Physiology and Pharmacology, 13 (3), 263 - 270
Fall 2009 [Article in Persian]

Physiology
and
Pharmacology

Neuroprotective effect of *Nigella sativa* hydro alcoholic extract on serum/glucose deprivation induced PC12 cells death

Zahra Tayarani-Najaran [1], Hamid Reza Sadeghnia [1,2], Mozhgan Asghari [3], Seyed Hadi Mousavi [1,3*]

1. Department of Pharmacology and Pharmacological Research Centre of Medicinal Plants, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
2. Department of Modern Technologies and Sciences, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
3. Department of Biochemistry, Payame Noor University
4.Toxicology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Received: 16 Sep 2009 **Accepted: 9 Dec 2009**

Abstract

Introduction: The Serum/Glucose deprivation -induced cell death in cultured PC12 cells represents a useful in vitro model for the study of brain ischemia and neurodegenerative disorders. *Nigella sativa* L. has been known as a source of antioxidants. To elucidate the neuroprotective actions of *N. sativa* extract in vitro, we studied the effect of *N. sativa* extract on cultured PC12 cells under serum/glucose deprivation conditions.

Methods: PC12 cells were cultured in DMEM medium containing 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. Cells were seeded overnight and then deprived of serum/glucose for 6 and 18 h. Cells were pretreated with different concentrations of *N. sativa* extract (7.81-250 µg/ml). Cell viability was quantitated by MTT assay. Intracellular ROS production was measured by flow cytometry using 2', 7'-Dichlorofluorescin diacetate (DCF-DA).

Results: Depriving the PC-12 cells of serum/glucose caused prominent cell toxicity at least after 6 and 18 h. Pretreatment of PC12 cells with *N. sativa* (7.81-250 µg/ml) could reduce serum/glucose deprivation-induced cytotoicity in PC12 cells after 18 h. The experimental results suggest that *N. sativa* extract protects the PC12 cells against Serum/Glucose deprivation-induced cytotoxicity.

Conclusion: Our findings might raise a possibility of potential therapeutic application of *N. sativa* extract for preventing and treating cerebral ischemic and neurodegenerative diseases.

Keywords: PC12, serum/glucose free, toxicity, *Nigella sativa*.

* Corresponding author e- mail: mousavih@mums.ac.ir
Available online @: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۳ (۳)، ۲۶۳ – ۲۷۰
پاییز ۱۳۸۸

انجمن فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران
IRANIAN SOCIETY OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY 1968

اثر محافظت عصبی عصاره هیدرو الکلی سیاه دانه در مرگ سلولی القاء شده توسط محرومیت از سرم/گلوکز در سلول PC12

زهرا طیرانی نجاران[۱]، حمیدرضا صادق‌نیا[۱،۲]، مژگان اصغری[۳]، سید هادی موسوی[۱،۴*]

۱. گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات فارماکولوژی گیاهان دارویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۲. مرکز تحقیقات علوم نوین، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۳. گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور
۴. مرکز تحقیقات سم شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

دریافت: ۲۵ شهریور ۸۸ پذیرش: ۱۸ آذر ۸۸

چکیده

مقدمه: مرگ سلولی به علت محرومیت سرم/گلوکز در سلول PC12 مدل مناسبی جهت بررسی ایسکمی مغزی و بیماری‌های نورودژنراتیو می‌باشد. گیاه سیاه دانه به عنوان یک آنتی اکسیدان شناخته شده است. مطالعه حاضر جهت بررسی اثرات محافظت کننده احتمالی عصاره سیاه دانه در مرگ سلولی ناشی از محرومیت از سرم/گلوکز در سلول عصبی PC12 که مدل برون تنی in vitro ایسکمی مغزی است انجام گردیده است.

روش‌ها: سلول‌های PC12 در حضور محیط کشت DMEM محتوی ۱۰٪ سرم جنین گاو، ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکرو گرو در میلی لیتر استرپتومایسین کشت داده شد. سلول‌ها یک شب پس از کشت در مجاورت محیط بدون سرم/ گلوکز به مدت ۶ و ۱۸ ساعت قرار گرفتند. میزان بقاء سلولی پس از پیش تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره سیاه دانه (۲۵۰– ۷/۸۱ میکرو گرم در میلی لیتر) به روش MTT بررسی گردید. اندازه‌گیری ROS درون سلولی با استفاده از ۲،'۷،'۷– dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) در دستگاه فلوسیتومتری انجام گردید.

