبت به گروه آزمایش و بیانگر وجود اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل مثبت. \$ بیانگر وجود اختلاف معنادار نسبت به گروه تیمار ۱. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شده است.
(***P<0/001), (####P<0/0001), (&&&P<0/001), (\$\$\$\$P<0/0001)

بدن و عصاره گل همیشه بهار سیصد میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) نسبت به گروه کنترل، کاهش معناداری (P<0/001) را نشان داد. مقایسه بین گروه تیمار و گروه کنترل مثبت کاهش معناداری داشته است. تعداد گلبول‌های قرمز در



مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۴. مقایسه داده‌های حاصل از بررسی هموگلوبین در گروه‌های مورد آزمایش
* بیانگر وجود اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل. # بیانگر وجود اختلاف معنادار نسبت به گروه شاهد. & بیانگر وجود اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل مثبت. \$ بیانگر وجود اختلاف معنادار نسبت به گروه تیمار ۱. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شده است.
(***P<0/001), (####P<0/0001), (&&&P<0/001), (\$\$\$\$P<0/0001), (**P<0/01)

مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۳. مقایسه میانگین تعداد پلاکت‌ها در گروه‌های مورد آزمایش * بیانگر وجود اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل
بیانگر وجود اختلاف معنادار نسبت به گروه آزمایش. & بیانگر وجود اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل مثبت. \$ بیانگر وجود اختلاف معنادار نسبت به گروه تیمار ۱. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شده است.
(**P<0/01), (***P<0/001), (####P<0/0001), (&&&P<0/001), (\$\$\$\$P<0/0001)

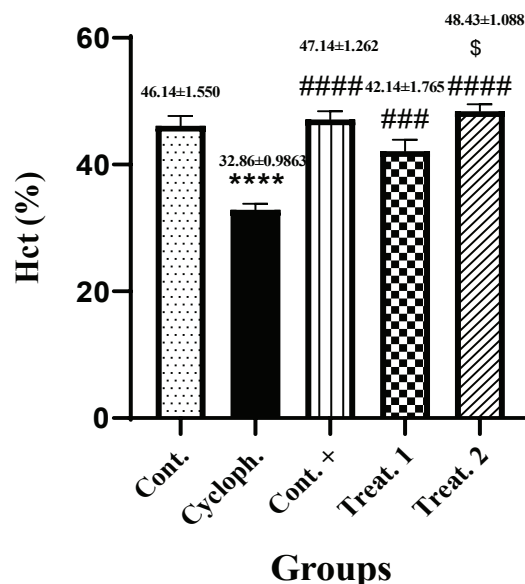
پلاکت‌های خون در گروه تیمار ۱ در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری ($P<0/05$) نشان داد. مقایسه سنجش میزان پلاکت‌ها در گروه تیمار ۱ نسبت به گروه کنترل مثبت کاهش معناداری ($P<0/01$) نشان داد. سنجش میزان پلاکت‌های خون در گروه تیمار ۲ در مقایسه با گروه آزمایش به صورت معناداری ($P<0/001$) افزایش نشان داد. سنجش میزان پلاکت‌های خون در گروه تیمار ۲ نسبت به گروه تیمار ۱ افزایش معناداری ($P<0/001$) نشان داد (تصویر شماره ۳).

مقایسه میزان هموگلوبین خون در موش‌های مورد آزمایش در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری ($P<0/001$) نشان داد. سنجش میزان هموگلوبین در خون موش‌های گروه کنترل مثبت در مقایسه با گروه آزمایش افزایش معناداری ($P<0/001$) نشان داد. مقایسه میزان هموگلوبین در خون موش‌های گروه تیمار ۱ نسبت به گروه کنترل مثبت کاهش معناداری ($P<0/001$) نشان داد. مقایسه میزان هموگلوبین خون در گروه تیمار ۲ نسبت به گروه آزمایش افزایش معناداری ($P<0/001$) نشان داد. سنجش میزان هموگلوبین خون موش‌های مورد آزمایش در گروه تیمار ۲ نسبت به گروه تیمار ۱ افزایش معناداری ($P<0/001$) نشان داد (تصویر شماره ۴).

