



Evaluation of antispasmodic effect of extracts and essential oil of *Thymus daenensis* L. on rat uterus contractions

Sadraei Hassan^{1*}, Ghasemi Maedeh², Dehghan Dehkordi Ghazal³, Yegdaneh Afsaneh¹

¹Associate Professor, Dept. of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

²Assistant Professor, Dept. of Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

³Ph.D, Dept. of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

ABSTRACT INFO

Research Paper

Received: 15 Mar 2025

Accepted: 27 Sep 2025

ABSTRACT

Thymus daenensis L. is a local species of Lamiaceae family found in Iran. *T. daenensis* traditionally has been used by local people. The aim of this research was to assess spasmolytic action of *T. daenensis* hydroalcoholic extract, hexane partition and the essential oil on uterus contraction. For pharmacological studies, isolated rat uterus suspended in an organ bath filled by Tyrode's solution, was contracted by KCl, acetylcholine or oxytocin. Inhibitory action of *T. daenensis* extracts and essential oil was examined on above spasmogens in rat uterus and recorded on oscillograph apparatus. Nifedipine was used as standard drugs. Nifedipine in a concentration manner inhibited rat uterus contractions induced by KCl, acetylcholine and oxytocin. The hydroalcoholic extract (20µg/ml-1.28mg/ml), hexane partition and essential oil of *T. daenensis* also attenuated uterine contractions induced by above spasmogens in the organ bath. Comparing the inhibitory effect of hydroalcoholic extract with hexane partition indicate that the hexane partition contains more potent components. The essential oil of *T. daenensis* was even more potent than the hexane partition. Therefore, it looks like that the lipophilic constituents in the hexane partition and the essential oil are mainly responsible for inhibitory action of *T. daenensis*.

Key words: Antispasm, Smooth muscle, *Thymus daenensis*, Uterus.

How to cite this article:

Sadraei H, Ghasemi M, Dehghan Dehkordi G, Yegdaneh A. 2025. Evaluation of antispasmodic effect of extracts and essential oil of *Thymus daenensis* L. on rat uterus contractions. Journal of Advanced Researches in Medicinal Plants 2 (3): 33-43. (In Farsi)

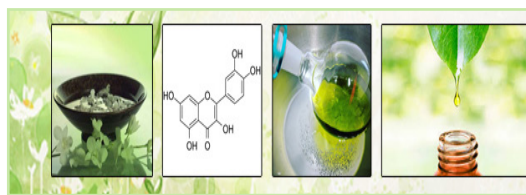
DOI: 10.30479/armp.2025.21772.1043

©The Author(s).



Publisher: Imam Khomeini International University

ARMP is an open access journal under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)



بررسی اثر ضداسپاسم عصاره و اسانس آویشن دنائی روی انقباضات رحم رات

حسن صدرائی^{۱*}، مانده قاسمی^۲، غزل دهقان دهکردی^۳، افسانه یگدانه^۱

^۱دانشیار، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان

^۲استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان

^۳دکتری، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان

اطلاعات مقاله	چکیده
علمی-پژوهشی	آویشن دنائی (<i>T. daenensis</i>) یکی از گونه‌های بومی آویشن ایران است که کاربرد دارویی دارد. هدف از انجام این تحقیق، ارزیابی اثر عصاره و اسانس آویشن دنائی روی انقباضات عضلات صاف رحم بود. به این منظور، بافت رحم جداشده از رات در حمام بافت قرار داده شد و انقباضات توسط اسپاسموژن‌های KCl، استیل‌کولین و اکسی‌توسین ایجاد گردید. اثرات عصاره هیدروالکلی، پارتیشن هگزانی، اسانس و نیفدیپین بر روی انقباضات رحمی ناشی از محرک‌های فوق، مورد بررسی قرار گرفت. نیفدیپین انقباضات رحمی ناشی از KCl، استیل‌کولین و اکسی‌توسین را مهار کرد. عصاره هیدروالکلی، پارتیشن هگزانی و اسانس آویشن دنائی از غلظت ۲۰ µg/ml تا حداکثر ۱/۲۸ mg/ml اثر مهاری وابسته به غلظت، روی انقباضات ناشی از KCl، استیل‌کولین و اکسی‌توسین بر بافت رحم جداشده رات، نشان دادند. آویشن دنائی اثر ضداسپاسم روی انقباضات رحم دارد. مقایسه عصاره هیدروالکلی با پارتیشن هگزانی گیاه، نشان داد که پارتیشن هگزانی اثر مهاری قوی‌تری نسبت به عصاره هیدروالکلی دارد. همچنین، اثر آنتی اسپاسم اسانس، بسیار قوی‌تر از پارتیشن‌های هیدروالکلی و هگزانی بود. با توجه به نتایج، به نظر می‌رسد که ترکیبات لیپوفیلیک موجود در اسانس و پارتیشن هگزانی عامل اصلی اثرات ضداسپاسم گیاه آویشن دنائی باشند.
دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۲۵	کلمات کلیدی: آنتی اسپاسم، آویشن دنائی، رحم، عضلات صاف.
پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۰۵	

استناد به این مقاله

Sadraei H, Ghasemi M, Dehghan Dehkordi G, Yegdaneh A. 2025. Evaluation of antispasmodic effect of extracts and essential oil of *Thymus daenensis* L. on rat uterus contractions. Journal of Advanced Researches in Medicinal Plants 2 (3): 33-43. (In Farsi)

DOI: 10.30479/armp.2025.21772.1043



حق مؤلف © نویسندگان

ناشر: دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)