یافته‌ها: مجاورت سلول‌ها با محیط بدون سرم/ گلوکز به مدت ۶ و ۱۸ میزان بقاء سلولی گردید. سمیت محرومیت از سرم/ گلوگز بر سلولهای PC12 در حضور عصاره سیاه دانه (۲۵۰– ۷/۸۱ میکرو گرم در میلی لیتر) کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: عصاره سیاه دانه با توجه به اثرات آنتی اکسیدانتی آن می‌تواند به عنوان یک ترکیب امید بخش در درمان ایسکمی مغزی و بیماری‌های تحلیل یرنده اعصاب مد نظر قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: محرومیت از سرم/ گلوگز، سلول PC12، سمیت سلولی، رادیکال آزاد، عصاره سیاه دانه.

مقدمه

ایسکمی مغزی و یا سکته مهمترین علت مرگ و ناتوانی در افراد مسن می‌باشد. در جریان ایسکمی، کاهش جریان خون مغز منجر به کاهش ذخایر گلوکز، اکسیژن، سرم و مواد غذایی می‌گردد که جهت تولید انرژی ضروری هستند. محرومیت سرم/گلوکز مدل مناسبی جهت بررسی مکانیسم ملکولی آسیب عصبی در حین ایسکمی مغزی و توسعه داروهای محافظت کننده عصب بر علیه آسیب مغزی ایجاد شده به علت ایسکمی

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: mousavih@mums.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

می‌باشد (۲۳).

ایجاد رادیکال آزاد در آسیب عصبی ایسکمی مغزی (۸) و بیماری آلزایمر (۵) نقش دارد. استفاده از مواد آنتی اکسیدان مانند آلفا توکوفرول، اسکوربیک اسید و بتا کاروتن که اثر رادیکال آزاد را خنثی می‌کنند می‌توانند در حفاظت از عصب امید بخش باشد.

رده سلولی فئوکروموسیتومای رت PC12 به صورت گسترده‌ای در مطالعات عصبی و مسیرهای پیام رسان سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۸) همچنین نشان داده شده است که افزایش ROS در رده‌های سلولی مختلف از جمله PC12 سبب مرگ سلولی می‌گردد (۱۸).

در مجموع از یک طرف محرومیت از سرم/گلوکز نوروتوکسیک می‌باشد و از طرف دیگر ROS، به عنوان یک مدیاتور در بیماری‌های نورودژنراتیو شناخته شده است و در رده‌های سلولی مختلف از جمله PC12 سبب مرگ سلولی گردیده است. با در نظر گرفتن این شواهد، این فرضیه که ROS می‌تواند، مدیاتور احتمالی سمیت عصبی ناشی از محرومیت از سرم/گلوکز در سلول PC12 باشد، تقویت می‌گردد.

همچنین شواهدی از اثرات آنتی اکسیدان عصاره سیاه دانه وجود دارد. سیاه دانه (*Nigella Sative*) جزو گیاهان دارویی بسیار پرمصرف و متعلق به خانواده *Ranunculaceae* یا آلاله‌ها می‌باشد.

بخشی از گیاه که برای درمان استفاده می‌شود، دانه‌ها هستند. هر کپسول باد کرده از یک واحد فولیکولی با مقدار قابل توجه روغن با طعم تلخ و تند و گزنده می‌باشد. بطور معمول دانه‌ها به عنوان چاشنی و نگهدارنده غذا استفاده می‌شود.

هنگامی که دانه‌ها بصورت خوراکی در مقادیر متوسط در غذا بکار برده شوند باعث تحریک انقباضات رحمی و هنگامی که در مقادیر زیاد بکار برده شود بطور مشخص باعث سقط جنین می‌شود (۳). گیاه ضدکرم، ضد قولنج و نفخ، عرق‌آور، هضم کننده غذا، ادرا آور، شیرافزا، ملین و محرک بوده، و برای برونشیت و آماس و هموروئید مفید می‌باشد (۲).

همچنین دارای خاصیت ضد قارچ، ضد التهاب، ضدپارازیت می‌باشد (۲،۱۴، ۳۱). دارای خاصیت آنتی هیستامینیک، مسکن و تب بر، ضد میکروب، کاهش دهنده فشار خون و افزایش دهنده تنفس می‌باشد (۱۲).

