مهار همولیز گلبول‌های قرمز به وسیله عصاره هندوانه ابوجهل *Citrullus colocynthis* و خاس *Ilex spinigera* و کرات *Gleditsia caspica*

مریم مهاجرانی[1*]، منصوره دامنجانی[2]

۱- استادیار بیوشیمی، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، بابلسر، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، بابلسر، ایران

*آدرس مکاتبه: بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی

کدپستی: ۹۵۴۴۷ – ۴۷۴۱۶، تلفن: ۳۵۳۰۲۴۵۵ (۰۱۱)، نمابر: ۳۵۳۰۲۴۵۰ (۰۱۱)

پست الکترونیک: m.mohajerani@umz.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۱۸ **تاریخ تصویب:** ۹۴/۲/۲

چکیده

مقدمه: برخی مواد شیمیایی در گیاهان با نقش آنتی‌اکسیدان شناخته شده‌اند که دارای اثر مهار همولیز گلبول‌های قرمز نیز هستند. امروزه مصرف آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک به دلیل سمیت آنها محدود و توجه جوامع پزشکی به استفاده و یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی معطوف گشته است. گیاهان دارویی که بتوانند از همولیز سلول‌های خونی نظیر آنچه که در برخی بیماری‌ها وجود دارد، جلوگیری کنند از اهمیت زیادی برخوردارند.

هدف: در این مطالعه اثر عصاره متانولی برگ و گوشته گیاه هندوانه ابوجهل، برگ گیاه خاس و برگ و میوه گیاه کرات بر میزان مهار همولیز گلبول‌های قرمز خون مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: ابتدا عصاره متانولی از هر گیاه به روش سوکسله تهیه شد. نمونه‌های خون از افراد سالم تهیه و به دو گروه کنترل و تست تقسیم شد. جهت القای پراکسیداسیون گلبول‌های قرمز از ۲ و ´۲ آزوبیس (۲ آمیدینو پروپان) دی هیدرو کلرید (۳۵ میلی‌مولار) استفاده شد. اثر هر عصاره بر همولیز القایی گلبول‌های قرمز خون در ده غلظت (از ۵ تا ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. میزان همولیز با اندازه‌گیری مقدار هموگلوبین آزاد شده از سلول‌ها در حضور و عدم حضور هر عصاره با استفاده از روش رنگ‌سنجی در طول موج ۵۴۰ نانومتر تعیین شد.

نتایج: در بین عصاره‌های مطالعه شده برای عصاره متانولی برگ گیاه کرات IC_{50}، ۵/۵۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای عصاره متانولی برگ گیاه خاس IC_{50}، ۱۳/۸۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر یعنی بیشترین میزان مهار همولیز در برابر AAPH اندازه‌گیری شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل نشان می‌دهد که استفاده از گیاه‌های کرات و خاس به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی علاوه بر پیشگیری و یا درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله همولیز گلبول‌های قرمز خون بر اثر عوامل اکسید کننده می‌تواند قابل مطالعه باشد.

گل‌واژگان: آنتی‌همولیز، خاس، کرات، هندوانه ابوجهل، AAPH

مقدمه

گیاهان یکی از مهم‌ترین منابع طبیعی ارزشمند دارویی هستند که امروزه مورد توجه کشورهای پیشرفته جهان قرار گرفته‌اند و علاوه بر این به عنوان مواد اولیه جهت تبدیل به داروهای بی‌خطر برای انسان تلقی می‌شوند. در این زمینه ایران یکی از مالکان غنی‌ترین منابع گیاهان دارویی جهان به شمار می‌رود که دارای تنوع بالای شرایط زیستگاهی برای انواع این گیاهان می‌باشد [۱]. از زمان‌های بسیار قدیم، گیاهان دارویی در طب سنتی استفاده می‌شدند. آنها در سراسر جهان برای هزاران سال به عنوان داروهای طبیعی به کار گرفته می‌شدند [۲]. امروزه مطابق با برآورد سازمان جهانی سلامت (WHO)، نیازهای اولیه‌ی مراقبت از سلامت بیش از ۸۰ درصد مردم جهان وابسته به دارو و طب سنتی می‌باشد [۳]. انسان از دیرباز برای سلامت، پیشگیری، تسکین و درمان بیماری‌های خود گیاهان را مورد استفاده قرار می‌داده است. گیاهان دارویی و یا بخش‌هایی از آن را می‌توان به شکل‌های مختلف خام، عصاره، جوشانده، پودر شده و غیره مورد استفاده قرار داد. عصاره‌های بسیاری از گیاهان نیز به طور مستقیم و خام برای درمان بیماری‌ها استفاده می‌شوند [٤]. در صنعت داروسازی از گیاهان دارویی و ترکیبات شیمیایی فعال موجود در آنها همچون پلی‌فنول، فلاونوئید، گلیکوزید، آلکالوئید و تانن برای سنتز دارو استفاده می‌شود [٥]. علاوه بر مصارف پزشکی، در تغذیه اهمیت ویژه‌ای برای آنها در نظر گرفته‌اند چرا که حاوی بسیاری از مواد فعال بیولوژیکی همچون ویتامین‌ها هستند. از خواص با ارزش دیگر منابع گیاهی، استفاده از آنها به عنوان آنتی‌اکسیدان می‌باشد [٥]. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که قادرند اکسیداسیون مولکول‌های دیگر را کند کرده و یا از آنها جلوگیری کنند [٦]. گیاهان دارویی به دلیل دارا بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا دارای مزایایی همچون کاهش فشار خون، پیشگیری از بیماری‌های قلبی - عروقی، کاهش خطر ابتلا به سرطان، پارکینسون و غیره هستند [٥]. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی به علت اثرات جانبی نامطلوبی که بر سلامت انسان می‌گذارند به تدریج کاهش یافته و جای خود را به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی گیاهی داده‌اند [۷]. با توجه به مطالب ذکر شده اهمیت این موضوع روشن است که تحقیقات گسترده‌ای برای دست یافتن به ترکیبات طبیعی با خواص دارویی در جریان است.

همولیز در طول تاریخ جهت اندازه‌گیری آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد و مهار آن با آنتی‌اکسیدان‌ها کاربرد داشته است و مطالعات کمی با استفاده از گلبول‌های قرمز کامل در خون انجام گرفته است. همولیز گلبول‌های قرمز خون سیستم حساس‌تری برای ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدان گیاهان دارویی می‌باشد [۸]. از طرفی، گلبول‌های قرمز به دلیل غشای غنی از اسیدهای چرب غیراشباع [۷]، یکی از سلول‌های حساس به استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط رادیکال‌های آزاد هستند که به دلیل نقشی که در بدن بر عهده دارند به طور مداوم در معرض این رادیکال‌ها قرار می‌گیرند [۱۰، ۹]. در این مطالعه ما از یک تست زیستی بر اساس شکستن یا پارگی گلبول‌های قرمز با القا بوسیله رادیکال‌های آزاد در خون انسان بهره برده‌ایم. اکسیداسیون لیپیدهای غشای سلول‌ها بر اثر AAPH به آسیب غشایی و در نتیجه همولیز منجر می‌شود [۸] که این همولیز به کمک آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مهار می‌شود [۱۱]. با توجه به اینکه گزارشی راجع به بررسی فعالیت آنتی همولیز عصاره گیاهان هندوانه ابوجهل و خاس موجود نیست، این بررسی انجام شد تا در صورت مشاهده اثرات مطلوب، از این گیاهان در کاهش همولیز القا شده مولکول‌های رادیکالی یا برخی داروهای اکسیداتیو استفاده شود. در نهایت داروهایی با عوارض جانبی کمتر برای بیمارانی که به دلایل خاص مثل نقص آنزیم G6PD، به استرس اکسیداتیو حساس هستند، طراحی شود.