*نشانی پست الکترونیکی نویسنده مسئول: sadraei@pharm.mui.ac.ir

مقدمه

جنس آویشن *Thymus L.* یکی از جنس‌های مهم خانواده نعناع (*Lamiaceae*) و متعلق به طایفه *Menthae* و زیرخانواده *Nepetoideae* است که به صورت سنتی کاربرد طبی داشته است (Jalas, 1974). گونه‌های مختلفی از آویشن در مناطق مختلف ایران وجود دارند که در حال حاضر ۱۸ گونه از این جنس در ایران شناسایی شده است (Jamzad et al., 2019). آویشن شیرازی سرشاخه‌های گل‌دار خشک شده گیاه *Zataria multiflora* Boiss. از خانواده نعناع است (Azadbakht et al., 2003). آویشن دنائی (*Thymus daenensis*) مختص کشور ایران بوده و به صورت سنتی به عنوان ضد نفخ، هضم کننده غذا، ضد اسهال، ضد سرخه و خلط آور مصرف دارد (Emami et al., 2019). در طب قدیم از این گیاه به عنوان مدر، ضد نفخ و اشتها آور استفاده نموده و جویدن آن را در تسکین درد دندان مؤثر می دانسته اند (Phillipson, 1996). نتایج مطالعات مختلف نشان داد که این گیاه دارای اثرات فارماکولوژیک مانند خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی، فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و حذف رادیکال آزاد، اثر مهاری تیروزیناز و اثر هیپولیپیدمیک می باشد (Mohammadpour, 2011; Teimouri, 2012; Zarshenas, 2015). گزارش شده است که سایر گونه‌های آویشن از جمله آویشن شیرازی و آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) خواص ضداسپاسم روی عضلات صاف دارند. برای مثال، عصاره هیدروالکلی آویشن باغی دارای اثر آنتی-اسپاسم بر روی ایلئوم خوکچه هندی است (Babaei et al., 2008). عصاره آویشن شیرازی نیز دارای اثر آنتی اسپاسم بر روی نای در خوکچه هندی می باشد (Boskabady et al., 2014). همچنین عصاره هیدروالکلی *Z. multiflora* بر فعالیت مکانیکی کولون در رت مؤثر بوده و باعث کاهش معنی دار فعالیت مکانیکی کولون می شود (Bahaooddini et al., 2022). در مطالعه‌ای دیگر نیز اثرات شل کنندگی *Z. multiflora* و برخی از ترکیبات آن بر روی عضلات صاف نای، دستگاه گوارش، ادراری و عروق خونی بررسی شده که نشان دهنده اثر شل کنندگی و رفع انقباضی نسبتاً قوی عصاره و ترکیبات گیاه بر انواع مختلف عضلات صاف بوده است (Khazdair et al., 2022). عصاره‌های هیدروالکلی و هگزانی *Z. multiflora* دارای فعالیت ضداسپاسمی بوده که بر روی حرکت پرستالیتیک روده اثر گذاشته و باعث کنترل اسهال در رت شده است (Sadraei et al., 2018). همچنین عصاره گیاه *Z. multiflora* دارای اثر ضداسپاسم بر روی رحم رات می باشد (Naseri et al., 2006).

مواد و روش‌ها

آماده سازی عصاره

اندام هوایی آویشن دنائی در فصل گلدهی از مزرعه شرکت کشت پرتیکان (واقع در شاهان کوه روستای ایوانک فریدون شهر اصفهان، ایران) جمع‌آوری و در سایه خشک و آسیاب گردید. آویشن دنائی کشت شده در این مزرعه توسط آقای مهندس محمد اصفا از اداره منابع طبیعی استان اصفهان با نام علمی *Thymus daenensis* و نمونه هرباریوم در دانشکده داروسازی با شماره ۱۸۱۰ ثبت شده است. برای تهیه اسانس به ۱۰۰ گرم از پودر گیاه آویشن دنائی با نسبت ۱۰ به ۱ برابر وزن پودر آب مقطر افزوده شد. پس از اینکه پودر به خوبی در آب خیسانده شد، توسط دستگاه کلونجر به کمک حرارت، اسانس حاصل جمع‌آوری شد (Okonkwo and Ohaeri, 2019).

برای تهیه عصاره هیدروالکلی از روش ماسراسیون استفاده شد. به این صورت که ابتدا پودر تهیه شده در اتانول ۷۰٪ خیسانده و به مدت دو ساعت به خوبی مرطوب گردید و پس از این دو ساعت مخلوط به مخزن منتقل گردید، فشرده و مخزن با اتانول ۷۰٪ به نسبت ۱ به ۸ پر گردید. در این مدت از پوشانده شدن تمامی گیاه در طول مدت ماسراسیون اطمینان حاصل شد. هر ۳ روز یکبار عصاره حاصله جمع‌آوری شد، سپس دوباره به نسبت ۸ به ۱ به مخلوط، اتانول اضافه گردید. مجموع عصاره جمع‌آوری شده توسط دستگاه روتاری (Heidolph, Germany) با دمای ۴۰ درجه و سرعت ۹۰ دور در دقیقه، تغلیظ گردید. در نهایت پس از خروج کامل اتانول، توسط دستگاه فریزدرایر و به روش تصعید، آب باقی مانده در عصاره نیز خارج شد. پس از خشک شدن یک نمونه از عصاره، درصد مایع باقی مانده در عصاره تعیین و بازده عصاره محاسبه شد (Singh, 2008). برای تهیه پارتیشن هگزانی از روش جداسازی حلال در حلال استفاده شد. برای این منظور ابتدا به عصاره هیدروالکلی تغلیظ شده، در نسب مساوی از آب و هگزان افزوده شد و به مدت ۲۰ دقیقه با دقت تکان داده شد تا محتویات عصاره در فاز هگزانی یا آبی حل شود. سپس مخلوط حاصل، داخل دکانتور

ریخته شد و دوفاز هگزانی و آبی از یکدیگر جدا گردیدند. دوباره به فاز آبکی باقی‌مانده به نسبت مساوی هگزان اضافه و مراحل قبل تکرار گردید. پس از جدا کردن فاز هگزانی این کار برای بار سوم نیز تکرار شد. بعد از اتمام این مراحل پارتیشن هگزانی جمع‌آوری شده در دمای ۴۰ درجه و سرعت ۹۰ دور در دقیقه تغلیظ گردید. محتوای فنلی کلی در عصاره هیدروالکلی و پارتیشن هگزانی آویشن دنائی بر اساس روش فولین سیوکالتیو (Folin-Ciocalteu's phenol reagent test) انجام شد (Ikawa, 2003).

دارو و محلول‌ها

محلول فیزیولوژیک تیروید از مواد شیمیایی زیر ساخته شد: (mM): $136.9 = \text{NaCl}$, $5.55 = \text{Glucose}$, $1.05 = \text{MgCl}_2$, $1.19 = \text{NaHCO}_3$, $1.8 = \text{CaCl}_2$, $0.42 = \text{NaH}_2\text{PO}_4$, $2.68 = \text{KCl}$. محلول تیروید روزانه در آب مقطر و اشباع شده با اکسیژن تهیه شد. KCl به صورت محلول ۲ مولار در آب مقطر تهیه شد. استوک ۱۰۰ میلی‌مولار استیل کولین (Sigma) در آب مقطر تهیه شد و رقت $100 \mu\text{M}$ در آب مقطر رقیق شد. اکسی‌توسین (کاسپین) به صورت آمپول ۱۰ IU/ml تهیه و با آب مقطر رقیق گردید و از آن محلول استوک با غلظت ۰.۱ IU/ml تهیه شد. استرادیول والرات (آمپول ۱۰ mg/ml، داروسازی ابوریحان) در روغن مایع گیاهی به صورت محلول استوک ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ برای تزریق زیر جلدی آماده شد. استوک نیفدپین با غلظت ۱ mg/ml، از طریق رقیق کردن محلول اولیه نیفدپین (سیگما) با غلظت ۱۰ mg/ml توسط DMSO تهیه شد. محلول استوک عصاره تام هیدروالکلی، پارتیشن هگزانی و اسانس آویشن دنائی با غلظت ۸۰ mg/ml در DMSO تهیه و با ۵۰٪ DMSO رقیق گردید. سایر ترکیبات شیمیایی که اسم شرکت سازنده‌ی آن‌ها قید نشده است، ساخت شرکت Merck می‌باشند.