در مطالعات مختلف اثرات آنتی اکسیدان سیاه دانه و جزء اصلی آن تیموکینون (TQ) می‌باشد به اثبات رسیده است و نشان داده شده که عصاره گیاه و نیز تیموکینون دارای خاصیت مهار پراکسیداسیون لیپید و روبشگر رادیکال آزاد می‌باشند (۷).

لذا، مطالعه حاضر جهت بررسی اثرات محافظت کننده احتمالی عصاره هیدروالکلی سیاه دانه در مرگ سلولی ناشی از محرومیت سرم/گلوکز در سلول عصبی PC12 به عنوان یک مدل آزمایشگاهی مناسب در مطالعات عصبی انجام می‌گیرد. ارتباط سمیت سلولی با افزایش ROS مورد مطالعه قرار خواهد گرفت.

مواد و روش‌ها

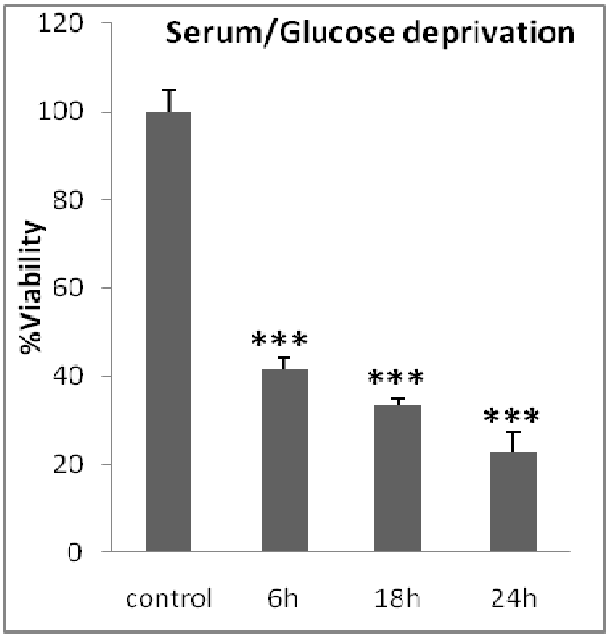
۷،' ۲' دی کلرو دی هیدروفلورسین دی استات،MTT، از شرکت سیگما وسایر مواد عمده شامل DMEM حاوی گلوکز بالا و DMEM فاقد گلوکز و FCSاز شرکت گیبکو خریداری شدند.

۱۰۰ گرم از عصاره گیاه در اتانول ۷۰ درجه توسط سوکسله عصاره‌گیری شد. حلال تحت خلاء جداسازی گردید. عصاره سیاه دانه برای آزمایش در DMSO شد. (۵۰ میلی گرم در میلی لیتر) و در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

سلول‌های PC12 از انستیتو پاستور (ایران-تهران) تهیه شد و در ۳۷ درجه در رطوبت۹۰٪ و ۵٪ دی اکسید کربن – ۹۵٪ هوا نگهداری شدند. سلول‌ها در DMEM با قند بالا (۴/۵ گرم در لیتر) با ۱۰٪ سرم جنین گاوی و پنی سیلین (۱۰۰ واحد در میلی لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) کشت داده شدند.

پس از این که سلول‌های PC12 به مدت ۲ ساعت با غلظت‌های مختلف *N. sativa* (۷/۸۱-۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) پیش تیمار شدند در معرض محرومیت از سرم/گلوکز قرار گرفتند. این کار با تعویض محیط کشت با DMEM فاقد گلوکز با پنی سیلین (۱۰۰ واحد در میلی لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) و حضور غلظت‌های مختلف سیاه دانه (آنکوباسیون ۶ و ۱۸ ساعت) به ترتیب انجام شد.

