Complementary Medicine Journal
Arak University of Medical Sciences

January 2022. Vol 11. Issue 4

Research Paper

Investigating the Safety of Bee Pollen on Performance, Oxidative Stress, and Histopathological Changes in the Liver, Kidney, and Pancreas of Rats

Neda Sistani Karampour[1], Mohammad Javad Bagheri[2], Laya Sadat Khorsandi[3], Zeinab Dehghan Mohammadi[4], *Maryam Salehcheh[5], Hooman Honarmand[2]

1. Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Marine Pharmaceutical Sciences Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
2. Toxicology Department, Pharmacy faculty, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
3. Department of Histology, Faculty of Medicine, Cellular and Molecular Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
4. Diabetes Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
5. Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Toxicology Research Center, Basic Medical Sciences Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Sistani Karampour N, Bagheri M J, Khorsandi L S, Dehghan Mohammadi Z, Salehcheh M. [Investigating the Safety of Bee Pollen on Performance, Oxidative Stress, and Histopathological Changes in the Liver, Kidney, and Pancreas of Rats (Persian)]. Complementary Medicine Journal. 2022; 11(4):330-345. https://doi.org/10.32598/cmja.11.4.1094.1

https://doi.org/10.32598/cmja.11.4.1094.1

CC BY NC

Article Info:
Received: 19 Jul 2021
Accepted: 11 Nov 2021
Available Online: 01 Jan 2022

Keywords:
Bee pollen, Oxidative stress, Liver, Kidney, Pancreas, Histopathology, Rat

ABSTRACT

Objective The therapeutic effects of bee pollen have already been proven in various studies, but toxicity studies in this field are limited. Therefore, in this study, the possible toxicity effects of hydroalcoholic extract of flower pollen on liver, kidney, and pancreatic tissues of male rats are investigated.

Methods Fourteen male rats were divided into two groups of seven: the first group received 800 mg/kg hydroalcoholic extract of bee pollen, and the second group received 0.5 mL/100 g normal saline intraperitoneally for 1 day. Then, their livers, kidney, pancreas, and oxidative stress biomarkers were evaluated. In addition, pieces of liver, kidney, and pancreatic tissues were examined histopathologically.

Results Blood urea nitrogen (BUN) (P =0.0212), aspartate aminotransferase (AST) enzymes (P =0.0344), and malondialdehyde (MDA) biomarker (P =0.018) of kidney tissue were significantly decreased in the hydroalcoholic extract of bee pollen group compared to the control group. The glutathione (GSH) biomarker of kidney tissue showed a significant increase in this group compared to the control group (P =0.0031). The other evaluated parameters were not significantly different between the two groups (P> 0.05). Histopathologically, no deleterious and toxicity effects were observed in the tissues.

Conclusion Bee pollen has therapeutic properties and, as a nutrient, can be useful and effective for humans. In this study, this substance did not have toxicity effects on the liver, kidney, and pancreas and even protected vital organs in oxidative stress conditions. However, more research is needed to prove the toxicity of this valuable substance and to ensure its safety.