آماده‌سازی بافت

قبل از انجام تحقیق گواهی لازم جهت استفاده از حیوانات آزمایشگاهی از کمیته اخلاق دانشگاه اخذ گردید (IR.MUI.RESEARCH. REC.1401.035). رات ماده غیرباردار (۲۳۰-۲۲۰ گرم) تهیه شده از خانه حیوانات دانشکده داروسازی و علوم دارویی، با یک تزریق زیرجلدی (SC) استرادیول (۳۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم) تحت درمان قرار گرفتند. این رات در یک قفس جداگانه در لانه حیوانات با دسترسی کامل به غذا و آب باقی نگهداری شد. روز بعد رات به وسیله گاز دی اکسید

کربن قربانی گردید و حفره شکمی کاملاً باز شد. شاخ‌های رحم شناسایی و با دقت جدا شدند و در محلول فیزیولوژیک تیروید اکسیژن‌دار در دمای اتاق قرار گرفتند. بافت‌های چربی چسبیده شده به بافت رحم از آن جدا و هر شاخ رحم به دو قسمت بریده شد. سپس دو لبه نوک بافت با دو نخ پنبه‌ای مجزا بسته شدند. یک انتهای بافت در یک قلاب محکم شده و در یک حمام بافت (Palmer organ bath, England) پر از محلول تیروید در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد و به طور مداوم با اکسیژن گاز داده شد. انتهای نخ دیگر به اهرم مبدل ایزوتونیک هاروارد تحت کشش ۱ گرم متصل شد. ترانس‌دیوسر برای ثبت انقباضات بافتی به دستگاه اسیلوگرافی یونیورسال هاروارد (Harvard Oscillograph Apparatus, England) متصل و انقباضات روی کاغذ ثبت گردید. قبل از شروع آزمایش، بافت با محلول تیروید شسته شد و اجازه داده شد حداقل ۲۰ دقیقه با شرایط جدید سازگار شود. با افزودن اسپاسموژن به حمام بافت انقباضات مورد نظر در بافت رحم القاء گردید. اسپاسموژن‌ها مستقیماً به حمام بافت اضافه شدند تا غلظت نهایی حمام ۰.۰۱ IU/ml برای اکسی‌توسین، $0.5 \mu\text{M}$ برای استیل کولین و ۸۰ mM برای KCl ایجاد شود. بررسی اثرات عصاره بر پاسخ‌های اکسی‌توسین و استیل کولین به صورت غیرتجمعی مورد بررسی قرار گرفت. اکسی‌توسین و استیل کولین به ترتیب ۵ دقیقه و ۳۰ ثانیه در تماس با بافت بودند. شستشوی بافت با تخلیه حمام و پر کردن مجدد با محلول تیروید تازه انجام شد. در مورد KCl، از رویکرد تجمعی استفاده شد. در این حالت، پس از ایجاد انقباض با KCl (۸۰ mM)، غلظت‌های متوالی از عصاره‌ها یا اسانس بدون شستشو در فواصل ۱۰ دقیقه به حمام بافت اضافه شدند. اثرات داروی استاندارد (نیفدپین) و معادل حجمی حامل عصاره (DMSO) به روشی مشابه مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز یافته‌ها

انقباض رحم ثبت شده با سنجش ارتفاع انقباض از نقطه تونوسیت پایه اولیه اندازه‌گیری شد و به عنوان درصدی از انقباض ثبت‌شده، قبل از افزودن عصاره‌ها و یا اسانس، بیان شد. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین (SEM) بیان شده و به صورت منحنی غلظت-پاسخ نیمه لگاریتمی ترسیم شدند. همچنین، غلظتی از دارو که منجر به ۵۰٪ حداکثر اثر مهار (IC_{50}) شده است نیز محاسبه شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) برای مقایسه درون گروهی و

بطور نسبی مهار شد (شکل ۲).

اسانس، عصاره هیدروالکلی و پارتیشن هگزانی آویشن دنائی انقباضات تونیک ناشی از KCl (۸۰ mM) را به صورت وابسته به غلظت مهار کردند. شروع اثر مهاری انقباضات ناشی از KCl (۸۰ mM) توسط عصاره هیدروالکلی با غلظت ۲۰ µg/ml مشاهده شد و با غلظت ۲/۵ mg/ml انقباضات به طور کامل مهار گردید (شکل ۳). شروع اثر مهاری پارتیشن هگزانی نیز در غلظت ۲۰ ml بوده و در غلظت ۳۲۰ µg/ml انقباضات به طور کامل مهار گردید (شکل ۳). همچنین شروع اثر اسانس با غلظت ۲ µg/ml مشاهده شد و در غلظت ۱۲۸ µg/ml انقباضات به طور کامل مهار گردید (شکل ۳). معادل حجمی حامل عصاره و اسانس (DMSO) اثر مهاری معنی داری روی انقباضات ناشی از KCl نداشت (ANOVA).

اثر مهاری اسانس، عصاره هیدروالکلی و پارتیشن هگزانی آویشن دنائی بر پاسخ‌های انقباضی فازیک ناشی از استیل کولین (۰/۵ µM) به صورت وابسته به غلظت بود. شروع اثر مهاری پارتیشن هگزانی در غلظت ۲۰ µg/ml مشاهده شد و انقباضات در غلظت ۳۲۰ µg/ml به طور کامل مهار گردید (شکل ۴). عصاره هیدروالکلی آویشن دنائی اثر مهاری کمتری بر رحم رات داشت و اثر ضداسپاسم آن با غلظت ۸۰ µg/ml در حمام بافت شروع شده و در غلظت ۱/۲۸ mg/ml حداکثر مهار انقباضات مشاهده شد و در این غلظت انقباضات به ۶۵٪ انقباضات اولیه کاهش یافت (شکل ۴). شروع اثر اسانس نیز در غلظت ۲ µg/ml بود و در غلظت ۶۴ µg/ml انقباضات به طور کامل مهار گردید (شکل ۴). معادل حجمی حامل عصاره (DMSO)، اثر مهاری معنی داری روی انقباضات ناشی از استیل کولین نداشت (ANOVA).