گیاه هندوانه ابوجهل از خانواده کوکوربیتاسه [۱۲]، در نواحی خشک جنوبی، جنوب شرقی، برخی نواحی شمال شرقی و دیگر نقاط ایران می‌روید [۱۳]. از دانه‌ی گیاه هندوانه در درمان دیابت، از برگ آن برای درمان زردی و آسم و از ریشه در درمان التهاب سینه، زردی و درد مفاصل استفاده می‌شود [١٤]. از خواص مهم دیگر این گیاه، اثر ضدویروسی، ضدمیکروبی و ضدسرطان آن است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی در برگ و ساقه‌ی گیا ه بیشتر از سایر بخش‌های آن اندازه‌گیری

شده است. از عصاره برگ آن که دارای گلیکوزیدهای کوکوربیتاسین E و B می‌باشد در مهار رشد سلول‌های سرطان سینه استفاده شده است [۱٦، ۱۵].

گیاه خاس، درختچه‌ای است همیشه سبز از تیره خاس (Aquifoliaceae) که در بیشتر مناطق جنگل‌های شمال می‌روید. این گیاه بومی ایران بویژه جنگل‌های گیلان، گلستان و مازندران و همچنین منطقه تالش آذربایجان می‌باشد. تیره خاس در ایران فقط دارای یک جنس با یک گونه است که دارای نام‌های محلی مختلف مانند خاس، خاش (دیلمان)، هس (آستارا)، گنگه (گیلان و تنکابن)، خچ، خج (اطراف رشت و تالش)، اِلاش یا اِلاس (نور و کجور)، تیغ گرگ یا وِرگ تِلی (مازندران) می‌باشد [۱۷]. این گونه با گونه *Ilex paraguariensis*، که در پاراگوئه واقع در شمال آرژانتین و جنوب برزیل می‌روید، ظاهراً تفاوت محسوسی ندارد. برگ‌های گونه *I. paraguariensis* به علت داشتن ترکیبات کافئینی مانند چای و قهوه، به صورت دم کرده در این مناطق مصرف می‌شود. همچنین به علت وجود تانن و ترکیبات دیگر، برگ آن مصارف دارویی دارد و به صورت خشک به کشورهای دیگر صادر می‌شود. برگ‌های گونه ایرانی درخت خاس (*I. spinigera*)، هرچند فاقد کافئین است ولی خواص دارویی دارد و از قدیم برای درمان مالاریا در بخش‌های شمالی ایران که منطقه رویش آن است مصرف می‌شده و هنوز هم کم و بیش استفاده می‌شود [۱۸]. برگ این گیاه، اثر مدر و ملین و تب‌بر و میوه آن قی‌آور و مسهل است [۱۷].

گیاه کرات *Gleditsia caspica* با نام محلی لیلکی، از خانواده Fabaceae است. این درخت بومی غرب آسیا، منطقه قفقاز آذربایجان و شمال ایران است. این جنس ١٤ گونه دارد و دامنه انتشار آن محدود به جنگل‌های آستارا تا نور می‌باشد. این گیاه در طب سنتی به طور گسترده‌ای کاربرد دارد. خارهای گونه *Gleditschia sinensis* Lam. برای درمان بیماری‌های پوستی همچون دمل بزرگ و گال استفاده می‌شود. در حالی که غلاف بالغ و میوه آن به طور عمده در درمان سکته، سردرد، سرفه و آسم استفاده می‌شود [۱۹]. میوه‌های خشک شده گونه *Gleditsia japonica* Miquel. در طب شرقی به عنوان داروی مدر و خلط‌آور استفاده می‌شود. ساپونین ماده‌ی اصلی میوه‌های گونه‌های مختلف این جنس است. ساپونین جدا شده از گونه‌های مختلف این جنس دارای خواص ضدزخم، ضدالتهاب و ضدآلرژی است. مثلاً ساپونین C جدا شده از میوه گونه *G. japonica* به عنوان اولین نمونه‌های ساپونین تری‌ترپنی با فعالیت قابل توجه ضد HIV گزارش شد [۲۰].

مواد و روش‌ها

مواد

حلال متانول با خلوص ۹۹/۵ درصد از شرکت مرک، AAPH با درصد خلوص ۹۸ از شرکت آکروس، اسیدآسکوربیک با خلوص ۹۹ درصد از شرکت مرک می‌باشند.

جمع‌آوری نمونه

برای عصاره‌گیری، از بخش‌های گوشته و برگ گیاه هندوانه ابوجهل، برگ گیاه خاس و برگ و میوه گیاه کرات استفاده شد که به ترتیب از شهرستان ارزوئیه استان کرمان و جنگل‌های سنگچال شهرستان آمل استان مازندران و جنگل‌های زیار و شهرستان آمل استان مازندران جمع‌آوری و توسط هرباریوم زیست‌شناسی دانشگاه مازندران شناسایی شدند.

نمونه‌های خون افراد سالم از مرکز بهداشت و آزمایشگاه پاتولوژی و تشخیص طبی شهرستان بابلسر تهیه شد.

عصاره‌گیری و تغلیظ عصاره

جهت استخراج عصاره از گیاه خشک شده، ابتدا بخش‌های مورد استفاده گیاهان مذکور در دمای اتاق و دور از نور مستقیم خورشید خشک شده و با آسیاب به صورت پودر یکنواختی درآورده شد تا سطح تماس بیشتری با حلال داشته باشند. سپس عمل استخراج برای ۲۰ گرم پودر خشک شده اندام گیاهی در ۳۰۰ میلی‌لیتر متانول ۹۹/۵ درصد به روش سوکسله در دمای ۵۰ تا ۷۰ درجه به مدت ١٤ ساعت انجام داده شد. بدین‌ترتیب استخراج عصاره به روش سوکسله برای هر قسمت

به طور جداگانه انجام شد. سپس برای تغلیظ عصاره‌های مذکور، از دستگاه تبخیر کن چرخان دمای ٤٠ درجه استفاده شد.