سنجش میزان هماتوکریت در خون موش‌های مورد آزمایش در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری ($P<0/001$) نشان داد. مقایسه سنجش میزان هماتوکریت در گروه کنترل مثبت نسبت به گروه آزمایش افزایش معناداری ($P<0/001$) نشان داد. سنجش میزان هماتوکریت در گروه تیمار ۱ نسبت به گروه آزمایش معناداری ($P<0/001$) نشان داد. مقایسه هماتوکریت در گروه تیمار ۲ نسبت به گروه آزمایش افزایش معناداری ($P<0/001$) داشت. سنجش میزان هماتوکریت در گروه تیمار ۲ در مقایسه با گروه تیمار ۱ افزایش معناداری ($P<0/05$) نشان داد (تصویر شماره ۵).

مقایسه سنجش میزان حجم متوسط گلبولی، مقدار هموگلوبین سلولی و درصد غلظت هموگلوبین سلولی در خون موش‌های مورد آزمایش نشان داد که در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری وجود دارد ($P<0/001$). همچنین این پارامتر در در گروه کنترل مثبت نسبت به گروه کنترل فاقد اختلاف معنادار بود.

در گروه تیمار ۱ سنجش میزان حجم متوسط گلبولی نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشت ($P<0/01$). مقایسه سنجش میزان مقدار هموگلوبین سلولی در گروه تیمار ۱ نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری ($P<0/001$) نشان داد. مقایسه سنجش میزان غلظت هموگلوبین سلولی در گروه تیمار ۱ نسبت به گروه کنترل فاقد اختلاف معنادار بود. سنجش هر سه پارامتر یادشده در گروه تیمار ۲ نسبت به گروه کنترل اختلاف معناداری نشان نداد.



مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

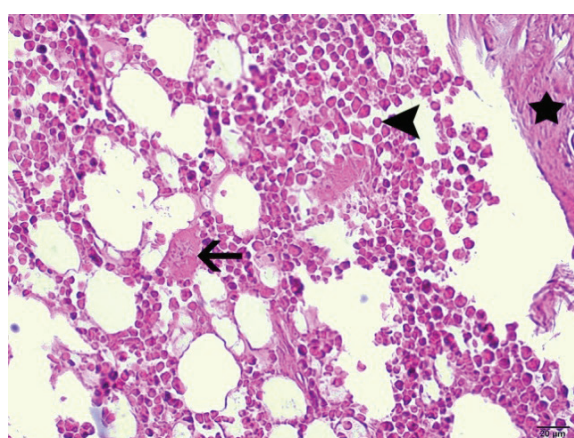
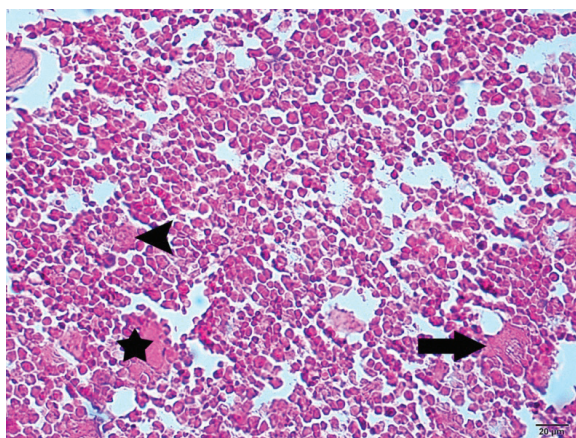
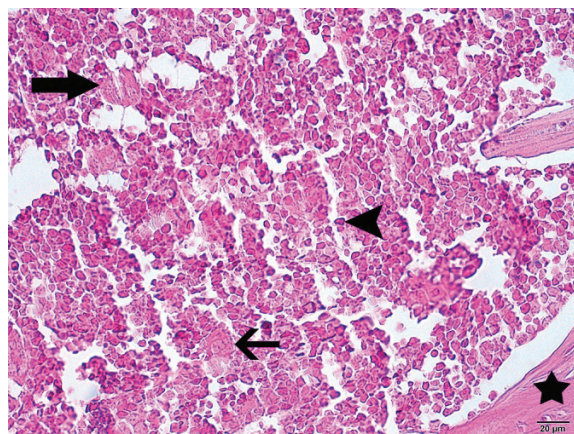
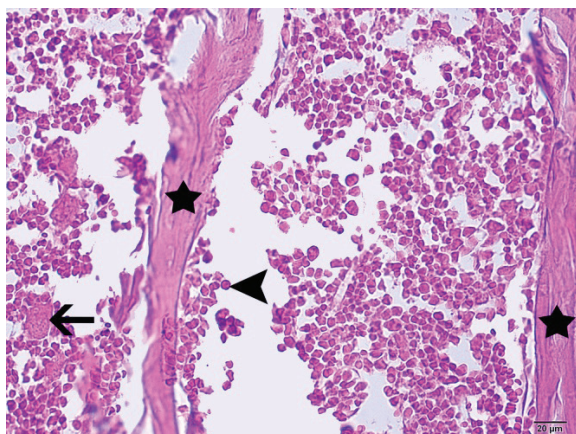
تصویر ۵. مقایسه میانگین داده‌های حاصل از بررسی هماتوکریت در گروه‌های مورد آزمایش
* بیانگر وجود اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل. # بیانگر وجود اختلاف معنادار نسبت به گروه آزمایش. & بیانگر وجود اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل مثبت. \$ بیانگر وجود اختلاف معنادار نسبت به گروه تیمار ۱. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شده است. ($***P<0/001$), ($####P<0/0001$), ($$$$P<0/0001$)

تعداد گلبول‌های قرمز داشت (تصویر شماره ۱).

سنجش میزان تعداد گلبول‌های سفید خون در موش‌های مورد آزمایش در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری ($P<0/001$) نشان داد. مقایسه سنجش میزان تعداد گلبول‌های سفید خون در گروه کنترل مثبت نسبت به گروه آزمایش افزایش معناداری ($P<0/001$) نشان داد. سنجش تعداد گلبول‌های سفید خون در گروه تیمار ۱ نسبت به گروه کنترل، کاهش معناداری ($P<0/001$) نشان داد.

مقایسه میزان تعداد گلبول‌های سفید در گروه تیمار ۱ نسبت به گروه کنترل مثبت کاهش معناداری نشان داد. سنجش میزان تعداد گلبول‌های سفید در خون موش‌های آزمایش‌شده در گروه تیمار ۲ نسبت به گروه آزمایش افزایش معناداری نشان داد ($P<0/001$). مقایسه سنجش میزان تعداد گلبول سفید در گروه تیمار ۲ با گروه تیمار ۱ افزایش معناداری ($P<0/001$) نشان داد (تصویر شماره ۲).

سنجش میزان پلاکت‌های موجود در خون موش‌های مورد مطالعه در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری نشان داد ($P<0/001$). مقایسه سنجش میزان پلاکت‌های موجود در خون موش‌های گروه کنترل مثبت نسبت به گروه آزمایش افزایش معناداری ($P<0/001$) نشان داد. سنجش میزان


 مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۶: تصاویر مقاطع بافت‌شناسی تهیه‌شده از بافت مغز استخوان جناغ موش‌های مورد آزمایش

A، گروه کنترل، تراکم سلولی کاملاً طبیعی است. تیغه استخوان اسفنجی (ستاره)، سلول مگاکاریوسیت (پیکان بزرگ)، سلول میلوپیت (پیکان کوچک)، سلول نابالغ (نوک پیکان). B، گروه کنترل مثبت، تراکم سلولی طبیعی است. C، گروه آزمایش، تراکم سلول‌های غیرطبیعی و بسیار کم است. نظم سلولی به هم ریخته شده است. D، گروه تیمار ۱، تراکم سلولی کمی بیشتر از گروه آزمایش شده است. E، گروه تیمار ۲، تراکم و تعداد سلول‌ها بیشتر و نظم سلولی هم بسیار طبیعی است. بزرگ‌نمایی ۴۰×، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین اتوزین.