Extended Abstract

Introduction

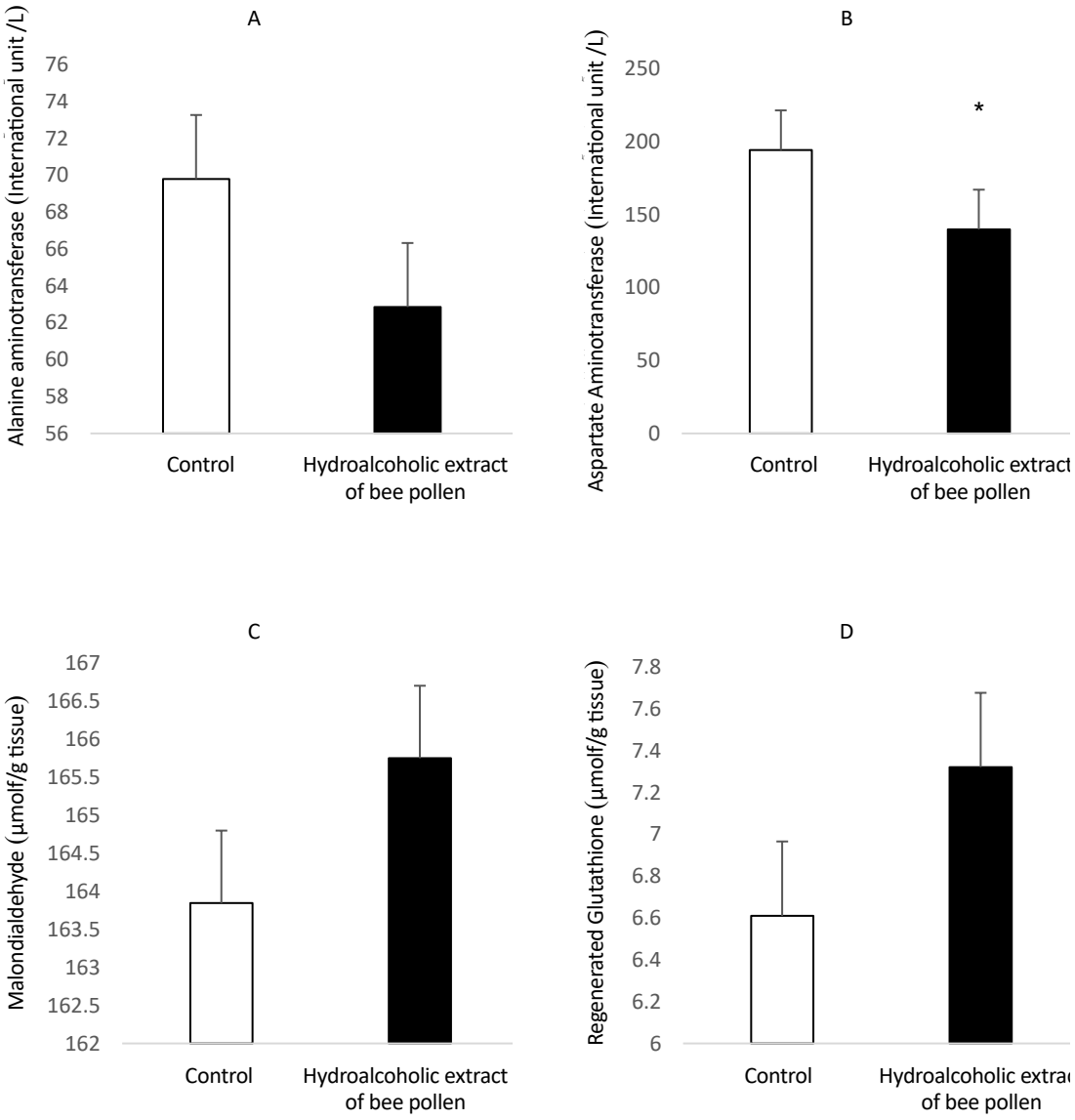
Bee pollen is one of the natural compounds, and its effects have been studied in traditional medicine in the last decade. Bee pollen contains carbohydrates, fiber, lipids, essential amino acids, and flavonoid compounds. The anti-inflammatory effect of bee pollen is due to flavonoids, phenolic acid, phytosterols, and substances such as anethole. The features of this material included the capability to eliminate

* *Corresponding Author:*
Maryam Salehcheh, PhD
Address: Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Toxicology Research Center, Basic Medical Sciences Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
Tel: +98 (916) 6075337
E-mail: maryamsalehcheh@gmail.com

the swelling caused by cardiovascular and kidney damage, protection of the liver against carbon tetrachloride, and reduction of inflammation and enlargement of the prostate.

Another therapeutic use of bee pollen is the inhibition of lipid peroxidation after the use of chemotherapeutic drugs. Consumption of pollen or its extracts has a strong antioxidant effect and protects the liver and small intestine against damage caused by some toxins.