گروه کنترل بصورت محیط کشت با گلوکز بالا و ۱۰٪ سرم و یا محیط کشت فاقد سرم/گلوکز (بدون پیش تیمار) در نظر گرفته شد. سلول‌ها دیگر در معرض گلوکز قرار نگرفتند. در پایان



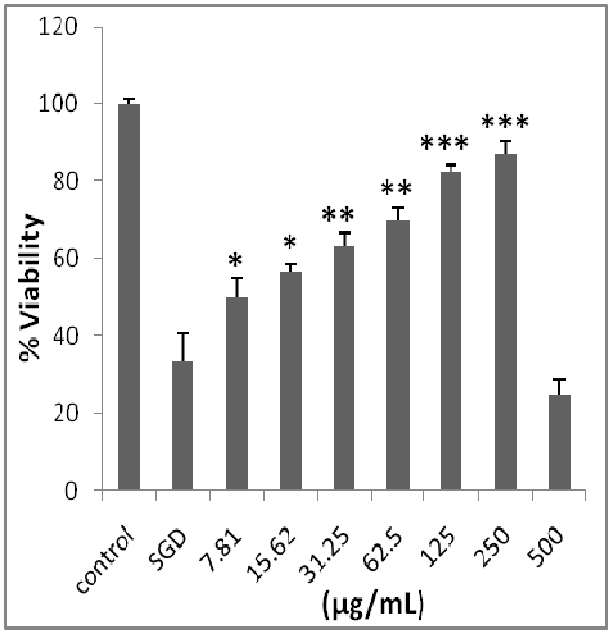
شکل۱- اثر محرومیت از سرم/ گلوکز بر میزان بقا سلول PC12. میزان بقا توسط تست MTT ارزیابی گردید. سلول‌های PC12 به مدت ۶، ۱۸و ۲۴ ساعت تحت محرومیت از سرم/ گلوکز قرار گرفتند و سمیت پس از ۲۴ ساعت به حداکثر رسید. مقادیر به صورت میانگین SEM± گزارش شده است (گروه‌های ۶ تایی). *P<0.05، **P<0.01و ***P<0.001 در مقایسه با کنترل.

تیمار سلولی تست‌های مختلفی را انجام شد.

توانایی زیستی سلول‌ها بوسیله استفاده از تغییرات MTT ارزیابی شد.

بطور خلاصه تعداد 10^4 سلول در پلیت ۹۶ خانه‌ایی قرار داده شدند. بعد از خارج کردن محیط کشت محلول MTT (با غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر در محلول فسفات بافر سالین) اضافه شد و سلول‌ها برای زمان ۴ ساعت آنکوبه شدند و فورمازان بوجود آمده توسط DMSO (۱۰۰میکرو لیتر) حل شد و جذب توسط ELISA reader در طول موج‌های ۵۷۰ نانومتر (۶۲۰ نانومتر مانند یک مرجع) اندازه‌گیری شد.

همانطور که قبلا" شرح داده شد با کمی تغییر سطوح رادیکال‌های آزاد اکسیژن درون سلولی اندازه‌گیری شد (۲۲). بطور خلاصه ۱۸ ساعت بعد از محرومیت سلول‌ها، سلول‌های PC12 با ۵ میکرومول DCFH-DA در ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ دقیقه در تاریکی آنکوبه شدند. محلول رویی به فالکون منتقل گردید و سلول‌ها نیز پس از تریپسینه کردن به همان فالکون انتقال داده شدند. پس از سانتریفوژ و دو بار شستشو با PBS فلوسیتومتری (Becton Dickinson) در FL1 انجام و



شکل۲- اثر حفاظتی سیاه دانه بر سمیت القا شده با محرومیت از سرم/ گلوکز در سلول PC12. میزان بقا توسط تست MTT ارزیابی گردید. سلول‌های PC12 به مدت ۲ ساعت با غلظت‌های مختلف سیاه دانه (۷/۸۱-۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تحت پیش تیمار قرار گرفتند و سپس به مدت ۱۸ ساعت با همان غلظت‌ها تحت محرومیت از سرم/ گلوکز قرار گرفتند. گروه کنترل بصورت محیط کشت با گلوکز بالا و ۱۰٪ سرم و یا محیط کشت فاقد سرم/گلوکز (SGD) (بدون پیش تیمار) در نظر گرفته شد. مقادیر به صورت میانگین SEM± گزارش شده است (گروه‌های ۶ تایی). *P <0.05، **P <0.01 و ***P <0.001 در مقایسه با گروه محروم از سرم/گلوکز.