(جدول شماره ۱).

ویژگی‌های خاص خود را دارند، به طوری که در گروه آزمایش، کاهش تراکم سلولی و عدم انسجام سلولی در نمونه مورد نظر کاملاً مشهود است.

از طرفی، در نمونه‌های گروه تیمار ۱ تعداد و تراکم سلولی کمی

بررسی‌های بافت‌شناسی از بافت مغز استخوان جناغ در موش‌های مورد آزمایش نشان داد که تعداد سلول‌های موجود در هر کدام از نمونه‌ها از نظر تراکم و به هم‌ریختگی سازمان سلولی

جدول ۱. مقایسه سنجش میزان میانگین حجم متوسط گلبولی، مقدار میانگین هموگلوبین سلولی و میانگین درصد غلظت هموگلوبین سلولی در گروه‌های مورد آزمایش

گروه‌ها	حجم متوسط گلبولی (fL)	مقدار میانگین هموگلوبین سلولی (Pg)	غلظت هموگلوبین سلولی (g/dL)	میانگین $\pm$ خطای استاندارد
کنترل	۹۱/۵ $\pm$ ۳/۲	۳۰/۹ $\pm$ ۱/۲	۳۳/۱ $\pm$ ۲/۲	
سیکلو فسفامید	۶۲/۷ $\pm$ ۵/۱	۲۲ $\pm$ ۲/۱	۲۵/۸ $\pm$ ۲/۴	
کنترل مثبت	۹۳/۱ $\pm$ ۴/۳	۳۲ $\pm$ ۱/۶	۳۶/۸ $\pm$ ۳/۱	
تیمار ۱	۷۱ $\pm$ ۵/۴	۲۶/۲ $\pm$ ۳/۲	۳۱/۵ $\pm$ ۳/۳	
تیمار ۲	۹۳/۸ $\pm$ ۶/۱	۳۴/۵ $\pm$ ۲/۳	۳۷/۵ $\pm$ ۲/۸	

 مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم



بهتر است و افزایش نسبی دارد. در گروه تیمار ۲ این تراکم به مراتب از وضعیت بهتر و قابل توجه‌تری برخوردار است. در گروه کنترل مثبت تغییرات قابل توجهی نسبت به گروه کنترل مشاهده نمی‌شود (تصویر شماره ۶).

بحث

سیکلو فسفامید دارویی است که در انکولوژی کودکان به عنوان بخشی از درمان استاندارد برای سرطان خون، تومورهای جامد و تومورهای مغزی استفاده می‌شود. سیکلو فسفامید معمولاً به صورت داخل وریدی تجویز می‌شود، اما به عنوان یک ماده خوراکی نیز در دسترس است، اگرچه این مورد به ندرت در کودکان مبتلا به سرطان استفاده می‌شود [۱۵]. سیکلو فسفامید در بافت خون‌ساز موجب کاهش معنادار تعداد گلبول‌های سفید خون می‌شود [۱۶]. مطالعات نشان داده که سیکلو فسفامید شاخص‌های خونی، از جمله ایمنوگلوبولین‌ها و گلبول‌های سفید خون شامل لنفوسیت‌ها (سلول‌های T و سلول‌های B)، گرانولوسیت‌ها (نوتروفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها) در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معناداری کاهش یافت [۱۷].