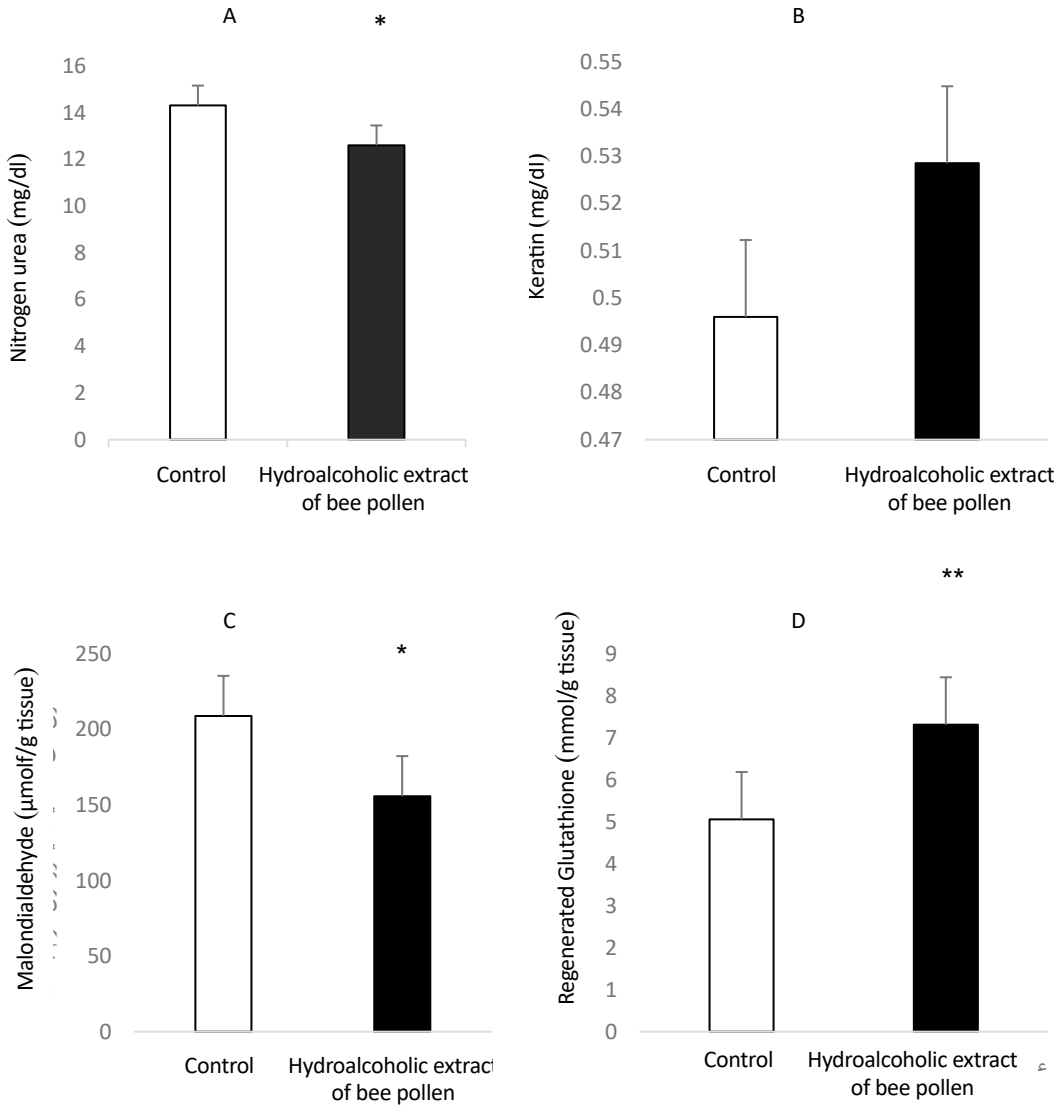
In previous studies, this substance has had several pharmacological effects on improving memory, anti-anxiety effects, anticonvulsant properties, and healing gastric ulcers in one day with multiple doses. Therefore, the effective dose has been selected by reviewing previous studies. On the other hand, toxicological studies on bee pollen seem necessary and significant due to the lack of studies on the toxicity of bee pollen on health or body organs. Hence, in this study, we decided to evaluate the safety of bee pollen on function, oxidative stress,



Complementary Medicine Journal
Arak University of Medical Sciences

Figure 1. Evaluation of ALT biomarkers of image serum (a) and serum AST image (b), MDA diagram (c) and GSH image (d) of liver tissue in the control group and the group receiving hydroalcoholic extract of bee pollen at a dose of 800 mg / kg intraperitoneally In a single dose after 24 hours.

* Significant difference with the control group in the range of P <0.05



Complementary Medicine Journal
Arak University of Medical Sciences

Figure 2. Evaluation of BUN image serum (a), Cr serum image (b), biomarkers MDA image (c) and GSH image (d) kidney tissue in two control groups and the group receiving hydroalcoholic extract of bee pollen with a dose of 800 mg / kg internally Peritoneal single dose after 24 hours.