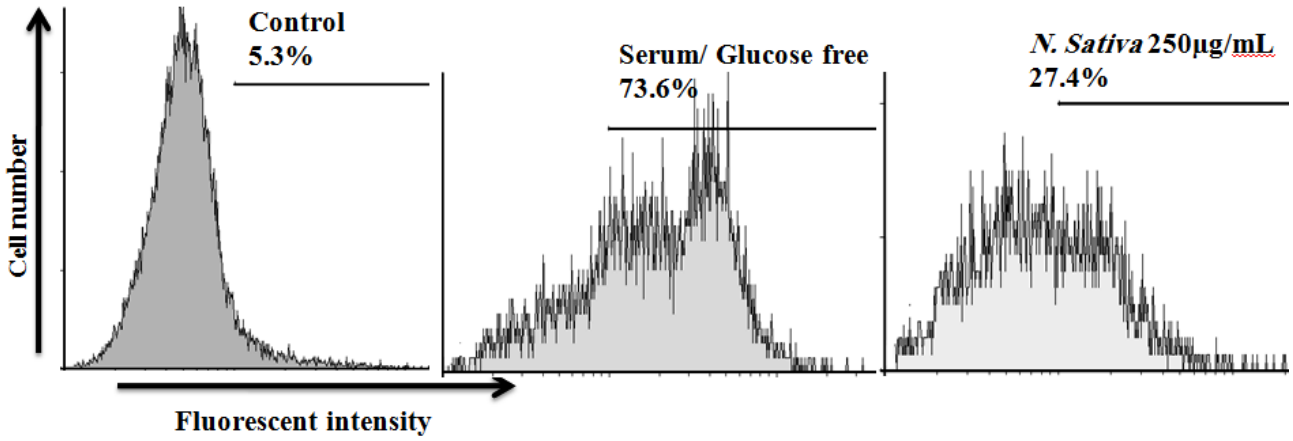
طیف حاصل پس از Gating بررسی و با گروه کنترل مقایسه گردید.

مقادیر به صورت میانگین SEM ± گزارش شده است. برای آنالیز داده‌ها از آزمون ANOVA یک طرفه و برای مقایسه بین گروهی از آزمون Tukey-kramer استفاده شد.

سطح اطمینان P<0.05 به طور آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بر طبق ارزیابی MTT *N. sativa* (۷/۸۱-۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) سلول‌های PC12 را بر علیه سمیت القا شده توسط محرومیت از سرم/گلوکز، حمایت کرد. بعد از این که سلول‌ها در شرایط محرومیت از سرم/گلوکز به ترتیب برای ۶ و ۱۸ ساعت قرارگرفتند مشخص شد که محرومیت از سرم/گلوکز



شکل۳- فلوسیتومتری با رنگ DCFH-DA برای اندازه‌گیری میزان رادیکال آزاد در سلول‌های PC12، الف) گروه کنترل. ب) گروه محروم از سرم و گلوکز. ج) پیش تیمار با سیاه دانه و محروم از سرم و گلوکز. در این گروه سلول‌ها به مدت ۱۸ ساعت تحت تیمار با غلظت‌های مختلف سیاه دانه قرار گرفتند. میزان تولید رادیکال آزاد بر اساس تغییر در میزان شدت فلورسنت DCF، محصول اکسیداسیون DCFH-DA ارزیابی گردید. نتایج حاصل ۵ بار تکرار هستند.

در مقایسه با گروه کنترل بطور معنی‌داری توانایی حیاتی سلول‌ها را کاهش می‌دهد. الگوی کاهشی وابسته به زمان نشان داده شده است (شکل۱).

قرار گرفتن در معرض محرومیت از سرم/گلوکز برای ۱۸ ساعت توانایی حیاتی سلول‌ها را بین ۱/۵۳±۳۳/۵ درصد کاهش داد (توسط آسیب ایجاد شده در آزمایشات متوالی).

پیش تیمار با *N. sativa* (۷/۸۱-۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) از سمیت محرومیت از سرم/گلوکز بطور معنی‌دار کاست. تاثیر *N. sativa* بر بقا سلول‌های PC12 در یک الگوی وابسته به دوز نشان داده شده است (شکل۲).

بعلاوه پیش تیمار با *N. sativa* به تنهایی هیچ سمیتی در سلول‌های PC12 کشت شده با غلظت‌های بالا نشان نداد. (اطلاعات نشان داده نشده است).