تهیه سوسپانسیون گلبولی

بدین‌ترتیب که خون افراد سالم در لوله‌های هپارینی جمع‌آوری و سپس گلبول‌های قرمز آن به وسیله‌ی سانتریفیوژ به مدت ١٠ دقیقه با دور ٣٠٠٠ rpm از پلاسما جدا شد. آنگاه سه بار با بافر فسفات سالین با pH: ٧/٤ شستشو داده شد. در آخرین مرحله شستشو، به مدت ١٠ دقیقه با دور ١٢٠٠٠ g سانتریفوژ انجام شد [٩].

سنجش اثر عصاره گیاهان بر گلبول قرمز

برای بررسی اثر عصاره بر گلبول قرمز، غلظت‌های ٠، ٢٠، ٤٠، ٦٠، ٨٠، ١٠٠ و ١٥٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره گیاهان در بافر فسفات تهیه شد و سپس اثر آن بر گلبول‌های قرمز خون پس از ٣٠ دقیقه انکوباسیون در ٣٧ درجه سانتی‌گراد مورد سنجش قرار گرفت.

تعیین غلظت مؤثر AAPH در همولیز گلبول‌های قرمز خون

غلظت‌های ٢٥ تا ١٠٠ میلی‌مولار از محلول AAPH در لوله‌های آزمایش با ٠/١ میلی‌لیتر سوسپانسیون گلبولی در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت در بن‌ماری انکوبه شده و سپس به مدت ١٠ دقیقه با دور ٤٠٠٠ rpm سانتریفوژ شدند. آنگاه جذب محلول فوقانی در ٥٤٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. بدین‌ترتیب غلظتی از AAPH که موجب ٥٠ درصد همولیز گلبول قرمز می‌شود، با رسم نمودار و به کمک رگرسیون خطی، به دست آورده شد. میزان درصد همولیز برای هر غلظت AAPH به کمک رابطه زیر محاسبه شد:

$$(OD_{AAPH} / OD_{Water}) \times 100$$

OD_{AAPH}: جذب نمونه خون در مجاورت AAPH

OD_{Water}: جذب نمونه خون در مجاورت آب مقطر

سنجش فعالیت آنتی‌همولیز عصاره گیاهان

در این مورد هم غلظت‌های ٠، ٥، ١٠، ١٥، ٢٠، ٤٠، ٦٠، ٨٠، ١٠٠ و ١٥٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره گیاهان در بافر فسفات تهیه شد و سپس آزمایش‌هایی در دو گروه تست و شاهد که فاقد هر گونه عصاره گیاهی بود، انجام شد. به هر یک از لوله‌های تست ٠/١ میلی‌لیتر عصاره گیاهی موردنظر و به لوله‌های شاهد معادل آن بافر افزوده شد. سپس به هر دو سری لوله ٠/٩ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین (PBS) و ٠/١ میلی‌لیتر سوسپانسیون گلبولی اضافه شد. آنگاه لوله‌ها به مدت ٣٠ دقیقه در بن‌ماری ٣٧ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد [٨]. پس از مخلوط کردن با ١ میلی‌لیتر AAPH (٣٥ میلی‌مولار)، ٢ ساعت در بن‌ماری ٣٧ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس به مدت ١٠ دقیقه با دور ٤٠٠٠ rpm سانتریفوژ شد [١١، ١٠، ٩]. آنگاه جذب محلول فوقانی در ٥٤٠ نانومتر که بیانگر میزان هموگلوبین آزاد شده از سلول‌ها یعنی میزان همولیز می‌باشد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد [١١، ٧]. میزان درصد مهار همولیز عصاره‌ها به کمک رابطه زیر محاسبه شد [١٠]:

$$(OD_{AAPH} - OD_{test} / OD_{AAPH}) \times 100$$

به عنوان کنترل مثبت از آسکوربیک اسید استفاده شد.

آنالیز آماری

تمامی نمودارها به کمک نرم‌افزار Microsoft excel نسخه ٢٠١٠ ترسیم شد و داده‌ها با آزمون one sample T test و آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) توسط برنامه نرم‌افزاری SPSS 21 بررسی شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار و تفاوت آماری در سطح معنی‌دار ٥ درصد ($p < ٠/٠٥$) ارائه شد.

نتایج

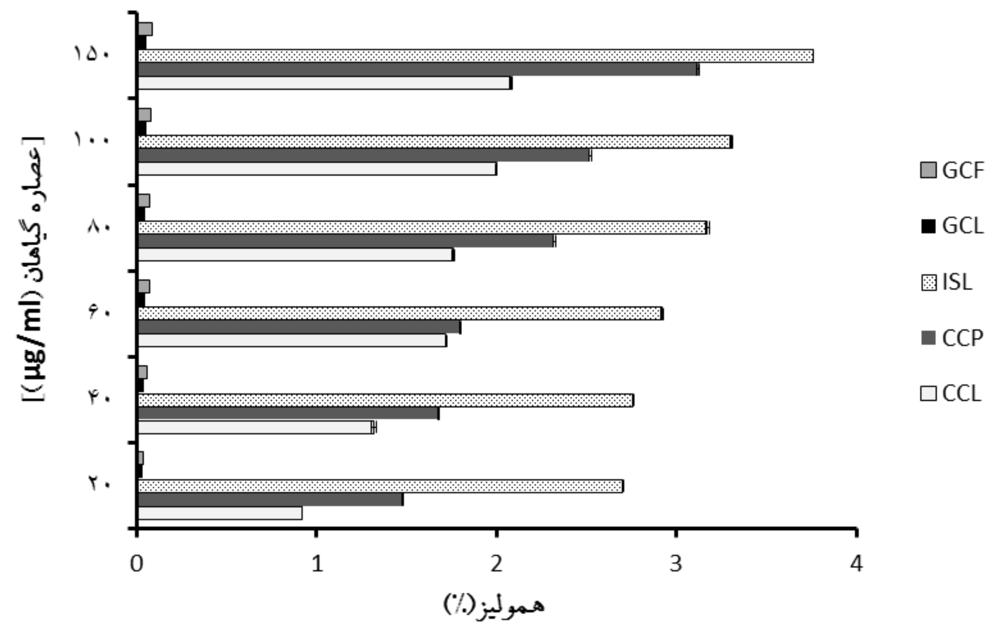
اثر عصاره گیاهان بر گلبول‌های قرمز

بعد از ٣٠ دقیقه انکوباسیون عصاره متانولی برگ و گوشته گیاه هندوانه ابوجهل، برگ گیاه خاس و برگ و میوه گیاه