سیکلو فسفامید همچنین اثرات نامطلوبی بر سلول‌های سالم دارد و منجر به سرکوب سیستم ایمنی می‌شود. نتایج نشان می‌دهد که درمان با سیکلو فسفامید فعالیت فاگوسیتی سیستم ماکروفاژها را مختل می‌کند. سرکوب بافت خون‌ساز ناشی از تجویز سیکلو فسفامید یک مشکل عمده برای بیماران سرطانی در شیمی‌درمانی بالینی است. مطابق نتایج مطالعات قبلی، درمان با سیکلو فسفامید به‌طور قابل توجهی تعداد گلبول‌های قرمز خون محیطی، شمارش گلبول‌های سفید و قرمز و پلاکت‌ها را کاهش داد [۱۸].

ترکیبات شیمیایی زیادی در گل همیشه بهار، از جمله کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، کومارین‌ها، کینون‌ها، آمینواسیدها، لیپیدها و کربوهیدرات‌ها شناسایی شدند. این ترکیبات را می‌توان برای اهداف دارویی مختلف به عنوان یک آنتی‌اکسیدان، ضدالتهاب، ضدباکتری، ضدقارچ، ضدسرطان، ضدنقص ایمنی انسانی، برای بهبود زخم و موارد دیگر استفاده کرد [۱۹].

ترکیبات شیمیایی اصلی گل همیشه بهار شامل استروئیدها، ترپنوئیدها، الکل‌های ترترپنیک آزاد و استری‌شده، اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها (کوئرستین، روتین، نارسین، ایزورامنتین، کامپرفرول) و سایر ترکیبات است. فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی با داشتن حداقل ناحیه باندکننده آهن، دارای خواص شلاته کردن آهن هستند.

فلاونوئیدها با عمل چنگالی کردن آهن هم موجب جذب بیشتر آهن از روده‌ها شده و هم مانع از دفع کلیوی آن می‌شوند. با این

کار فلاونوئیدها آهن را در بافت‌ها، به‌خصوص در بافت خون‌ساز، ذخیره می‌کنند؛ بنابراین استفاده از ترکیبات فلاونوئیدی در کم‌خونی‌ها توصیه می‌شود [۲۰].

در مطالعه‌ای، تجویز سیکلو فسفامید در موش‌های مبتلا به نوعی تومور لنفوسیتی نشان داده که تجویز عصاره متانولی برگ گیاه سنا (*Cassia Occidentalis L.*) بر مغز استخوان به لکوسیتوز و افزایش مقادیر هموگلوبین، میانگین هموگلوبین سلولی، میانگین حجم سلول، میانگین غلظت هموگلوبین سلولی و هماتوکریت منجر می‌شود. این تغییرات مشاهده شده در پارامترهای خون‌شناسی نشان‌دهنده توانایی محافظتی عصاره این گیاه است. این اثر شاید به دلیل محتوای آنتراکینون و فلاونوئید باشد [۲۱].

گل‌های گیاه همیشه بهار حاوی مقادیر زیادی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی (فلاونوئیدها و پلی‌فنول‌ها) هستند که نشان‌دهنده خاصیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه است. علاوه بر این، گل‌های همیشه بهار مدت‌ها است که در درمان‌های سنتی به عنوان درمان سوختگی‌های مختلف، از جمله آفتاب‌سوختگی و زخم‌های پوستی استفاده می‌شوند [۲۲].

از آنجا که گیاه همیشه بهار ترکیبات فلاونوئیدی فراوانی دارد؛ بنابراین می‌توان تصور کرد که عصاره این گیاه قادر است در محافظت از بافت خون‌ساز در برابر آسیب‌های سیکلو فسفامید تأثیرگذار باشد. در تحقیقی نشان داده شد که پلی‌فنول‌ها و اسید اولئولینیک موجود در گیاه همیشه بهار در درمان کم‌خونی‌های ناشی از عوامل توکسیک در مغز استخوان‌ها مؤثر هستند. این اثر را به خاطر اثر حفاظتی ترکیبات موجود در این گیاه بر بافت خون‌ساز مرتبط می‌دانند [۲۳].