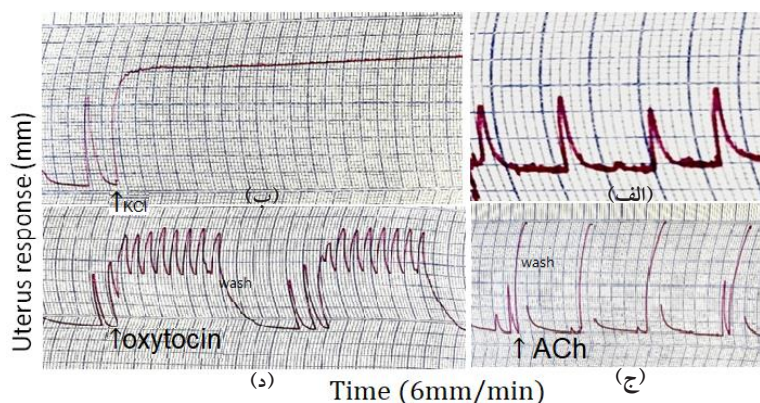
از تست آماری Student's t-test برای مقایسه تفاوت‌های بین گروهی استفاده شد. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. برای تجزیه و تحلیل آماری و رسم نمودارها از برنامه کامپیوتری SigmaPlot (نسخه ۱۵) استفاده شد.

یافته‌ها

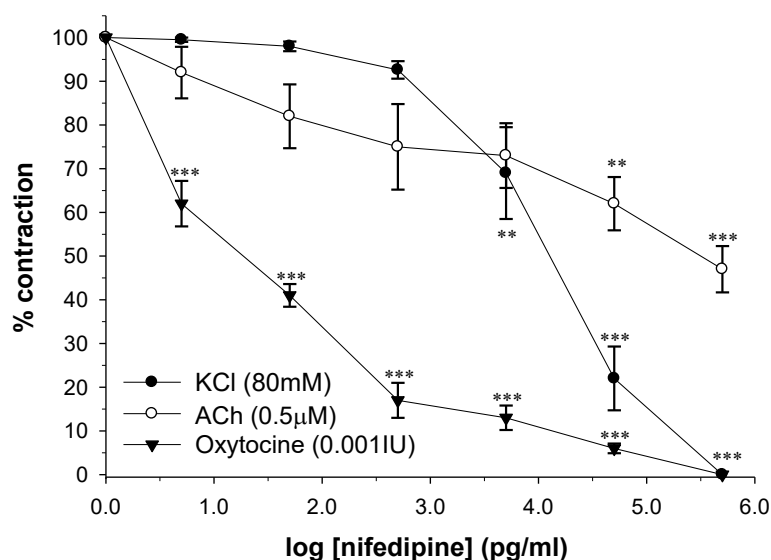
آنالیز گیاهی: بازده عصاره هیدروالکلی آویشن دنائی ۱۸ درصد محاسبه شد. بازده پارتیشن هگزانی ۰/۵٪ و بازده اسانس ۱٪ بود (W/W).

نتایج رنگ‌سنجی عصاره‌ها: عصاره هیدروالکلی دارای ۱۶۸ میلی گرم ترکیبات فنولی در هر گرم عصاره بر مبنای گالیک اسید و همچنین پارتیشن هگزانی دارای ۲۱۸ میلی گرم ترکیبات فنولی در هر گرم پارتیشن هگزانی بر مبنای گالیک اسید بود.

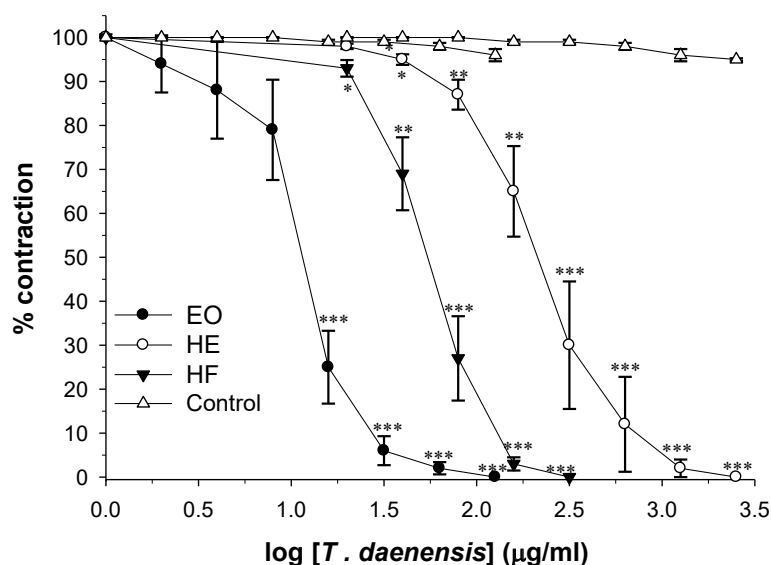
مطالعات فارماکولوژی: رحم رات قرار گرفته تحت کشش یک گرم در حمام بافت، انقباضات ریتمیک خود به خودی داشت (شکل ۱). افزودن اکسی توسین (۰/۰۰۱ IU/ml) انقباضات ریتمیک رحم را افزایش داد (شکل ۱). پس از شستشوی بافت، انقباض رحم تا حد تونسیته اولیه کاهش یافت (شکل ۱). نیفدیپین به صورت وابسته به غلظت، پاسخ القاء شده توسط اکسی توسین را مهار کرد (شکل ۲). از سوی دیگر، افزودن KCl (۸۰ mM) به داخل حمام، انقباض تونیک در رحم ایجاد کرد که در طول آزمایش پایدار بود (شکل ۱). نیفدیپین به طور وابسته به غلظت، پاسخ تونیک KCl را نیز کاهش داد (شکل ۲). افزودن استیل کولین (۰/۵ µM) به حمام بافت باعث انقباض فازیک در مدت زمان تماس با بافت شد و پس از شستشو به تونوسیتته پایه بازگشت (شکل ۱). این پاسخ استیل کولین نیز توسط نیفدیپین



شکل ۱- نمونه انقباضات ثبت شده از رحم رات؛ الف) انقباضات خود به خودی رحم، ب) انقباض ناشی از KCl (۸۰ mM)، ج) انقباض ناشی از استیل کولین (۰/۵ µM)، د) انقباضات ناشی از اکسی توسین (۰/۰۰۱ IU/ml)