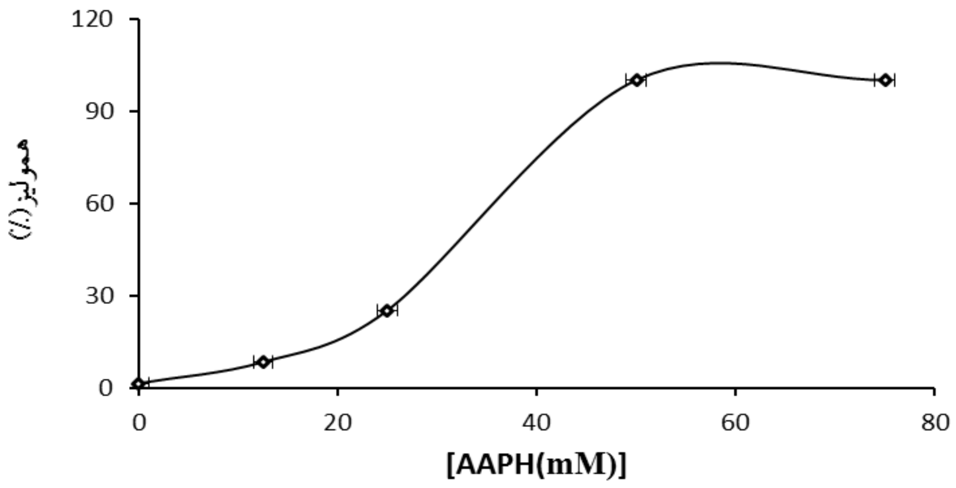
کرات با گلبول‌های قرمز، میزان درصد همولیز گلبول‌های قرمز نسبت به مقدار عصاره به کار رفته در آزمایش در نموداری رسم و نتایج اندازه‌گیری در نمودار شماره ۱ آورده شده است که در آن CCL به عصاره برگ هندوانه ابوجهل، CCP به عصاره گوشته هندوانه ابوجهل، ISL به عصاره برگ گیاه خاس، GCL به عصاره برگ کرات و GCF به عصاره میوه گیاه کرات اشاره دارد. نتایج مطالعات نموداری در این مورد نشان داد که مقایسه میزان درصد همولیز ناشی از عصاره‌ها با میزان همولیز گلبول‌های قرمز با آب مقطر (۱۰۰ درصد همولیز)، مشخص نموده که عصاره هر سه گیاه اثر همولیزکننده بر گلبول‌های قرمز خون ندارند. نتایج مطالعات آماری هم آن را تأیید می‌کند که تمامی عصاره‌ها تفاوت معنی‌داری را در برابر همولیز آب از خود نشان دادند ($p< ۰/۰۰۱$).

اثر AAPH بر گلبول‌های قرمز خون انسان

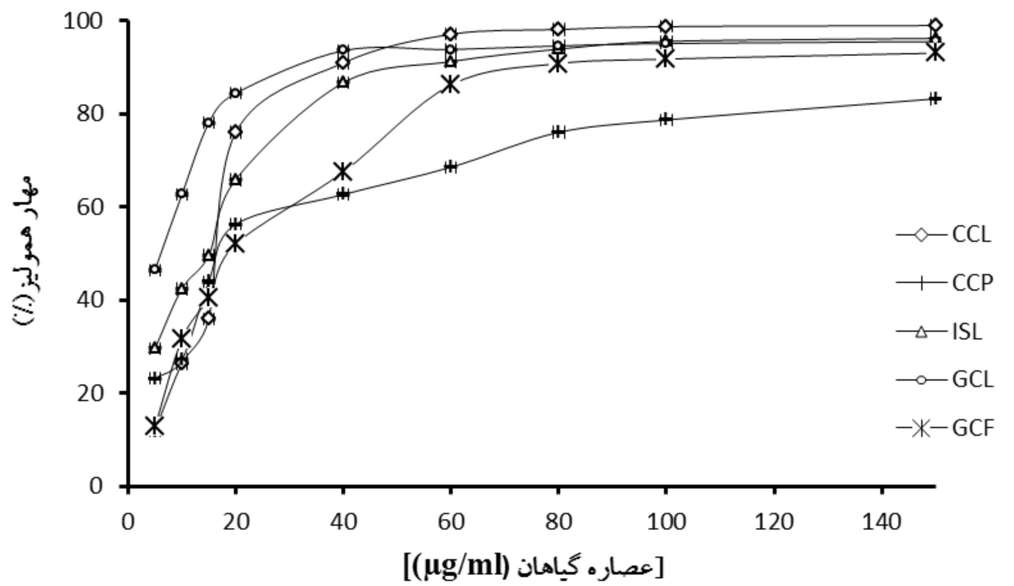
از AAPH برای ایجاد همولیز در محیط آزمایشگاهی استفاده شد. بدین‌ترتیب که بعد از انکوباسیون ۲ ساعته AAPH با گلبول‌های قرمز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با توجه به نمودار شماره ۲، غلظت ۳۵ میلی‌مولار از این ماده به کمک رگرسیون خطی به دست آورده شد که می تواند به ۵۰ درصد همولیز در گلبول‌های قرمز منجر شود.



نمودار شماره ۱- اثر عصاره متانولی گیاهان هندوانه ابوجهل، خاس و کرات بر گلبول قرمز خون انسان. همان‌طور که مشاهده می‌شود هیچ‌یک از عصاره‌ها اثر همولیزکننده‌ی قابل توجهی بر گلبول قرمز نداشتند و نهایت میزان همولیز حدود ٤ درصد بوده است که در قیاس با همولیز کامل (۱۰۰ درصد) با آب مقطر قابل چشم‌پوشی است. تمامی عصاره‌ها تفاوت معنی‌داری را در برابر همولیز آب از خود نشان دادند ($p<۰/۰۰۱$). این نتایج حاصل سه تکرار در هر مورد می‌باشد (میانگین ± SD).



نمودار شماره ۲- اثر همولیزکنندگی AAPH بر گلبول قرمز. با توجه به رگرسیون خطی نمودار، غلظت ۳۵ میلی‌مولار AAPH موجب ۵۰ درصد همولیز گلبول‌های قرمز شد. این نتایج حاصل سه تکرار در هر مورد می‌باشد (میانگین ± SD)



نمودار شماره ۳- اثر مهاری غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گیاهان مورد مطالعه در برابر همولیز ناشی از AAPH. این نتایج حاصل سه تکرار در هر مورد می‌باشد (میانگین ± SD)

سنجش فعالیت عصاره گیاهان در برابر همولیز القایی AAPH

بعد از انکوباسیون سوسپانسیون گلبولی با هر عصاره به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محلول به مدت دو ساعت با AAPH در همین دما انکوبه شد و سپس میزان جذب محلول فوقانی در ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. نتایج با به دست آوردن میزان IC_{50} برای هر قسمت گیاهان مطرح شد که در جدول شماره ۱ آورده شده است. به ترتیب عصاره متانولی برگ گیاه کرات با IC_{50} ۵/۵۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین میزان مهار همولیز و