* Significant difference with the control group in the range of P <0.05

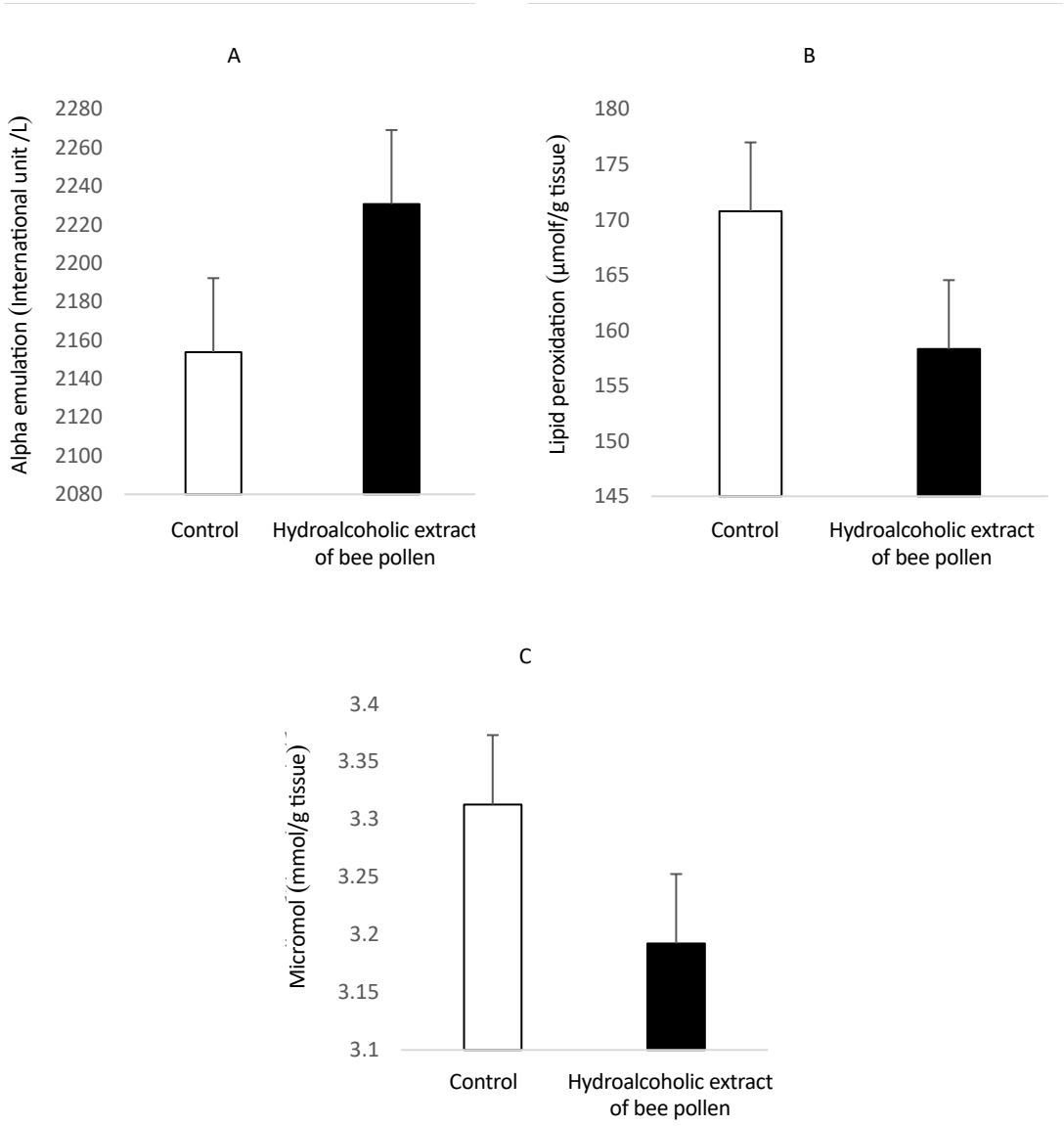
** Significant difference with the control group in the range of P <0.01

and histopathological changes in rats' liver, kidney, and pancreas.

Methods

In this study, the bee pollen was extracted by the soaking method. Then, 14 Sprague-Dawley male rats (weight range: 200-250 g) were randomly divided into two groups (7 rats in each group). Group 1 (extract group) received bee pollen hydroalcoholic extract at a single dose of 800 mg/kg intraperitoneally, and group 2 (control group) received normal saline at a single dose of 0.5 mL/100 g intraperitoneally.

One day after the extract injection, the rats were weighed, and the blood sampling was performed directly from their hearts. Blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (Cr), α-amylase, AST aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT) tests were performed using a Pars Azmun test kit with an



Complementary Medicine Journal
Arak University of Medical Sciences

Figure 3. Evaluation of serum α-amylase biomarkers of image (a) and MDA image (b), GSH image (c) of pancreatic tissue in two control groups and the group receiving hydroalcoholic extract of bee pollen with a dose of 800 mg / kg intraperitoneally and in single dose and After 24 hours

autoAnalyzer. A piece of tissue was isolated for pathological tests and stained (hematoxylin and eosin), and another piece was isolated to measure tissue biomarkers of malondialdehyde (MDA) with thiobarbituric acid reagent and regenerated glutathione (GSH) test by the Ellman method. The collected tissues were mixed with a phosphate buffer with a mixing homogenizer to perform tissue tests and then centrifuged, and the supernatant was taken. The supernatant was used for malondialdehyde tests with thiobarbituric acid reagent and regenerated glutathione test by the Ellman method. Then, the concentration of tissue malondialdehyde was expressed in µmolf/g tissue, and the concentration of reduced glutathione was expressed in mmol/g tissue. The obtained data were analyzed using SPSS software.

Results

Serum ALT (a) level decreased in the group receiving extract compared to the control group, but this decrease was not statistically significant. However, serum AST levels in the group receiving extract showed a signifi-

cant decrease compared to the control group (b). There was no statistically significant difference between tissue biomarkers in the liver, including MDA and GSH (c and d), in the control group and the group receiving extract (Figure 1).