پروب ملکولی DCFH-DA برای اندازه‌گیری سطوح ROS درون سلولی با فلوسایتومتری استفاده می‌شود. محصولات رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول‌های PC12 درمعرض محرومیت از سرم /گلوکز برای ۱۸ ساعت با یا بدون پیش تیمار با *N. Sativa* اندازه‌گیری شده است. در مقایسه با گروه کنترل محرومیت از سرم/گلوکز بطور معنی‌داری تعداد سلول‌های DCF مثبت را تا حد ۶۸/۳ ٪ افزایش داده است. پیش تیمار با *N. Sativa* باعث کاهش معنی‌داری در تعداد سلول‌های DCF مثبت در مقایسه با محرومیت از سرم /گلوکز (که باعث افزایش محصولات ROS است) می‌شود. (شکل۳).

بحث

ایسکمی مغزی ناشی از اختلال در متابولیسم اکسیداتیو و کاهش متابولیسم است که منجر به تجزیه نورونی می‌شود (۱۳). کاهش قند خون و محرومیت از سرم فاکتور کلیدی برای فرایند ایسکمی مغزی و بیماری‌هایی که با پیشرفت تجزیه نورون‌ها همراه است نظیر آلزایمر، پارکینسون، آمیلو تروفیک لاترال اسکلروزیس می‌باشد (۱۳).

گیاه سیاه دانه دارای طیف وسیعی از اثرات فارماکولوژیکی است و به صورت سنتی در درمان بیماری‌های زیادی، از جمله آسم، فشارخون، تب و غیره مورد استفاده قرار می‌گرفته است (۱۹).

شواهد متعدد مبنی بر اثر سودمند مصرف *N.sativa* بر عملکرد کلیه، سیستم تنظیم فشار خون، سمیت زدایی کبد (دفع مواد زائد)، مجاری تنفسی، سیستم تولید عرق، بافت تولید شیر، اسپرم زایی، دفع عوامل مهاجم انگلی و توانایی هضم سیستم گوارش یافت می‌شود (۳۲). همچنین باعث کاهش سطح کلسترول LDL و افزایش سطح کلسترول HDL سرم می‌شود (۱۹). و اثر تحریکی آن بر آزاد شدن انسولین از جزایر لانگرهانس پانکراس و کاهش دادن پراکسیداسیون لیپیدی و تجزیه پروتئین هامورد تایید قرار گرفته است (۲۶، ۲۹، ۲۸). خاصیت محافظت عصبی اسانس و اجزای آن بر روی بتا –

آمیلوئید (القا کننده مرگ در گرانول‌های عصبی مغز) بررسی شده است (۱۹). اثرات آنتی اکسیدان عصاره گیاه و جزء اصلی آن تیموکینون در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است (۹-۷-۱۲). اخیرا" قابلیت محافظت TQ بر علیه جنتامایسین (القا کننده نفروتوکسیتی) در رت گزارش شده است. و نیز خاصیت محافظت عصبی اسانس و اجزای آن بر روی بتا –آمیلوئید (القا کننده مرگ در گرانول‌های عصبی مغز) بررسی شده است (۱۹).

در این مطالعه، از مدل محرومیت از سرم/گلوکز در سلول PC12 به عنوان مدل برون تن ایسکمی مغزی جهت بررسی اثرات آنتی اکسیدانتی اسانس سیاه دانه استفاده شده است.

تست MTT نشان داد که اگر سلول‌های PC12 در محیط کشت محروم از سرم/گلوکز قرار بگیرند، توانایی حیاتی سلول‌ها کاهش می‌یابد. افزایش ROS، پاسخی در برابر کاهش گلوکز و سرم است که باعث القاءسیتوتوکسیتی می‌شود (۲۱).

پیش تیمار با *N.sativa* باعث کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) که در اثر محرومیت از سرم /گلوکز ایجاد شده بودند، گردید. این بررسی نشان میدهد که ممانعت از تولید ROSهای درون سلولی ممکن است در اثر خاصیت محافظت عصبی *N.sativa* باشد. تاثیر محافظتی ممکن است مربوط به تعدیل آپوپتوز – وابسته به بیان ژن و همچنین ترمیم پتانسیل غشاء میتوکندری و ممانعت از تولید ROSهای درون سلولی باشد (۲۳). *N.sativa* در غلظت بالا (۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) نه تنها مرگ سلولی را کاهش نداده بلکه سبب افزایش آن شده است. با توجه به اینکه آنتی اکسیدان در غلظت بالا پرواکسیدان است به نظر می‌رسد عصاره *N. sativa* در غلظت بالا به عنوان یک اکسیدکننده عمل کرده و سبب افزایش رادیکال آزاد و متعاقباً مرگ سلولی گردیده است.