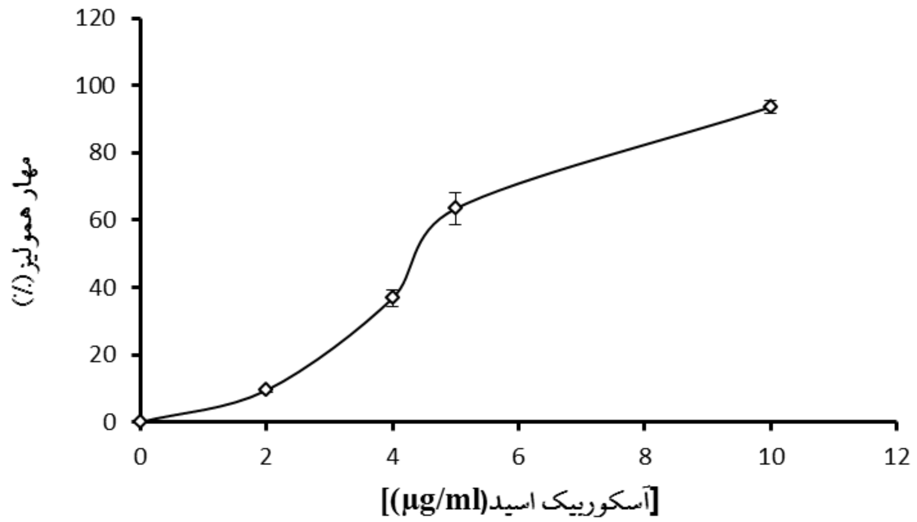
عصاره متانولی میوه گیاه کرات با IC_{50} ۱۸/۷۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر کمترین میزان مهار همولیز در برابر AAPH را از خود نشان دادند (نمودار شماره ۳). در این تست از آسکوربیک اسید به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. با توجه به نمودار شماره ٤ میزان IC_{50} برای آسکوربیک اسید ٤/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آورده شد که قابل قیاس با عصاره متانولی گیاه کرات می‌باشد.

در نمودار شماره ۵ تفاوت میزان مهار همولیز به وسیله عصاره‌های مورد مطالعه و با کنترل مثبت (آسکوربیک اسید) در یک نمودار نشان داده شده است که در آن CCL به عصاره برگ هندوانه ابوجهل، CCP به عصاره گوشته هندوانه ابوجهل، ISL به عصاره برگ گیاه خاس، GCL به عصاره برگ کرات، GCF به عصاره میوه گیاه کرات و AA به اسید آسکوربیک اشاره دارد.

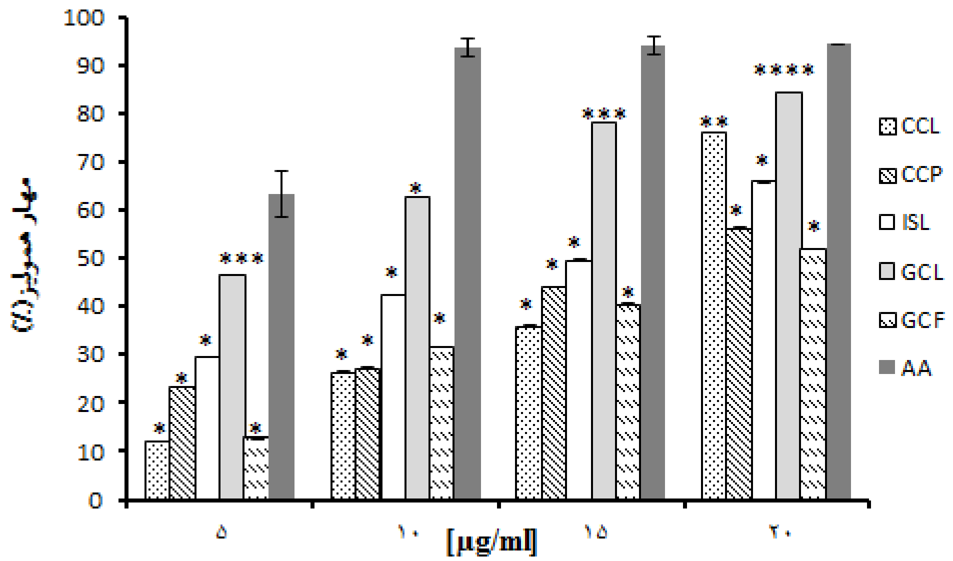
جدول شماره ۱- میزان IC_{50} عصاره متانولی برگ خاس، گوشته و برگ هندوانه ابوجهل و برگ و میوه گیاه کرات برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر

میوه گیاه کرات	برگ گیاه کرات	برگ گیاه خاس	برگ هندوانه ابوجهل	گوشته هندوانه ابوجهل	عصاره متانولی گیاهان
۱۸/۷۳ ± ۰/۰٤۸	۵/۵۸ ± ۰/۰۳	۱۳/۸۵ ± ۰/۰۲	۱۵/۵۷ ± ۰/۰٤	۱۷/۸۱ ± ۰/۰٤	IC_{50} (µg/ml)

سوسپانسیونی از گلبول قرمز تهیه شده، سپس به آن محلول AAPH به عنوان ماده همولیزکننده غشای گلبول‌های قرمز اضافه می‌شود و میزان هموگلوبین آزاد شده در حضور و غیاب عصاره‌ها در طول موج ۵٤۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است.



نمودارشماره ٤- اثر مهاری غلظت‌های مختلف آسکوربیک اسید بر همولیز القایی AAPH. هر یک از نقاط حاصل سه تکرار (میانگین ± SD) برای هر غلظت آسکوربیک اسید می‌باشد. با توجه به نمودار و به کمک رگرسیون خطی میزان IC_{50}: 4.5 (µg/ml) برای آسکوربیک اسید گزارش شد.



نمودار شماره ۵- مقایسه اثر مهار همولیز القایی بوسیله عصاره گیاهان با اثر آسکوربیک اسید در غلظت‌های برابر. بهترین اثر مهاری را عصاره متانولی برگ گیاه کرات نشان داد که قابل قیاس با کنترل مثبت (آسکوربیک اسید) است. میزان مهار با عصاره مذکور در بیشترین غلظت مورد استفاده (۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر) تفاوت معنی‌داری با مهار نمونه کنترل از خود نشان نداد (p>۰/۰۵). در نمودار معنی‌داری نسبت به کنترل p<۰/۰۰۱ با * و p<۰/۰۱ با ** و p<۰/۰۵ با * و عدم تفاوت معنی‌داری با **** مشخص شده است.**

همچنین نتایج آماری نشان داد که عصاره متانولی برگ گیاه کرات در بیشترین غلظت قابل قیاس با نمونه کنترل مثبت یعنی در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در صورت شرایط معنی‌داری با p<۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری را نسبت به نمونه کنترل در مهار همولیز گلبول‌های قرمز در برابر AAPH از خود نشان نداد. در غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تمام عصاره‌های گیاهان مورد استفاده تفاوت معنی‌داری را با p<۰/۰۰۱ نسبت به نمونه کنترل از خود نشان دادند به جز عصاره برگ گیاه کرات که p<۰/۰۵ را نشان داد. در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تمامی عصاره‌های گیاهان مورد استفاده تفاوت معنی‌داری را با p<۰/۰۰۱ نسبت به نمونه کنترل از خود نشان دادند. در غلظت ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تمامی عصاره‌های گیاهان مورد استفاده با p<۰/۰۰۱ تفاوت معنی‌داری را نسبت به نمونه کنترل از خود نشان دادند به جز عصاره برگ گیاه کرات که p<۰/۰۵ را نشان داد. در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره برگ گیاه هندوانه ابوجهل با p<۰/۰۱، عصاره بخش گوشته هندوانه ابوجهل و برگ گیاه خاس و میوه کرات با p<۰/۰۰۱ تفاوت معنی‌داری را نسبت به نمونه کنترل از خود نشان دادند و تنها برگ گیاه کرات با p>۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری را نسبت به نمونه کنترل از خود نشان نداد. به طور کلی در این مطالعه نشان داده شد که عصاره متانولی برگ گیاه کرات می‌تواند با قدرت، همولیز ناشی از AAPH را مهار کند.