Serum BUN level in the extract group was significantly reduced compared to the control group (a). However, the serum Cr level increased in the extract group compared to the control group, which was not statistically significant (b). MDA renal tissue biomarker in the extract group showed a significant decrease compared to the control group (c), and GSH renal tissue biomarker (d) was significantly increased in the extract group compared to the control group (d) (Figure 2).

There was no significant difference between serum levels of α-amylase in the extract group and the control group (a). Also, no significant difference was observed between the level of tissue biomarkers, including GSH (c) and MDA (b), in the control group and the group receiving the extract (Figure 3).

Histopathological studies of tissues indicated no significant difference between the control group and the extract group in all tissues of the liver, kidney, and pancreas, and practically all tissues were healthy and had no damage caused by the extract.

Discussion

In this study, the weight of internal organs was evaluated as a percentage of tissue weight index, and the results indicated that pollen was not toxic on the studied tissues.

Kidney biomarkers were examined. The BUN amount in the extract group was significantly reduced compared to the control group; however, no significant change was observed in the Cr, indicating the protective and antioxidant role of pollen. The amount of malondialdehyde (MDA) in kidney tissue was measured, and it was observed that the amount of MDA in kidney tissue in the extract group was significantly lower compared to the control group and the amount of tissue glutathione which is an antioxidant, increased in the group receiving the extract compared to the control group in the kidney tissue. Liver biomarkers were also measured, and there was no significant difference between the two study groups on the level of ALT enzyme; however, AST enzyme was significantly reduced in the extract group. The current study indicates that consuming the hydroalcoholic extract of bee pollen does not have a detrimental effect on liver hepatocytes, and it can even play an influential role in treating liver problems by reducing AST (20). Additionally, a review of previous studies confirms the protective effects and non-hepatotoxicity of this substance. Liver tissue biomarkers (MDA and GSH) in the control group and the extract group were examined, and no statistically significant difference was found between the two groups. In this regard, the studies demonstrated that bee pollen could play a protective role. In pancreas biomarkers (α-amylase) and tissue biomarkers (MDA and GSH), there was no statistically significant difference between the extract group and the control group, which indicates no harmful role and damage of this substance to the pancreas. Histopathological examinations of liver, kidney, and pancreas tissues in this study indicated no significant difference between the tissues studied in the group receiving the hydroalcoholic extract of bee pollen and the control group. No toxic effects were observed in the studied tissues.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study is the result of Mohammad Javad Bagheri, a doctoral dissertation in pharmacy. The cost of this dissertation has been paid from the credit of the research plan approved No. B-97055 of Ahvaz Jondishapur University of Medical Sciences and with the ethics code IRAJUMS.ABHC.REC.1397.049.

Funding

The costs of this study are provided by the credit of the research project approved No. B-97055 of Ahvaz Jondishapur University of Medical Sciences.

Authors' contributions

Working with animals and observing ethics in working with animals and supervision: Neda Sistani; Doing laboratory work: Mohammad Javad Bagheri; Pathology tests: Liasadat Khorsandi; Working with laboratory devices: Zeinab Dehghan Mohammadi; Study design, project supervision, data analysis and writing the initial draft of the article: Maryam Saleh Che.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

مقاله پژوهشی

بررسی ایمنی گرده گل زنبور عسل بر عملکرد، استرس اکسیداتیو و تغییرات هیستوپاتولوژی کبد، کلیه و پانکراس موش صحرایی

ندا سیستانی کرم‌پور[۱]، محمدجواد باقری[۲]، لعیا سادات خرسندی[۳]، زینب دهقان محمدی[۴]، *مریم سله‌چه[۵]، هومن هنرمند[۲]

۱. گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات علوم دارویی دریایی دانشگاه علوم‌پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران.
۲. گروه سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم‌پزشکی جندی‌شاپور اهواز ، اهواز، ایران.
۳. گروه بافت‌شناسی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی خلیج فارس، پژوهشکده علوم پایه پزشکی دانشگاه علوم‌پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران.
۴. مرکز تحقیقات دیابت، دانشگاه علوم‌پزشکی جندی‌شاپور اهواز ، اهواز، ایران.
۵. گروه سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات سم‌شناسی، پژوهشکده علوم پایه پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۲۸ تیر ۱۴۰۰
تاریخ پذیرش: ۲۰ آبان ۱۴۰۰
تاریخ انتشار: ۱۱ دی ۱۴۰۰

چکیده

هدف آثار درمانی گرده گل زنبور عسل در مطالعات مختلف به اثبات رسیده، ولی مطالعات سمیت در این زمینه محدود است؛ بنابراین در این مطالعه آثار سمیت احتمالی عصاره هیدروالکلی گرده گل روی بافت‌های کبد، کلیه و پانکراس موش صحرایی نر بررسی شد.