ROSها واسطه هایی هستند که بیشترین آسیب را در ناحیه Penumbral در جریان ایسکمی مغزی ایجاد شده در اثر سکته را دارند (۲۲). در یک مطالعه تاثیر *N.sativa* و TQ بر روی آسیب شدید سیستم اعصاب مرکزی (CNS) بررسی شد (۲۰).

عصاره سیاه دانه موجب کاهش میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن شده و از تخریب سلول‌های بتا جزایر لانگرهانس بدنبال تجویز مواد سمی نظیر استرپتوزوتوسین و آلوکسان جلوگیری می‌کند و تجویز آن موجب رژنراسیون و تکثیر نسبی سلول‌های بتا در مدل تجربی دیابت قندی القا شده توسط استرپتوزوتوسین در حالت برون تن می‌گردد (۱۵و۱۶). رادیکال سوپراکسیدوهیدروکسیل نقش مهمی در آسیب غشاء سلولی به وسیله پراکسیداسیون چربی‌ها دارند (۶).

اثر محفاظتی سیاه دانه از نظر کاهش دادن میزان پراکسیداسیون لیپیدی و تجزیه ذخایر پروتئینی داخل سلول تحت شرایط استرس زا در گلبول‌های قرمز به اثبات رسیده است (۲۹).

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که عصاره سیاه دانه بر روی استرس اکسیداتیو موثر بوده و رادیکال‌های آزاد اکسیژن را کاهش می‌دهد. دراین مطالعه عصاره هیدروالکلی سیاه دانه از طریق کاهش تولید رادیکال‌های آزاد داخل سلولی (اثرات آنتی اکسیدانتی) میزان مرگ و میر سلول‌های PC12 را در شرایط محرومیت از سرم/گلوکز کاهش داد.

این مطالعه تاثیر محافظت عصبی *N.sativa* را نشان می‌دهد که امیدی برای استفاده از این گیاه در درمان بیماری‌های نرودژنراتیو می‌باشد که افزایش رادیکال آزاد در پاتوژنز آنها تقش دارد.

سپاسگزاری

از پشتیبانی‌های علمی – اجرایی مسئولین و کارشناسان محترم مرکز تحقیقات فارماکولوژی گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی مشهد در اجرای این طرح صمصیمانه قدردانی می‌شود. از زحمات سرکار خانم دکتر نصیرلی در انجام آزمایشات فلوسیتومتری سپاسگزاری می‌گردد.

References

[1] Ali BH, Blunden G, Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. ***Phytother Res*** 17 (2003) 299–305.

[2] Al-Ghamdi MS, The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. ***J Ethnopharmacol*** 76 (2001) 45–48.

[3] Aqel M, Shaheen R, Effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds on the uterine smooth muscle of rat and guinea pig. ***J Ethnopharmacol*** 52 (1996) 23–26.

[4] Badary OA, AL-Shababah OA, Al-Shawaf HA, AL-Sohaibani MO, AL-Bekairi AM, *Thymoquinone* ameliorates the nephrotoxicity induced by cisplatin in rodents and potentiates its antitumor activity. ***Can J Physiol Pharmacol*** 75 (1997) 1356-1361.

[5] Behl C, Moosmann B, Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. ***Free Radic Biol Med*** 33 (2002) 182–191.

[6] Bromont C, Marie C, Bralet J, Increased lipid peroxidation in vulnerable brain regions after transient forebrain ischemia in rats. ***Stroke*** 20 (1989) 918–924.

[7] Burits M, Bucar F, Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. ***Phytother Res*** 14 (2000) 323–328.

[8] Cao W, Carney JM, Duchon A, Floyd RA, Chevion M, Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. ***Neurosci Lett*** 88 (1988) 233–238.

[9] Daba MH, Abdel Rahman MS, Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. ***Toxicol Lett*** 16 (1998) 23–9.

[10] Dahri AH, Chandiol AM, Rahoo AA, Memon RA. Effect of *Nigella sativa* (kalonji) on serum cholesterol of albino rats. ***J Ayub Med Coll Abbottabad*** (2005) 1772-74.

[11] Hoyer S, Abnormalities in brain glucose utilization and its impact on cellular and molecular mechanisms in sporadic dementia of Alzheimer type. ***Ann N Y Acad Sci*** 69 (1993) 577–80.