بحث

علی‌رغم وجود آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در پلاسما، سیستم دفاعی بدن به تنهایی قادر به از بین بردن رادیکال‌های آزاد ایجاد شده در بدن نیست و به همین جهت نیاز به تأمین آنتی‌اکسیدان‌ها از منابع طبیعی دارد که عمدتاً به وسیله منابع گیاهی تأمین می‌شود [۲۱]. همچنین شواهد زیادی مبنی بر مضر بودن آنتی‌اکسیدان‌های ساختگی وجود دارد که باعث بیماری‌های مختلف از جمله آسیب کبدی و ایجاد سرطان در حیوانات آزمایشگاهی شده‌اند. بنابراین نیاز به آنتی‌اکسیدان‌های قوی با سمیت کمتر و اثربخشی بیشتر یک ضرورت اجتناب‌ناپذیر است که در بسیاری از گیاهان وجود دارد [۲۲].

موضوع رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن و اثرات آنها بر سیستم بیولوژیک، یکی از مباحث مهم و مطرح در

پزشکی است. این عوامل می‌توانند به طور برگشت‌ناپذیر به مولکول‌های حیاتی نظیر اسیدنوکلئیک، پروتئین‌ها، لیپیدها و لیپوپروتئین‌ها آسیب وارد نماید. آنتی‌اکسیدان‌ها قادرند سیستم‌های بیولوژیک را در برابر این عوامل حفاظت نمایند [۲۳].

بعضی عصاره‌های گیاهی اثرات آنتی‌اکسیدانی خیلی قوی دارند که این خاصیت در بسیاری از گیاهان مورد بررسی قرار گرفته است [۲۸-۲٤]. گیاهانی که از نظر خواص آنتی‌اکسیدانی دارای پتانسیل بالایی باشند، معمولاً خواص آنتی‌همولیز بهتری را نیز از خود نشان می‌دهند.

در سال ۱۳۸۳در مطالعه‌ای نشان داده شد که هر چه غلظت عصاره گیاه دارویی در محیط آزمایشی افزایش یابد، میزان همولیز گلبول قرمز نیز کمتر می‌شود. آنها با بررسی ۲۸ گیاه دارویی نشان دادند که تعدادی از گیاهان همچون گل سرخ، مرزنجوش، مریم‌گلی دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی بالایی بوده و توانایی بیشتری در مهار همولیز گلبول قرمز در برابر عامل اکسیدان (آب اکسیژنه) از خود نشان دادند. این امر به دلیل دخالت آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره گیاهان دارویی در خنثی‌سازی پراکسید هیدروژن و یا رادیکال‌های آزاد به وجود آمده در نتیجه حمله این مولکول به مولکول‌های بیولوژیکی است [۲۳]. این موضوع در مورد بررسی انجام شده ما هم صدق می‌کند. در بررسی انجام شده با افزایش غلظت عصاره‌های گیاهی میزان مهار همولیز گلبول‌های قرمز در برابر AAPH افزایش یافت.

در سال ۲۰۱۳ برگ گیاه هندوانه ابوجهل مورد مطالعه قرار گرفت. این گیاه دارای ترکیبات شیمیایی مختلف مانند استروئیدها، آلکالوئیدها، فلاونوئید، کربوهیدرات، پروتئین، گلیکوزید، ساپونین، اسیدآمینه و ترکیبات فنلی می‌باشد که آن را به گیاهی مفید در درمان بیماری‌های مختلف و ساخت داروهای مفید برای استفاده انسان مبدل کرده است. این گیاه در طب سنتی مفید شناخته شده است پس استانداردسازی آن برای استفاده در داروسازی دارای اهمیت می‌باشد [۱۲]. در سال ۲۰۱۰ با بررسی گیاه هندوانه ابوجهل گزارشی نیز به چاپ رسیده است که برگ این گیاه دارای خواص زیستی قابل توجهی می‌باشد که از جمله آن می‌توان به خواص ضدمیکروبی، ضددیابت، آنتی‌اکسیدان، بی‌حس کننده موضعی و ضدالتهاب اشاره کرد [١٦].

در گزارشی که قبلاً در گروه ما انجام شد، نشان داده شد که ریشه و گوشته هندوانه ابوجهل دارای قدرت احیاکنندگی و به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH بوده و در اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی کل نیز دارای وابستگی غلظتی می‌باشد. عصاره متانولی ریشه در تمام این آزمایش‌ها به عنوان آنتی‌اکسیدان قوی‌تر از گوشته ظاهر شده است [۲۹]. این موضوع در بررسی حاضر هم نشان داده شد. در مطالعه حاضر با افزایش غلظت عصاره‌های گیاهی در برابر مهار همولیز گلبول‌های قرمز با AAPH رفتار افزایشی از خود بروز داده‌اند. در این مطالعه برگ گیاه هنداونه ابوجهل مهار همولیز خوبی را مخصوصاً در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از خود نشان داد که قابل قیاس با آسکوربیک اسید در همین غلظت است که نمایانگر ترکیبات مفید موجود در آن است که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. همانطور که در نمودار شماره ۳ مشاهده می‌شود میزان IC_{50} اندازه‌گیری شده برای عصاره متانولی برگ گیاه مذکور ۱۵/۵۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد که نسبت به گوشته آن با مقدار ۱۷/۸۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر مهاری قوی‌تری را از خود نشان داد.

گیاه خاس (*Ilex spinigera*) یکی از گیاهان بومی ناحیه جنگل‌های مازندران می‌باشد، که تنها یک جنس و یک گونه از این گیاه در ایران وجود دارد، که تا به امروز تحقیقات زیادی روی آن صورت نگرفته است و اطلاعات علمی در مورد گیاه *Ilex spinigera* در دسترس نمی‌باشد، گونه اروپایی این گیاه، یعنی *Ilex paraguariensis* که بومی آرژانتین و جنوب برزیل است، ظاهراً تفاوت محسوسی با این گونه‌ی ایرانی ندارد [۱۸] و تحقیقات گسترده‌ای در مورد خواص این گیاه وجود دارد.