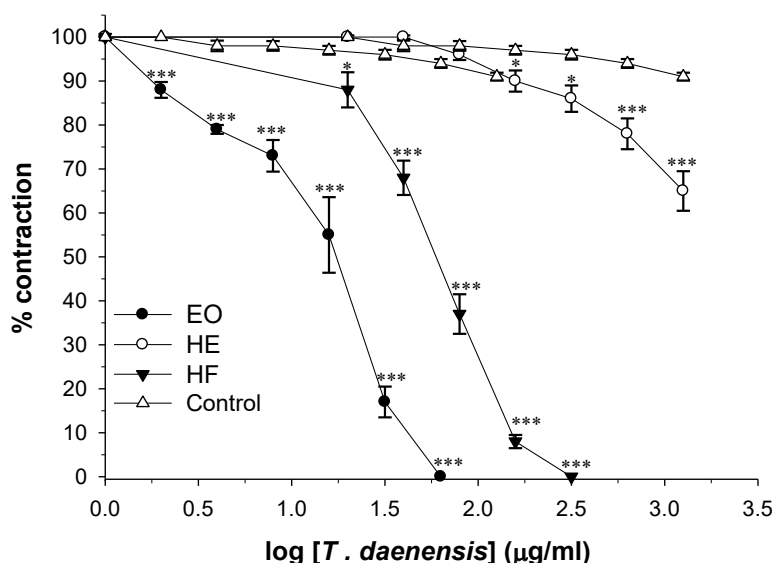


شکل ۲- اثر رفع انقباضی نیفدیپین بر انقباضات ناشی از KCl، استیل کولین و اکسی توسین در رحم جدا شده رات [محور عمودی نمودار نشان‌دهنده درصد پاسخ انقباضی و محور افقی نمودار نشان‌دهنده غلظت نیفدیپین است. نقاط روی منحنی، میانگین و خطوط عمودی رد شده از این نقاط SEM را نشان می‌دهند (n=6). بر اساس آنالیز آماری ANOVA کاهش معنی داری در پاسخ انقباضی بوجود آمده است. ستاره‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنادار نسبت به کنترل را نشان می‌دهد (**P<0.01 و ***P<0.001). (Tukey post-hoc test).



شکل ۳- اثر رفع انقباضی عصاره هیدروالکلی (HE)، پارتیشن هگزانی (HF) و اسانس (EO) گیاه آویشن دثانی بر اسپاسم ناشی از KCl (80 mM) در رحم رات

[محور عمودی نمودار نشان‌دهنده درصد پاسخ انقباضی و محور افقی نمودار نشان‌دهنده غلظت عصاره و اسانس گیاه آویشن دثانی است. نقاط روی منحنی، میانگین و خطوط عمودی رد شده از این نقاط SEM را نشان می‌دهند (n=6). براساس آنالیز آماری ANOVA تغییر معنی‌داری در گروه کنترل که تحت تأثیر معادل حجمی حامل (DMSO) قرار گرفته‌اند وجود ندارد. حداکثر مقدار استفاده شده از DMSO در حمام بافت ۳٪ است. ستاره‌ها تفاوت معنادار عصاره یا اسانس را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد (**P<0.01 و ***P<0.001 و *P<0.05). (Student's t-test).



شکل ۴- اثر رفع انقباضی عصاره هیدروالکلی (HE)، پارتیشن هگزانی (HF) و اسانس (EO) گیاه آویشن دنائی بر اسپاسم ناشی از استیل کولین (μM) (0.5) در رحم رات

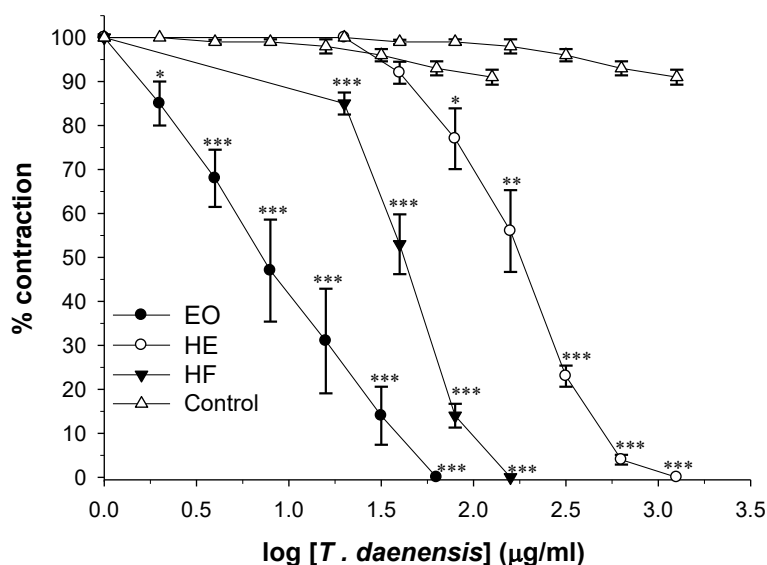
[محور عمودی نمودار نشان‌دهنده درصد پاسخ انقباضی و محور افقی نمودار نشان‌دهنده غلظت عصاره و اسانس گیاه آویشن دنائی است. نقاط روی منحنی، میانگین و خطوط عمودی رد شده از این نقاط SEM را نشان می‌دهند (n=6). براساس آنالیز آماری ANOVA تغییر معنی‌داری در گروه کنترل که تحت تأثیر معادل حجمی حامل (DMSO) قرار گرفته‌اند وجود ندارد. حداکثر مقدار استفاده شده از DMSO در حمام بافت ۰.۸٪ است. ستاره‌ها تفاوت معنادار عصاره یا اسانس را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد (Student's t-test, *P<۰.۰۵ و ***P<۰.۰۰۱).

بومی دارد. گیاهان دارویی که فعالیت ضداسپاسم دارند، ممکن است بر انقباضات طبیعی رحم تأثیر بگذارد. با این حال، در فرآیند طراحی و توسعه دارو، اثرات داروها بر فعالیت انقباضی رحم به‌طور معمول بررسی نمی‌شود. در این تحقیق، انقباض عضلات صاف رحم رات به سه روش مختلف، به منظور مقایسه گسترده‌تر فعالیت آنتی اسپاسم، القاء شد. عضلات صاف رحم در دوران بارداری و سیکل استروس، زمانی که رحم با استروژن پیش درمانی می‌شود، نسبت به اسپاسموژن‌ها، حساس‌تر است (Gnanamanickam and Llewellyn-Smith, 2011). پیش درمانی با استرادیول، رحم رات را در سیکل استروس قرار می‌دهد و انقباضات خود به خودی عضلات صاف رحم را تقویت می‌کند. اکسی توسین یک اولیگوپپتید است که به طور انتخابی ماهیچه صاف رحم را منقبض می‌کند. حساسیت بالای بافت به اکسی توسین در محیط هورمونی مناسب، دیده می‌شود. استروژن سنتز گیرنده اکسی توسین را القاء می‌کند و در نتیجه حساسیت به اکسی توسین را افزایش می‌دهد. عملکرد فیزیولوژیکی اکسی توسین افزایش انقباضات ریتمیک رحم، با تحریک مستقیم انقباضات فازیک، رحم است. اکسی توسین با عمل از طریق گیرنده‌های اکسی توسین، باعث آزاد شدن یون Ca^{2+} از ذخایر

اثر مهارى اسانس، عصاره هیدروالکلی و پارتیشن هگزانی آویشن دنائی بر پاسخ‌های انقباضی ریتمیک ناشی از اکسی توسین (۰.۰۰۱ IU/mL) به صورت وابسته به غلظت بود. شروع اثر ضداسپاسم عصاره هیدروالکلی بر روی پاسخ اکسی توسین در غلظت ۴۰ μg/ml مشاهده شد و در غلظت ۱.۲۸ mg/ml انقباضات به طور کامل مهار گردید (شکل ۵). پارتیشن هگزانی جدا شده از عصاره هیدروالکلی آویشن دنائی اثر بازدارندگی قوی‌تری بر روی عضلات صاف رحم داشت. شروع اثر مهارى پارتیشن هگزانی در غلظت ۲۰ μg/ml مشاهده شد و در غلظت ۱۶۰ μg/ml انقباضات به طور کامل مهار گردید (شکل ۵). شروع اثر مهارى اسانس آویشن دنائی روی انقباضات رحم با غلظت ۲ μg/ml رخ داد و در غلظت ۶۴ μg/ml انقباضات به طور کامل مهار گردید (شکل ۵). غلظتی از دارو که موجب ۵۰٪ حداکثر پاسخ مهارى می‌شود (IC_{50}) برای مقایسه در جدول ۱ آمده است. معادل حجمی حامل (DMSO) اثر مهارى معنی‌داری روی انقباضات ناشی از اکسی توسین نداشت (ANOVA).