روش‌ها چهارده سر موش صحرایی نر به دو گروه هفت‌تایی تقسیم شدند: گروه اول ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی گرده گل زنبور عسل و گروه دوم ۱۰۰ گرم بر ۰/۵ میلی‌گرم نرمال سالین به صورت درون صفاقی به مدت یک روز دریافت کردند. سپس بیومارکرهای کبدی، کلیوی، پانکراتیک و بیومارکرهای استرس اکسیداتیو بررسی شد. علاوه بر این، بخشی از بافت‌های کبد، کلیه و پانکراس نیز از نظر هیستوپاتولوژیکی بررسی شد.

یافته‌ها آنزیم‌های نیتروژن اوره خون (P=۰/۰۲۱۲) و آسپارتات آمینوترانسفراز (P=۰/۰۳۴۴) و بیومارکر مالون‌دی‌آلدئید (P=۰/۰۱۸) بافت کلیه در گروه عصاره هیدروالکلی گرده گل زنبور عسل در مقایسه با گروه کنترل از لحاظ آماری کاهش و بیومارکر گلوتاتیون بافت کلیه در این گروه نسبت به گروه کنترل افزایش معنادار نشان داد (P=۰/۰۰۳۱) سایر پارامترهای مورد سنجش بین دو گروه معنادار نبود (P>۰/۰۵). از نظر هیستوپاتولوژیکی هیچ اثر مخرب و سمیتی در بافت‌ها مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری گرده گل زنبور عسل ویژگی‌های درمانی دارد و به عنوان یک ماده مغذی می‌تواند با افزایش محتوای گلوتاتیون و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی بدن برای انسان مفید و اثربخش باشد. این ماده در این پژوهش هیچ اثر سمیتی روی اندام‌های کبد، کلیه و پانکراس ایجاد نکرد و حتی توانست ارگان‌های حیاتی را در شرایط استرس اکسیداتیو حفاظت کند. هرچند برای رد کردن سمیت این ماده ارزشمند و اطمینان از ایمنی آن تحقیقات بیشتری ضروری است.

کلیدواژه‌ها:
گرده گل زنبور عسل، استرس اکسیداتیو، هیستوپاتولوژی، موش صحرایی

مقدمه

به کار بردن فراورده‌های مواد طبیعی در پیشگیری و درمان بیماری‌ها سابقه‌ای معادل طول عمر بشر دارد. با وجود پیشرفت‌های شگرف در تولید داروهای شیمیایی، نه‌تنها از اهمیت گیاهان دارویی کاسته نشده، بلکه به دلیل بهتر پذیرفته شدن توسط افراد بیمار، از دیدگاه اقتصادی به صرفه بودن، عوارض جانبی کمتر، امکان تولید آن‌ها در سطح وسیع در کشور و قابلیت بازیافت، کاربردهای آن‌ها افزایش یافته است. این گیاهان مضراتی، ازجمله خطر مصرف خودسرانه، پیچیدگی در استانداردسازی و-عدم درمان سریع بیماری نیز دارند [۱].

سازمان بهداشت جهانی[1] مهم‌ترین و بهترین منبع برای تولید انواع داروها را گیاهان دارویی می‌داند [۲] و طبق آمار، حدود ۸۰ درصد از جمعیت جهان از فرآورده‌های طبیعی استفاده می‌کنند [۳]. فرایندهای توسعه دارو طبق استانداردهایی که سازمان غذا و داروی آمریکا تعریف کرده است از پنج مرحله تشکیل شده که در تحقیقات پیش بالینی (مرحله دوم)، بررسی سمیت و اندازه‌گیری دُز درمانی روی حیوانات آزمایشگاهی انجام می‌پذیرد [۴].

1. World Health Organization (WHO)

* نویسنده مسئول:
دکتر مریم سله‌چه
نشانی: اهواز، دانشگاه علوم‌پزشکی جندی‌شاپور اهواز، پژوهشکده علوم پایه پزشکی، مرکز تحقیقات سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، گروه سم‌شناسی.
تلفن: ۶۰۷۵۳۳۷ (۹۱۶) ۹۸+
رایانامه: maryamsalehcheh@gmail.com

یکی از ترکیبات طبیعی که اثرات آن در دهه اخیر در زمینه طب سنتی بررسی شده، گرده گل زنبور عسل است [۵]. گرده گل، دانه‌های ریزی است که در قسمت انتهایی پرچم گل قرار دارد و تنها عامل برای بارور کردن گیاه است [۶]. زنبور عسل برای تأمین نیازهای پروتئینی و ویتامینی خود و نوزادانش، آن را به صورت ساچمه، روی پاهای عقب، درون کیسه‌های مخصوص، ذخیره کرده و به درون کندو می‌برد. در مناطقی که گرده گل به وفور یافت می‌شود، پرورش‌دهندگان با نصب تله گرده‌گیر جلوی راه پرواز زنبور، آن را جمع‌آوری و خشک می‌کنند [۷].