کوئرستین یکی از مواد آنتی‌اکسیدانی شناخته شده در گیاهان دارویی است. کوئرستین اثرات بسیار مفیدی در حفاظت از سلول‌ها در برابر عوامل اکسیدکننده دارد. در تحقیقی نشان داده شد که کوئرستین در حفاظت از اریتروسیت‌ها در برابر عوامل تخریب‌کننده جلوگیری می‌کند [۲۴]. در تحقیقی که در سال ۲۰۲۰ انجام شد، اثرات ضدسرطانی عصاره گل همیشه بهار نشان داده شد. این اثرات را با وجود مواد جاروکنندگی مواد شیمیایی مانند ترکیبات کالندولیک اسید و کالندولین که در این گیاه دارویی وجود دارد، مرتبط می‌دانند [۲۵].

از جمله ترکیبات موجود در عصاره گل همیشه بهار ترپینوئیدها است. ترپینوئیدها، از جمله عواملی هستند که قادرند در حفاظت سلولی در برابر مواد شیمیایی آسیب‌رسان مانند سیکلو فسفامید شرکت کنند [۲۶]. وجود ترکیبات کومارین‌ها در گیاه همیشه بهار اثبات شده است. در تحقیقی نشان داده شد که کومارین‌ها اثرات بسیار مفیدی در تکثیر سلول‌ها و جلوگیری از آپوپتوز آن‌ها دارند [۲۷].

کومارین‌ها در درمان سرطان پروستات، کارسینومای سلول‌های کلیوی و لوسمی به کار گرفته شده‌اند. علاوه بر آن، کومارین‌ها نقش مهمی در ممانعت از عواض جانبی ایجاد شده در رادیوتراپی دارند [۲۸]؛ بنابراین کومارین‌ها و مشتقات کومارینی در جلوگیری از اثرات سمی سلولی ترکیبات شیمیایی آسیب‌رسان مانند سیکلوفسفامید نقش اساسی دارند. به نظر می‌رسد یکی از مهم‌ترین عوامل جلوگیری‌کننده از اثرات سیکلوفسفامید در بافت خون‌ساز ترکیبات کومارینی باشد که در عصاره گل گیاه همیشه بهار به وفور یافت می‌شود.

نتیجه‌گیری

سیکلوفسفامید در بافت خون‌ساز مغز استخوان‌ها اثرات تخریبی به جا می‌گذارد. این اثرات موجب کاهش تعداد گلبول‌های خونی و برخی پارامترهای خون نظیر هموگلوبین، هماتوکریت، میانگین هموگلوبین سلولی، میانگین حجم سلول و میانگین غلظت هموگلوبین سلولی می‌شود. با توجه به ترکیبات موجود در گیاه همیشه بهار مانند فلاونوئیدها و آنتی‌اکسیدان‌ها و اثرات مثبتی که این عوامل روی پارامترهای خونی و بافت مغز استخوان دارند. چنین به نظر می‌رسد که عصاره گل همیشه بهار قادر باشد از عوارض مخرب سیکلوفسفامید در بافت خون‌ساز جلوگیری کند.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه دارای مصوبه کمیته اخلاق دانشگاه بوعلی سینا با کد اخلاق IR.BASU.REC.1398,024 است.

حامی مالی

معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه بوعلی سینا حامی مالی این مقاله بوده است.