در بررسی که بر روی عصاره‌های آبی و الکلی برگ گیاه *I. paraguariensis* انجام شد، عصاره آبی این گیاه در مهار گسترش اتواکسیداسیون LDL و اکسیداسیون وابسته به H_2O_2، فعالیت زیادی داشته است و حتی قابل مقایسه با

آسکوربیک اسید بوده است و عصاره الکلی توانایی کمتری از خود نشان داده است [۳۰، ۲۸]. در بررسی خواص آنتی‌اکسیدان عصاره آبی گیاه *I. paraguariensis* نتایج نشان داده‌اند که این عصاره، پراکسیداسیون آنزیمی و غیر آنزیمی لیپیدها را مهار می‌کند. همچنین این عصاره از طریق افزایش توان سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی موجود زنده در برابر رادیکال های آزاد، قدرت مهار رادیکال DPPH و پراکسیداسیون وابسته به H_2O_2 در غشای سلول قرمز را هم دارد [۳۱]. در بررسی مقایسه‌ای این گونه *I. paraguariensis* و برخی گونه‌های دیگر آن، نتایج نشان داد که این گونه دارای بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی است [۳۲]. در گزارشی دیگر نشان داده شد که *I. paraguariensis* دارای ترکیبات کافئیک اسید، کافئین، گلوکورونیک اسید، کوئرستین، کوئینیک اسید و روتین است. علاوه بر این دارای خاصیت تحریک سیستم عصبی مرکزی، ادرارآور و سودمند برای سیستم قلبی عروقی است و همچنین برای کنترل چاقی پیشنهاد شده است. همچنین عصاره این گیاه از DNA در برابر اکسیداسیون محافظت می‌کند و از لیپوپراکسیداسیون LDL جلوگیری می‌کند [۳۳].

از طرفی در تحقیقات اخیر مشخص شد که این گیاه یک نمونه عالی برای تحقیقات در زمینه‌های خواص آنتی‌اکسیدان، مدل‌های شیمیایی و همچنین مطالعات *in vitro* لیپوپروتئین‌ها، چربی خون، اثرات ضد سرطان و غیره می‌باشد. *I. paraguariensis* باعث کاهش سطح LDL و کلسترول در خون انسان می‌شود و همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی پلاسما و بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در انسان توسط این گیاه به طور مثبت تنظیم می‌شود و به عنوان یک ضد سرطان باعث کاهش شکست DNA دو رشته‌ای می‌شود و یک عامل مؤثر در کاهش استرس‌های اکسیداتیو است [۳٤]. نتایج ارزیابی‌های ما هم این فعالیت‌های گیاه را تأیید و علاوه‌بر آن نشان می‌دهد که عصاره متانولی برگ گیاه خاس توانایی مهار همولیز گلبول‌های قرمز را در برابر AAPH داراست.

سومین گیاهی که مورد مطالعه قرار گرفت، گیاه کرات *Gleditsia caspica* از جنگل‌های مازندران می‌باشد که تنها بر روی میوه این گیاه تحقیقاتی انجام شده که منجر به شناسایی و جداسازی ترکیبات ساپونین شده است که خواص درمانی متعددی برای آنها گزارش شده است [۲۱، ۲۰].

در آزمایش‌های ما عصاره متانولی هر سه گیاه هیچ همولیزی روی گلبول قرمز موجب نشدند که در نمودار شماره ۱ قابل مشاهده می‌باشد. بنابراین از عصاره این گیاهان برای آزمایش مهار و یا کاهش همولیز القا شده توسط ترکیب شیمیایی AAPH در گلبول قرمز استفاده شد. همان‌گونه که در شکل شماره ۵ نشان داده شده است با مقایسه میزان مهار این عصاره‌های گیاهی با آسکوربیک اسید که از آن به عنوان کنترل مثبت استفاده شد، عصاره برگ گیاه کرات با IC_{50} برابر ۵/۵۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بالاترین اثر مهار همولیز را نشان داد. از مقایسه فعالیت عصاره‌ها مشخص شده است که عصاره‌های برگ کرات و همچنین برگ هندوانه ابوجهل در غلظت‌های ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بالاتر بسیار شبیه اسید آسکوربیک عمل می‌نمایند.

نتیجه‌گیری

بدون شک با مطالعات بیشتر بر روی خواص آنتی‌اکسیدان و آنتی همولیز عصاره گیاهان کرات و خاس به عنوان عوامل مهارکننده در استرس‌های اکسیداتیو و نیز در برابر عوامل تضعیف‌کننده و شکننده غشا گلبول‌های قرمز خون امکان توسعه داروهای جدید در زمینه درمان همولیز سلول‌های خون افراد بیمار مخصوصاً با نقص آنزیم گلوکز ٦- فسفات دهیدروژناز وجود دارد. لذا پس از جداسازی و شناسایی ترکیبات موجود در عصاره‌های مذکور، بررسی مکانیسم‌های اعمال اثر ضد همولیز برای درک بهتر اثربخشی دارو و هدایت مطالعات بعدی جهت کاربردی شدن تحقیقات موردنیاز می‌باشد. در نتیجه بایستی عوارض جانبی احتمالی گیاهانی که در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته‌اند در حیوانات آزمایشگاهی و یا انسان نیز در پژوهش‌های آینده مورد ارزیابی قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

از آنجایی که بودجه‌بندی این تحقیق از سوی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه مازندران تأمین اعتبار شده است بدینوسیله از ایشان تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Haghiroalsadat F, Bernard F, Klantar M, Sheikhha MH, Hokmollahi F, Azimzadeh M and Houri M. *Buniumpersicum* (Black Caraway) of Yazd province: Chemical assessment and evaluation of its antioxidant effects. *J.S.S.U.* 2010; 18: 284 - 91.

2. Krishnaiah D, Sarbatly R and Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod. Process*. 2011; 89: 217-233.

3. Vikas SH, KL D, Pooja SH and Parul SH. Indian herbal medicine- A natural cure to asthma. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Res*. 2013; 14: 302 - 10.

4. Boxall AB, Johnson P, Smith EJ, Sinclair CJ, Stutt E and Levy LS. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *J. Agr. Food Chem*. 2006; 54: 2288 - 97.

5. Skrovankova S, Mišurcová L and Machů L. Antioxidant activity and protecting health effects of common medicinal plants. *Adv. Food Nutr*. Res. 2012; 67: 75.

6. Chaturvedi M and Kataria N. Assessment of role of antioxidants in erythrocytes of Marwari goat from arid tracts in India to evaluate oxidative stress. *ELABA Bioflux*. 2013; 5: 1 - 8.

7. Eshraghi A, Movahedian AA, Asgari S, Naderi GA and Badiee A. Antioxidant effect of *Ziziphusvulgaris*, *Portulacaoleracea*, *Berberisintegerrima* and *Gundeliatournefortii* on lipid peroxidation, Hb glycosylation and red blood cell hemolysis. *J. Med. Plants* 2011; 10: 80 - 8.

8. Shiva Shankar Reddy CS, Subramanyam MVV, Vani Rand Asha Devi S. In vitro models of oxidative stress in rat erythrocytes: Effect of antioxidant supplements. *Toxicol. in vitro* 2007; 21 (8): 1355 - 64.