این گرده در واقع مجموعه‌ای از ذرات گرده گل‌ها است که با ترکیب شهد مکیده شده و بزاق زنبور عسل به هم پیوسته به صورت یک ماده یکنواخت در می‌آید. بر اساس تحقیقات انجام‌شده گرده گل زنبور عسل در تمام مراحل رشد زنبورها به عنوان یک ماده غذایی در کندو استفاده می‌شود [۸]. گرده گل زنبور عسل حاوی کربوهیدرات، فیبر، لیپید، آمینواسیدهای ضروری بدن و ترکیبات فلاونوئیدی مانند مایریستین است [۹]. این گرده به نوع گیاهی که توسط زنبور عسل از آن‌ها برداشته می‌شود، آب و هوا و نوع خاک منطقه بستگی دارد [۱۰، ۱۱].

محققین برای تعیین اثرات دارویی گرده روی بعضی از بیماری‌ها مطالعاتی انجام داده‌اند. به عنوان یک تقویت‌کننده عمومی برای درمان بعضی از بیماری‌ها در تعدادی از کلینیک‌ها و بیمارستان‌های اروپا و آسیای شرقی استفاده شده است [۱۲]. گرده گل در بهبود بیماری‌های عصبی نیز مؤثر بوده و مصرف حدود یک هفته از این ماده باعث افزایش امید به زندگی و بهبود علائم افسردگی در بیماران شده است [۱۳].

اثر ضدالتهاب گرده زنبور عسل به دلیل وجود فلاونوئید، فنولیکاسید، فیتواسترول و موادی همچون آنتول است [۱۴]. به نظر می‌رسد گرده گل زنبور عسل عمدتاً به علت فنولیک اسیدهایی همچون وانیلیک، پروتوکاتچیک، گالیک، پکوماریک اسید و فلاونوئیدهایی مانند هسپریدین، روتین، کامپفرول، آپیجنین، لوتئولین، کوئرستین و ایزورامنتین فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی دارد. این ترکیبات، ماده الکتروفیل را غیرفعال و رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن را پاکسازی می‌کنند [۱۵].

قابلیت حذف تورم ایجادشده از آسیب‌های قلبی-عروقی و کلیوی، حفاظت از کبد در برابر آسیب ناشی از تتراکلریدکربن و کاهش التهاب و بزرگی پروستات را ازجمله ویژگی‌های خاص این ماده برشمردند. اثر مثبت بر پروستات را همچنین به عمل آنتی‌آندروژن گرده زنبور عسل نسبت می‌دهند [۱۶].

یکی از استفاده‌های درمانی گرده گل زنبور عسل مهار فرایند لیپید پراکسیداسیون پس از استفاده از داروهای شیمی درمانی است. توهامی و همکاران به مطالعه اثر حفاظتی گرده گل در برابر سیس پلاتین پرداختند و دریافتند که با وجود آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو القاشده توسط سیس پلاتین در اندام‌های کبد، کلیه و بیضه و ایجاد آسیب بافتی در اندام‌های ذکرشده، گرده گل زنبور عسل با اثرات آنتی‌اکسیدانی این عوارض را به شدت کاهش می‌دهد [۱۷]. مصرف گرده یا عصاره‌های آن تأثیر آنتی‌اکسیدانی قوی‌ای دارد و از کبد و روده کوچک در برابر آسیب‌های ناشی از برخی سموم محافظت می‌کند [۱۸].

ساربک و همکاران اثر آنتی‌اکسیدانی هفت نوع ترکیب فنلی گرده‌های گل ایسلندی جمع‌آوری‌شده توسط زنبور عسل را بررسی کردند و نتایج نشان داد که قرص‌های حاوی گرده‌های گل باعث کاهش شاخص اسید تیوباربیتوریک و فعالیت آنزیم‌های اکسیدکننده در کبد و مغز موش شد [۱۹].

این ماده در مطالعات قبلی آثار فارماکولوژیک متعددی درخصوص بهبود حافظه، اثرات ضد اضطرابی، خواص ضدتشنجی و بهبود زخم معده در یک روز مصرف و با دُزهای متعدد داشته است؛ بنابراین در این مطالعه با نگاه به مطالعات گذشته [۲۲-۲۰]، دُز مؤثر انتخاب و انجام شده است. از طرفی به دلیل عدم وجود مطالعاتی درخصوص اثر سمیت گرده گل زنبور عسل بر سلامت یا ارگان‌های بدن، به نظر می‌رسد مطالعات سم‌شناسی روی گرده گل زنبور عسل ضروری و حائز اهمیت باشد. پس مقرر شد در این مطالعه بررسی ایمنی گرده گل زنبور عسل بر عملکرد، استرس اکسیداتیو و تغییرات هیستوپاتولوژی کبد، کلیه و پانکراس موش صحرایی انجام شود.