مشارکت‌نویسندگان

تمام نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش همه بخش‌های پژوهش حاضر مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تضاد منافی بین پژوهشگران در این طرح پژوهشی وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه بوعلی سینا بابت کمک‌های مالی که در قالب گرنت پژوهشی صورت پذیرفته است، نهایت تشکر و قدردانی

References

- [1] Zhao CY, Cheng R, Yang Z, Tian ZM. Nanotechnology for cancer therapy based on chemotherapy. *Molecules*. 2018; 23(4):826. [PMID] [PMCID]
- [2] Duggina P, Kalla CM, Varikasuvu SR, Bukke S, Tartte V. Protective effect of centella triterpene saponins against cyclophosphamide-induced immune and hepatic system dysfunction in rats: Its possible mechanisms of action. *J Physiol Biochem*. 2015; 71(3):435-54. [DOI:10.1007/s13105-015-0423-y] [PMID]
- [3] Bokser L, Szende B, Schally AV. Protective effect of D-Type 6-lutenizing hormone-releasing hormone micro capsule against cyclophosphamide-induced gonadotoxicity in female rats. *Br J Cancer*. 1990; 61(6):861-5. [DOI:10.1038/bjc.1990.192] [PMID] [PMCID]
- [4] Taherkhani B, Mirazi N. [Study of vitis vinifera L. seed's hydro-ethanolic extract on blood parameters in male rats induced with cyclophosphamide (Persian)]. *Razi J Med Sci*. 2019; 26(7):24-32. [Link]
- [5] Barnes H, Holland AE, Westall GP, Goh NS, Glaspole IN. Cyclophosphamide for connective tissue disease-associated interstitial lung disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018; 1(1):CD010908. [DOI:10.1002/14651858.CD010908.pub2] [PMID]
- [6] Kassa Z, Asfaw Z, Demissew S. An ethnobotanical study of medicinal plants in sheka zone of southern nations nationalities and peoples regional state, Ethiopia. *J Ethnobiol Ethnomed*. 2020; 16(1):7. [DOI:10.1186/s13002-020-0358-4] [PMID] [PMCID]
- [7] Wangchuk P, Yeshi K, Jamphel K. Pharmacological, ethnopharmacological and botanical evaluation of subtropical medicinal plants of Lower Kheng region in Bhutan. *Integr Med Res*. 2017; 6(4):372-87. [DOI:10.1016/j.imr.2017.08.002] [PMID] [PMCID]
- [8] Andersen FA, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebler DC, et al. Final report of the cosmetic ingredient review expert panel amended safety assessment of *Calendula officinalis*-derived cosmetic ingredients. *Int J Toxicol*. 2010; 29(6 Suppl):221S-43. [DOI:10.1177/1091581810384883] [PMID]
- [9] Nicolaus C, Junghanns S, Hartmann A, Murillo R, Ganzera M, Merfort I. In vitro studies to evaluate the wound healing properties of *Calendula officinalis* extracts. *J Ethnopharmacol*. 2017; 196:94-103. [DOI:10.1016/j.jep.2016.12.006] [PMID]
- [10] Efstratiou E, Hussain AI, Nigam PS, Moore JE, Ayub MA, Rao JR. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as gram-negative and gram-positive clinical pathogens. *Complement Ther Clin Pract*. 2012; 18(3):173-6. [DOI:10.1016/j.ctcp.2012.02.003] [PMID]
- [11] Cruceriu D, Balacescu O, Rakosy E. *Calendula officinalis*: Potential roles in cancer treatment and palliative care. *Integr Cancer Ther*. 2018; 17(4):1068-78. [DOI:10.1177/1534735418803766] [PMID] [PMCID]
- [12] Tanideh N, Jamshidzadeh A, Sepehrimanesh M, Hosseinzadeh M, Koohi-Hosseinzadeh O, Najibi A, et al. Healing acceleration of acetic acid-induced colitis by marigold (*Calendula officinalis*) in male rats. *Saudi J Gastroenterol*. 2016; 22(1):50-6. [PMID] [PMCID]