[12] Houghton PJ, Zarka R, de las Heras B, Hoult JRS, Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipidperoxidation. ***Planta Med*** 61(1995) 33–36.

[13] Johnson EM Jr, Greenlund LJ, Akins PT, Hsu CY, Neuronal apoptosis current understanding of molecular mechanisms and potential role in ischemic brain injury. ***J Neurotrauma*** 12 (1995) 843–852.

[14] Khan MA, Ashfaq MK, Zuberi HS, Mahmood MS, Gilani AH, The in vivo antifungal activity of the aqueous extract from *Nigella sativa* seeds. ***Phytother Res*** 17 (2003) 183–186.

[15] Kanter M, Coskun O, Korkmaz A, Oter S. Effects of *Nigella sativa* on oxidative stress and beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. ***Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*** 279 (2004) 685-91.

[16] Kanter M, Meral I, Yener Z, Ozbek H, Demir H. Partial regeneration/proliferation of the beta-cells in the islets of Langerhans by *Nigella sativa* L in streptozotocin-induced diabetic rats. ***Tohoku Journal of Experimental Medicine*** 201 (2003) 213-219.

[17] Hoyer S, Abnormalities in brain glucose utilization and its impact on cellular and molecular mechanisms in sporadic dementia of Alzheimer type. ***Ann N Y Acad Sci*** 69 (1993) 577–80.

[18] Hong H, Liu GQ, Scutellarin protects PC12 cells from oxidative stress-induced apoptosis. ***J Asian Nat Prod Res*** 8 (2006) 471-9.

[19] Ismail N, Ismail M, Latiff LA, Mazlan M, Mariod AA, Black cumin seed (*Nigella sativa* linn.) oil and its fractions protect against beta amyloid peptide-induced toxicity in primary cerebellar granule neurons. ***J Food Lipids*** 15 (2008) 519-533.

[20] Kanter M, Coskun O, Kalayci M, Cagavi F. Neuroprotective effect of *Nigella sativa* on experimental spinal cord injury. ***Exp Hum Toxicol*** 25 (2006) 127-133.

[21] Liu Y, Song XD, Liu W, Zhang TY, Zuo J, Glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in PC12 cell line. ***J Cell Mol Med*** (2003) 749–56.

[22] Love S, Oxidative stress in brain ischemia. ***Brain Pathol*** 9 (1999) 119–131.

[23] Moley KH, Mueckler MM. Glucose transport and

apoptosis. ***Apoptosis***. 5 (2000) 99–105.

[24] Mousavi SH, Tavakkol-Afshari J, Brook A, Jafari-Anarkooli I, Direct toxicity of rose bengal in MCF-7 cell line Role of apoptosis. ***Food Chem Toxicol*** 47 (2009) 855-859.

[25] Nagi MN, Mansour MA. Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats a possible mechanism of protection. ***Pharmacol Res*** 41 (2000) 283–9.

[26] Rchid H, Chevassus H, Nmila R, Guiral C, Petit P, Chokairi M, Sauvaire Y. *Nigella sativa* seed extracts enhance glucose-induced insulinrelease from rat-isolated Langerhans islets. ***Fundam Clin Pharmacol*** (2004) 18525-529.

[27] Ramadan MF, Kroh LW, Morsel JT. Radical scavenging activity of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (Coriandrum sativum L.), and niger (Guizotia abyssinica Cass.) crude seed oils and oil fractions. ***J Agric Food Chem*** 51 (2003) 6961-6969.

[28] Reimann-Philipp U, Ovase R, Weigel PH, Grammas P, Mechanisms of cell death in primary cortical neurons and PC12 cells. ***J Neurosci Res***. 64 (2001) 654–660.

[29] Suboh SM, Bilto YY, Aburjai TA. Protective effect of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erithrocytes. ***Phytother Res*** 18 (2004) 280-284.

[30] Wang H, Joseph JA, Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. ***Free Radic Biol Med*** 27 (1999) 612–616.

[31] Worthen DR, Ghosheh OA, Crooks PA, The in vitro anti-tumor activity of some crude and purified compound of blackseed, *Nigella sativa* L. ***Anticancer Res*** 18 (1998) 1527–1532.

[32] Ziyyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli A, Serhrouchni M, Benjelloun W. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. ***J Ethnopharmacol*** 58 (1997) 45-54.