بحث

آویشن دنائی به‌طور سنتی مصرف گسترده‌ای در میان مردم



شکل ۵- اثر رفع انقباضی عصاره هیدروالکلی (HE)، پارتیشن هگزانی (HF) و اسانس (EO) گیاه آویشن دنائی بر اسپاسم ناشی از اکسی توسین (IU/ml) در رحم رات (0.001)

[محور عمودی نمودار نشان‌دهنده درصد پاسخ انقباضی و محور افقی نمودار نشان‌دهنده غلظت عصاره و اسانس گیاه آویشن دنائی است. نقاط روی منحنی، میانگین و خطوط عمودی رد شده از این نقاط SEM را نشان می‌دهند (n=6). براساس آنالیز آماری ANOVA تغییر معنی داری در گروه کنترل که تحت تأثیر معادل حجمی حامل (DMSO) قرار گرفته‌اند وجود ندارد. حداکثر مقدار استفاده شده از DMSO در حمام بافت ۰/۸٪ است. ستاره‌ها تفاوت معنادار عصاره یا اسانس را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد (***P<۰/۰۰۱ و **P<۰/۰۱ و *P<۰/۰۵ و Student's t-test).

جدول ۱- مقایسه مقدار IC_{50} نیفدیپین، عصاره و اسانس آویشن دنائی روی انقباضات رحم رات

دارو	IC_{50}		
	KCl (80mM)	Oxytocin (0.001 IU/ml)	ACh (0.5µM)
نیفدیپین	12.6 ± 5.78 ng/ml	0.2 ± 0.09 ng/ml	31.6 ± 9.8 ng/ml
عصاره هیدروالکلی	224 ± 10.4 µg/ml	177.8 ± 26 µg/ml	>1280 µg/ml
پارتیشن هگزانی	55 ± 7.5 µg/ml	44.6 ± 3.4 µg/ml	58.8 ± 5.8 µg/ml
اسانس	11.2 ± 2.1 µg/ml	7.1 ± 2.9 µg/ml	17.8 ± 2.1 µg/ml

مقدار IC_{50} (غلظتی از دارو که موجب ۵۰٪ حداکثر اثر مهاری می‌شود در بافت رحم شده است) از روی منحنی غلظت پاسخ برای هر بافت محاسبه شده است. نتایج به صورت mean±SEM برای هر گروه از نتایج ارائه شده است (n=6).

می‌کند (Ratz et al., 2005).

ماسراسیون یک روش مرسوم است که شامل خیساندن مواد گیاهی در یک حلال هیدروالکلی برای یک دوره زمانی است (Sasidharan et al., 2011). عصاره هیدروالکلی آویشن دنائی تهیه شده، انقباض ناشی از KCl، استیل کولین و اکسی توسین بر روی رحم جدا شده از رات را مهار کرد و وجود ترکیبات بیولوژیک فعال با خواص ضد اسپاسم را تایید کرد. ترکیبات موجود در عصاره هیدروالکلی آویشن دنائی شامل برخی مواد قطبی و غیرقطبی می‌شود. با این وجود، ماهیت این

درون سلولی می‌شود و به طور غیرمستقیم کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ را فعال می‌کند. افزایش یون آزاد Ca^{2+} سیتوزول باعث انقباض عضلات صاف رحم می‌شود (Holda et al., 1996). استیل کولین یک نوروترانسمیتر طبیعی است که مستقیماً بر روی گیرنده‌های موسکارینی عضله صاف تأثیر می‌گذارد و با آزاد کردن یون Ca^{2+} از ذخایر درون سلولی باعث انقباض می‌شود (Unno et al., 2005). افزودن غلظت بالای KCl به حمام بافت، باعث دپولاریزه شدن غشاء سلول‌های عضله صاف رحم شده و در نتیجه کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ را فعال

و می‌توانستند طی فرایند روتاری تبخیر شوند (Rowshan *et al.*, 2013). دوماً، اسانس تنها درصد بسیار کمی از ترکیبات موجود در عصاره را تشکیل می‌دهند؛ بنابراین، به‌احتمال زیاد علاوه بر اسانس، اجزای دیگری با پتانسیل ضداسپاسم قوی در پارتیشن‌های هگزانی می‌تواند وجود داشته باشد که در اثر مهاری پارتیشن هگزانی نقش داشته باشد. در نتیجه، توصیه می‌شود که اجزای پارتیشن هگزانی توسط کروماتوگرافی ستونی جدا شده و از نظر فعالیت ضداسپاسم آن‌ها غربالگری شود.

مقایسه مقدار IC_{50} محاسبه شده آویش دئانی با سایر عصاره‌های گیاهی روی انقباضات رحم رات، بیانگر این است که اثر ضداسپاسمی اسانس و عصاره هیدروالکلی آویشن دئانی شباهت زیادی به اثرات گزارش شده اسانس و عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی (Sadraei *et al.*, 2003) و زرین گیاه (Sadraei *et al.*, 2016) دارد، ولی اثر مهاری عصاره هیدروالکلی آویشن دئانی روی انقباضات رحم رات دو برابر قوی‌تر از اسطوخدوس و رزماری (Sadraei *et al.*, 2019) و چهار برابر قویتر از بابونه (Sadraei *et al.*, 2020) است.

نتیجه‌گیری

اگرچه مواد گیاهی به عنوان منبع مهمی برای غربالگری دارو در نظر گرفته می‌شوند، اما ثابت شده است که جداسازی و شناسایی یک ماده شیمیایی گیاهی بسیار پرهزینه و زمان‌بر است. در این مطالعه، از رویکرد مبتنی بر زیست‌فعالی (Bioactivity)، برای تایید فعالیت ضداسپاسم عصاره هیدروالکلی، پارتیشن هگزانی و اسانس آویشن دئانی استفاده شد. با مقایسه فعالیت اسپاسمولیتیک اسانس و پارتیشن هگزانی نسبت به عصاره هیدروالکلی، نشان داده شد که بیشتر ترکیبات فعال دارای خواص غیرقطبی هستند. در این تحقیق نشان داده شده که عصاره و اسانس آویشن دئانی اثر رفع انقباضی روی عضلات رحم دارند و در عارضه‌هایی که در آن‌ها اسپاسم رحم نقش دارد (مانند قاعدگی‌های دردناک، زایمان زودرس و اسپاسم‌های نابجای رحمی)، می‌تواند مفید باشد. بنابراین، شناسایی ترکیبات مؤثره گیاه و تکمیل مطالعات فارماکولوژی توصیه می‌شود.