- [13] Robinson D, Schulz G, Langley R, Donze K, Winchester K, Rodgers C. Evidence-based practice recommendations for hydration in children and adolescents with cancer receiving intravenous cyclophosphamide. *J Pediatr Oncol Nurs*. 2014; 31(4):191-9. [PMID] [PMCID]
- [14] Huyen XH, Lin YP, Gao T, Chen RY, Fan YM. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. *Int Immunopharmacol*. 2011; 11(9):1293-7. [DOI:10.1016/j.intimp.2011.04.011] [PMID]
- [15] Jiménez-Medina E, García-Lora A, Paco L, Algarra I, Collado A, Garrido F. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: Cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer*. 2006; 6:119. [PMID] [PMCID]
- [16] Wang S, Huang S, Ye Q, Zeng X, Yu H, Qi D, Qiao S. Prevention of cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice with the antimicrobial peptide sublaicin. *J Immunol Res*. 2018; 2018:4353580. [DOI:10.1155/2018/4353580] [PMID] [PMCID]
- [17] Esmaeili G, Van Laere K, Muylle H, Leus L. Artificial chromosome doubling in allotetraploid *Calendula officinalis*. *Front Plant Sci*. 2020; 11:622. [PMID] [PMCID]
- [18] Kontoghiorghes CN, Kolnagou A, Kontoghiorghes GJ. Phytochelators intended for clinical use in iron overload, other diseases of iron imbalance and free radical pathology. *Molecules*. 2015; 20(11):20841-72. [DOI:10.3390/molecules201119725] [PMID] [PMCID]
- [19] Neboh EE, Ufelle SA. Myeloprotective activity of crude methanolic leaf extract of *Cassia occidentalis* in cyclophosphamide-induced bone marrow suppression in Wistar rats. *Adv Biomed Res*. 2015; 4:5. [DOI:10.4103/2277-9175.148285] [PMID] [PMCID]
- [20] Fonseca YM, Catini CD, Vicentini FT, Nomizo A, Gerlach RF, Fonseca MJ. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. *J Ethnopharmacol*. 2010; 127(3):596-601. [DOI:10.1016/j.jep.2009.12.019] [PMID]
- [21] Sen A. Prophylactic and therapeutic roles of oleanolic acid and its derivatives in several diseases. *World J Clin Cases*. 2020; 8(10):1767-92. [DOI:10.12998/wjcc.v8.i10.1767] [PMID] [PMCID]
- [22] Leopoldini M, Russo N, Toscano M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem*. 2011; 125(2):288-306. [DOI:10.1016/j.foodchem.2010.08.012]
- [23] Varish DA, Amrith K, Mansi V, Vipin KG, Gupta SK. Therapeutic Potential of *Calendula officinalis*. *Pharm Pharmacol Int J*. 2018; 6(2):149-155. DOI: 10.15406/ppij.2018.06.00171
- [24] Krummenauer ME, Lopes W, Garcia AWA, Schrank A, Gnoatto SCB, Kawano DF, et al. A highly active triterpene derivative capable of biofilm damage to control *Cryptococcus* spp. *Biomolecules*. 2019; 9(12):831. [PMID] [PMCID]

- [25] K peli Akkol E, Gen Y, Karpuz B, Sobarzo-Sánchez E, Capasso R. Coumarins and coumarin-related compounds in pharmacotherapy of cancer. *Cancers (Basel)*. 2020, 12(7):1959. [PMID] [PMCID]
- [26] Paya M, Halliwell B, Hoult R. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species: Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochem Pharmacol*. 1992; 44(2):205-14. [DOI:10.1016/0006-2952(92)90002-Z]
- [27] Stringlis IA, de Jonge R, Pieterse CMJ. The age of coumarins in plant-microbe interactions. *Plant Cell Physiol*. 2019; 60(7):1405-19. [PMID] [PMCID]
- [28] Majnooni MB, Fakhri S, Smeriglio A, Trombetta D, Croley CR, Bhattacharyya P, et al. Antiangiogenic effects of coumarins against cancer: From chemistry to medicine. *Molecules*. 2019; 24(23):4278. [PMID] [PMCID]



This Page Intentionally Left Blank