9. Asgary S, Naderi GH, Ghanadi AR, Gharipour M and Golbon S. Protective effect of *Achilleamillefolium*, *Crataeguscurvisepala* and *Matricariachamomilla* on oxidative hemolysis of human erythrocytes and -SH capacity. *J. Med. Plants* 1382; 2: 41 - 8.

10. Pannangpetch P, Laupattarakasem P, Kukongviriyapan V, Kukongviriyapan U, Kongyingyoes B and Aromdee C. Antioxidant activity and protective effect against oxidative hemolysis of Clinacanthusnutans (Burm. f) Lindau. *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 2007; 291: 1 - 9.

11. Asgary S, Naderi GH and Askari N. Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. *Exp. Clin. Cardiol*. 2005; 10: 88.

12. Talole B, Bahet G and Waje K. Pharmacognostic study of *Citrullus colocynthis* linn schard leaves. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*. 2013; 5(3): 198 - 201.

13. Andersen JS. Cucurbitaceae. In: Rechinger KH.(ed.). Flora Iranica. Akademische Druck und Verlagsanstalt, Graz Austria. 1977, vol. 123, p: 5.

14. Al-Ghaithi F, El-Ridi MR, Adeghate E and Amiri MH. Biochemical effects of *Citrulluscolocynthis* in normal and diabetic rats. *Mol Cell Biochem*. 2004; 261 (1): 143 - 9.

15. Tannin-Spitz T, Grossman S, Dovrat S, Gottlieb HE and Bergman M. Growth inhibitory activity of cucurbitacinglucosides isolated from *Citrulluscolocynthis* on human breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol*. 2007; 73 (1): 56 - 67.

16. Gurudeeban S, Satyavani K and Ramanathan T. Bitter Apple (*Citrullus colocynthis*): An

Overview of Chemical Composition and Biomedical Potentials. *Asian. J. Plant Sci.* 2010; 9 (7): 394 - 401.

17. Zargari A. Medicinal Plants. Tehran University of Medical Sciences. 1997, p: 3.

18. Ghahreman A. Plant systematic: cormophytes of Iran. Tehran University of Medical Sciences. 1995, vol 2. 842 pp.

19. Yassin NZ, Melek FR, Selim MA, Kassem, IAA. Pharmacological activities of saponin-containing fraction derived from *Gleditsia caspica* Desf. methanolic fruit extract. *Der Pharmacia Lettre* 2013; 5 (2): 247 - 53.

20. Miyase T, Melek FR, Warashina T, Selim MA, El Fiki NM and Kassem IA. Cytotoxic triterpenoidsaponinsalicylated with monoterpenic acids from fruits of *Gleditsia caspica* Desf. *Phytochemistry* 2010; 71 (16): 1908 - 16.

21. Gao Z, Huang K, Yang X and Xu H. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *BBA-GEN. Subjects* 1999; 1472 (3): 643 - 50.

22. Frankel EN and German JB. Antioxidants in foods and health: problems and fallacies in the field. *J. Sci. Food Agr.* 2006; 86 (13): 1999 - 2001.

23. Zarban A, Mlkanh M, Hasanpour M, Najari MT and Abad M. Evaluation of antioxidant properties of medicinal plants of 28 cases of Iranian medicinal plants. *J. Birjand Univ. Med. Sci.* 2005; 1: 9 - 15.

24. Chu YH, Chang CL, and Hsu HF. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *J. Sci. Food Agr.* 2000; 80: 561 - 6.

25. Chu Mantle D, Eddeb F and Pickering AT. Comparison of relative antioxidant activities of British medicinal plant species in vitro. *J. Ethnopharmacol.* 2000; 72: 47 - 51.

26. Oke JM and Hamburger MO. Screening of some Nigerian medicinal plants for antioxidant activity using 2, 2, diphenyl-picryl-hydrazyl radical. *Afr. J. Biomed. Res.* 2002; 5: 77 - 79.

27. Pourmorad F, Hosseinimehr SJ and Shahabimajd N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Afr. J. Biotechnol.* 2006; 5(11): 1142 - 45.

28. Gugliucci A and Stahl AJ. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1995; 35 (1): 47 - 56.

29. Mohadjerani M and Shokohsaljoghi E. Evaluation of antioxidant activity of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. extracts and their effect on urease activity. *Ethno-Pharmaceutical Products* 2014; 1 (1): 53 - 8.

30. Gugliucci A. Antioxidant Effects of *Ilex paraguariensis*: Induction of decreased oxidability of human LDL *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1996; 224 (2): 338 - 44.

31. Schinella GR, Troiani G, Dávila V, De Buschiazzo PM and Tournier HA. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2000; 269 (2): 357 - 360.

32. Filip R, Lotito SB, Ferraro G and Fraga CG. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutr. Res*. 2000; 20 (10): 1437 - 46.

33. Heck CI and De Mejia EG. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J.Food Sci.* 2007; 72 (9): R138 - R151.

34. Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T and Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *J. Ethnopharmacol*. 2011; 136 (3): 378 - 84.

Inhibition of Hemolysis of Red Blood Cells by Citrullus colocynthis, *Ilex spinigera* and *Gleditsia caspica* Extracts

Mohadjerani M (Ph.D.)[1*], Damanjany M (M.Sc.)[1]

1- Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
*Corresponding author: Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar 47416 - 95447, Iran
Tel:+98-11-35302455, Fax: +98-11-35302450.
Email: m.mohajerani@umz.ac.ir

Abstract

Background: **Many plants chemical substances that possess antioxidant properties, were known that might have an antihemolytic effect on erythrocytes. The use of synthetic antioxidants however, has been limited because of their toxicity and side effects. Therefore, medical researchers have intensified their quest to find natural antioxidants.**

Objective: **The effect of extract of leaf and pulp of Citrullus colocynthis, leaf of *Ilex spinigera* and leaf and fruit of Gleditsia caspica as medicinal plants were investigated on red blood cell hemolysis.**

Methods: **The plants were extracted in MeOH as solvent by soxhlet apparatus. Blood samples were collected from health volunteers and divided into two groups: test and control. Red blood cell peroxidation for each extract (5 - 150 µg/ml) was induced using AAPH (2, 2′-azo-bis-(2-amidinopropane) dihydrochloride) (35 mM). Percentage of hemolysis was measured spectrophotometrically by reading the absorbance at 540 nm as released hemoglobin from the cell in the presence and absence of the extracts.**

Results: **Leaf extract of Gleditsia caspica with IC_{50}: 5.58 ± 0.03 µg/ml and *Ilex spinigera* with IC_{50}: 13.85 ± 0.02 µg/ml showed the higher inhibitory effect on hemolysis among other extracts.**

Conclusion: **The results show that the use of the plants, Gleditsia caspica and *Ilex spinigera*, as natural antioxidants in the prevention and treatment of many diseases, including hemolysis of red blood cells by oxidizing agents can be studied.**

Keywords: **Citrullus colocynthis, Gleditsia caspica, *Ilex spinigera*, AAPH, Antihemolysis**