تصدیق: این پروژه بخشی از پایان نامه دکتری داروسازی غزل دهقان به عنوان دانشجوی دکتری داروسازی در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان بود.

مشارکت نویسندگان: HS مدیر پروژه بوده و بر مطالعات فارماکولوژیک نظارت داشته و مسئول نوشتن مقاله است. تهیه

اجزای بیولوژیک هنوز ناشناخته است؛ بنابراین عصاره تهیه شده با روش معمولی و با حلالیت نسبی، در دو مایع غیرقابل اختلاط مختلف به منظور تغلیظ بیشتر ترکیب فعال بیولوژیکی، جداسازی شد؛ پس برای آزمایش زیست‌فعالی تعریف شده، عصاره در مخلوط هگزان و آب حل شد. به این ترتیب ترکیبات بر اساس اختلاف قطبی آن‌ها جدا شدند. در این روش، ترکیبات لیپوفیلیک عمدتاً درون فاز هگزانی حل می‌شوند؛ در حالی که ترکیبات هیدروفیلیک در محلول آبی باقی می‌مانند. پارتیشن هگزانی آویشن دئانی، به روش وابسته به غلظت، انقباضات رحم ایزوله شده رات را که توسط KCl، استیل کولین و اکسی توسین ایجاد شده بود، مهار کرد با این تفاوت که اسپاسم ایجاد شده را در غلظت بسیار پایین تر مهار کرد. مقایسه فعالیت ضداسپاسم پارتیشن هگزانی نشان می‌دهد که بیشترین اجزای بیولوژیک اسپاسمولیتیک در فاز هگزانی حل می‌شوند. به عنوان مثال، پارتیشن هگزانی به ترتیب ۴، ۲۷، ۳/۴ برابر قوی‌تر از عصاره هیدروالکلی در مهار انقباض‌های ناشی از KCl، استیل کولین و اکسی‌توسین بود (جدول ۱).

روش استخراج تقطیر با آب یک تکنیک مرسوم است که بازده اسانس بالایی از مواد گیاهی به دست می‌آورد (Okonkwo and Ohaeri, 2008). اسانس‌ها، مواد لیپوفیلیک غیرقطبی هستند که می‌توانند مسئول اثر آنتی اسپاسم مشاهده شده باشند. بنابراین، اثر رفع انقباضی اسانس آویشن دئانی بر روی انقباضات رحم نیز مورد بررسی قرار گرفت. اسانس آویشن دئانی، به‌صورت وابسته به غلظت، انقباضات ناشی از KCl و استیل کولین و اکسی‌توسین را مهار کرد. اثر مهاری اسانس روی انقباضات ناشی از KCl، استیل کولین و اکسی‌توسین در مقایسه با پارتیشن هگزانی، به ترتیب ۵، ۳/۳، ۶/۳ برابر قوی‌تر عمل بود (جدول ۱). تیمول و کارواکرول بیشترین ترکیبات موجود در اسانس آویشن دئانی هستند (Sabahi, 2013). بنابراین، اثر مهاری اسانس ممکن است به دلیل حضور ترکیباتی مانند تیمول و کارواکرول باشد که اثرات ضداسپاسم آن‌ها گزارش شده است (Husnu-Can- Baser, 2008; Premrov-Bajuk *et al.*, 2022). اسانس نسبت به پارتیشن هگزانی؛ غنی تر از ترکیبات لیپوفیل فرار بوده و قوی‌تر عمل می‌کند (Nickavar *et al.*, 2005; Nori-Shargh *et al.*, 2005). با این حال اگرچه اسانس‌ها مواد غیرقطبی هستند، اما تنها می‌توانند سهم کمی در اثر مهارکنندگی پارتیشن هگزانی داشته باشند؛ زیرا اولاً اسانس‌ها بسیار فرار هستند

دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد. این پروژه توسط کمیته اخلاقی دانشگاه (IR.MUI.RESEARCH.REC.1401.035) تایید شد. **تامین و حمایت مالی:** این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان (پروژه: 3401621) انجام شد.

References

Azadbakht M, Dehkordi NG, Sadjadi S, Ghannadi A, Ammanzadeh Y, Asgari G, Amin GR, Hajiakhoondi A, Taleb AM. 2003. Iranian herbal pharmacopoeia. Hakim Research 6: 63-69. (In Farsi)

Babaei M, Abarghoie ME, Ansari R, Vafaei AA, Taherian AA, Akhavan MM, Toussy G, Mousavi, S. 2008. Antispasmodic effect of hydroalcoholic extract of *Thymus vulgaris* on the guinea-pig ileum. Natural Product Research 22 (13): 1143-1150. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786410601130257>.

Bahaoddini A, Dadfar F, Ahmadipour M. 2021. The Effects of hydroalcoholic extract of Thyme (*Zataria multiflora* Boiss.) on mechanical activity of isolated colon of male rat. Journal of Advanced Biomedical Sciences 11(1): 3735-3740.

Boskabady MH, Jalali S, Farkhondeh T, Byrami G. 2014. The extract of *Zataria multiflora* affect tracheal responsiveness, serum levels of NO, nitrite, PLA2, TP and histamine in sensitized guinea pigs. Journal of Ethnopharmacology 156: 301-308. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.08.024>.

Emami Bistgani Z, Sefidkon F. 2019. Review on ethnobotany, phytochemical, molecular and pharmacological activity of *Thymus daenensis* Celak. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 22 (4): 101400. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101400>.

Gnanamanickam GJE, Llewellyn-Smith IJ. 2011. Innervation of the rat uterus at estrus: A study in full-thickness, immunoperoxidase-stained whole-mount preparations. Journal of Comparative Neurology 519 (4): 621-643. DOI: <https://doi.org/10.1002/cne.22515>.

Holda JR, Oberti C, Perez-Reyes E, Blatter LA. 1996. Characterization of an oxytocin induced rise in $[Ca^{2+}]_i$ in single human myometrium smooth muscle cells. Cell Calcium 20 (1): 43-51. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0143-4160\(96\)90049-4](https://doi.org/10.1016/s0143-4160(96)90049-4).

Husnu-Can-Baser K. 2008. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. Current Pharmaceutical Design 14 (29): 3106-3120. DOI: <https://doi.org/10.2174/138161208786404227>.

Ikawa M, Schaper TD, Dollard CA, Sasner JJ. 2003. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compound. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51 (7): 1811-1815. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf021099r>.

Jalas J. 1974. Notes on *Thymus* L. (Labiatae) in Europe. III.

عصاره هیدروالکلی، پارتیشن هگزانی و اسانس تحت نظارت AY بود و HS و MG مسئول کار تجربی و تجزیه و تحلیل داده‌ها بودند. همه نویسندگان نسخه نهایی را برای انتشار تأیید کردند. **تضاد منافع:** نویسندگان هیچ تضاد منافع را اعلام نمی‌کنند و مسئول محتوا و نگارش این مقاله هستند. **ملاحظات اخلاقی:** مراقبت از حیوانات و آزمایشات مطابق با

Annales Botanici Fennici 11 (4): 262-266.

Jamzad, Z. 2019. Iranian Thymes and spices. 1st Ed: Research Institute of Forests and Pastures 22-23.

Khazdair MR, Gholamnezhad Z, Saadat S, Boskabady MH. 2022. Relaxant effect of *Zataria multiflora* Boiss L. and its ingredients on smooth muscles, possible mechanisms and clinical application. Physiology and Pharmacology 26 (3): 213-225. DOI: <http://dx.doi.org/10.52547/phypha.26.3.2>.

Moazeni N, Khajeali J, Izadi H, Mahdian K. 2013. Chemical composition and bioactivity of *Thymus daenensis* Celak. (Lamiaceae) essential oil against two lepidopteran stored-product insects. Journal of Essential Oil Research 26 (2): 118-124. DOI: <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.860412>.

Mohammadpour G, Majd A, Najhadsatari T, Mehrabian S, Hosseinzadeh Kalagar A. 2011. Antibacterial and antifungal effects of three genus of Thyme plants and two ecotypes of *Ziziphora* and *Satureja bachtiarica* essential oils. Journal of Science (Islamic Azad University) 20 (78): 111-120.

Naseri MKG, Mazlomi H, Goshairesh M, Vakilzadeh G, Heidari A. 2006. Antispasmodic effect of *Zataria multiflora* boiss. leaf extract on the rat uterus. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 5 (2): 131-136. DOI: <https://doi.org/10.22037/ijpr.2010.665>.

Nickavar B, Mojab F, Dolat-Abadi R. 2005. Composition of the volatile oil of *Thymus daenensis* Celak. subsp. *daenensis*. Journal of Medicinal Plants 4 (13): 45-49. DOR: <https://dor.isc.ac/dor/20.1001.1.2717204.2005.4.13.15.6>.

Nori-Shargh D, Baharvand B, Raftari S, Deyhimi F. 2005. The volatile constituent's analysis of *Thymus daenensis* Celak from Iran. Journal of Science (Islamic Azad University) 15 (56): 221-226.

Okonkwo CO, Ohaeri OC. 2019. Comparative study of steam distillation and soxhlet for the extraction of botanical oils. Asian Journal of Biological Sciences 13 (1): 62-69.

Phillipson JD, Anderson LA, Barnes J. 1996. Herbal medicines, a guide for healthcare professionals. 2nd Ed. London: The Pharmaceutical Press pp. 296.

Premrov-Bajuk B, Prem L, Vake T, Žnidaršič N, Snoj T. 2022. The effect of thymol on acetylcholine-induced contractions of the rat ileum and uterus under *ex vivo* conditions. Frontiers in Pharmacology 13: 990654. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.990654>.

Ratz P, Berg K, Urban H, Miner A. 2005. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as calcium-sensitizing stimulus. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 288 (4): C769-C783. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajp-cell.00529.2004>.

Rowshan V, Bahmanzadegan A, Saharkhiz M. 2013. Influence of storage conditions on the essential oil composition of *Thymus daenensis* Celak. *Industrial Crops and Products* 49: 97-101. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.029>.

Sabahi Z, Zarshenas MM, Farmani F, Faridi P, Moein S, Moein M. 2013. Essential oil composition and in vitro antioxidant activity of ethanolic extract of *Thymus daenensis* Celak from Iran. *Global Journal of Pharmacology* 7: 153-158. DOI: <https://doi.org/10.5829/idosi.gjp.2013.7.2.71124>.

Sadraei H, Asghari G, Jamali H. 2018. Antidiarrheal action of *Zataria multiflora* hydroalcoholic and hexane extracts in mice. *Journal of Herbmmed Pharmacology* 7 (1): 22-28. DOI: <https://doi.org/10.15171/jhp.2018.05>.

Sadraei H, Ghannadi A, Takei-Bavani M. 2003. Effects of *Zataria multiflora* and *Carum carvi* essential oils and hydroalcoholic extracts of *Passiflora incarnata*, *Berberis integerrima* and *Crocus sativus* on rat isolated uterus. *International Journal of Aromatherapy* 13 (2): 121-127. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0962-4562\(03\)00092-4](https://doi.org/10.1016/S0962-4562(03)00092-4).

Sadraei H, Asghari G, Alinejad M. 2016. Comparison of antispasmodic effect of hydroalcoholic extract of *Dracocephalum kotschy* Boiss. in rat uterus and ileum. *Research in Pharmaceutical Sciences* 11 (4): 284-292. DOI: <https://doi.org/10.4103/1735-5362.189295>.

[org/10.4103/1735-5362.189295](https://doi.org/10.4103/1735-5362.189295).

Sadraei H, Sajjadi SE, Asghari G, Khalili M. 2020. Effect of *Matricaria chamomilla* hydro-alcoholic and flavonoids rich extracts on rat isolated uterus. *Journal of Herbmmed Pharmacology* 9 (1): 35-41. DOI: <https://doi.org/10.15171/jhp.2020.05>.

Sadraei H, Asghari G, Vasileha N. 2019. Antispasmodic effect of hydroalcoholic extracts of rosemary and lavender on rat isolated uterus contractions. *Journal of Isfahan Medical School* 37 (546): 1136-42.

Singh J. 2008. Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants. Lucknow, India: Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants 32-35.

Teimouri M. 2012. Antimicrobial activity and essential oil composition of *Thymus daenensis* Celak. from Iran. *Journal of Medicinal Plant Research* 6 (4): 631-635. DOI: <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1347>.

Unno T, Matsuyama H, Sakamoto T, Uchiyama M, Izumi Y, Okamoto H, Yamada M, Wess J, Komori S. 2005. M₂ and M₃ muscarinic receptor-mediated contractions in longitudinal smooth muscle of the ileum studied with receptor knockout mice. *British Journal of Pharmacology* 146: 98-108. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706300>.

Zarshenas MM, Krenn L. 2015. A critical overview on *Thymus daenensis* Celak.: Phytochemical and pharmacological investigations. *Journal of Integrative Medicine* 13 (2): 91-98. DOI: [https://doi.org/10.1016/s2095-4964\(15\)60166-2](https://doi.org/10.1016/s2095-4964(15)60166-2).