مواد و روش‌ها

روش عصاره‌گیری

در این مطالعه جهت عصاره‌گیری گرده گل زنبور عسل (از شرکت معتبر عسل باران باغرو در شهر اردبیل)، از روش خیساندن استفاده شد [۲۳].

مدل حیوانی

در این تحقیق از چهارده سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد اسپراگ داولی[2] در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم از خانه حیوانات دانشگاه علوم‌پزشکی جندی‌شاپور اهواز تهیه شد. حیوانات در اتاق حیوانات دانشکده داروسازی در قفس‌های استاندارد با سیکل نوری دوازده ساعت تاریکی و دوازده ساعت روشنایی و میزان دمای ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد و در رطوبت ۵۰ تا ۷۰ درصد نگهداری شدند. حیوانات در طول نگهداری و مطالعه از غذاهای فشرده مخصوص حیوان و آب لوله‌کشی شهر استفاده کردند. حیوانات قبل از جراحی با کتامین و زایلازین بیهوش شدند.-

2. Sprague-Dawley

چهارده سر موش صحرایی به صورت تصادفی در دو گروه هفت‌تایی تقسیم شدند که به شرح زیر است:

گروه اول: موش‌های دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی گرده گل زنبور عسل با دُز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی و به صورت تک دُز (گروه درمانی) [۲۳-۲۲].

گروه دوم: موش‌های دریافت‌کننده نرمال سالین با دُز ۱۰۰ گرم بر ۰/۵ میلی‌گرم به صورت درون صفاقی به صورت تک دُز (گروه کنترل).

یک روز بعد از تزریق عصاره، موش‌ها ابتدا وزن شده، سپس با تزریق درون صفاقی کتامین با دُز ۹۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زایلازین با دُز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیهوش شده و بلافاصله مستقیماً از قلب آن‌ها خون‌گیری انجام شد. نمونه‌های خونی حیوانات برای بررسی نیتروژن اوره خون[۳] و کراتینین آلفا[۴]، آمیلاز، آسپارتات آمینوتراسفراز[۵] و آلانین آمینوترانسفراز[۶] به آزمایشگاه منتقل شدند. بعد از آن، وزن ارگان‌های کبد، کلیه و پانکراس نیز ثبت شد و جهت بررسی آزمایشات بافت‌شناسی و هیستوپاتولوژی تکه‌ای از بافت‌های کبد، کلیه و پانکراس در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد و به آزمایشگاه منتقل شد و تکه‌ای از بافت‌های مذکور هم جهت اندازه‌گیری بیومارکرهای بافتی مالون‌دی‌آلدئید[۷] و گلوتاتیون[۸] احیا برداشته و تا هنگام آزمایش در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

محاسبه درصد ایندکس وزنی بافت

برای محاسبه درصد ایندکس وزنی بافت، وزن اولیه موش و وزن بافت‌های موش پس از آسان‌کشی اندازه‌گیری شد و از طریق فرمول زیر محاسبه شد:

درصد ایندکس وزنی بافت=(وزن بافت/وزن اولیه موش) ×۱۰۰

تست‌های سرمی

از نمونه سرم جهت انجام آزمایشات آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوتراسفراز، نیتروژن اوره خون، کراتینین و کراتینین آلفا (ساخت شرکت پارس آزمون ایران) با دستگاه اتوآنالایزر BT-3000 ساخت ایتالیا استفاده شد.

هموژن کردن بافت‌ها

بافت‌ها به نسبت ۱۰ درصد وزنی-حجمی با بافر فسفات (آماده خریداری‌شده از شرکت اید زیست) با دستگاه هموژنایزر، میکس و سپس در دور دوازده هزار به مدت سی دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول سوپرناتانت (محلول رویی ناشی از سانتریفیوژ) جهت تست‌های گلوتاتیون و مالون‌دی‌آلدئید جدا شد.

اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید

این بیومارکر به منظور سنجش استرس اکسیداتیو طبق روش گفته‌شده انجام شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سوپرناتانت، ۰/۵ میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک[۹] (از شرکت مرک آلمان) ۷۰ درصد اضافه شد و به مدت پانزده دقیقه در دور سه هزار سانتریفوژ شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی جدا شده و ۰/۵ میلی‌لیتر تیو باربیتوریک اسید[۱۰] (از شرکت مرک آلمان) ۰/۸ درصد به آن اضافه شد و به مدت سی دقیقه در بن‌ماری در حال جوش قرار داده شد و پس از آن به مدت ده دقیقه در آب سرد قرار داده شد. سپس در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر جذب آن قرائت شد و مقدار مالون‌دی‌آلدئید بافتی بر اساس میکرومول بر گرم بافت گزارش شد [۲۴].

اندازه‌گیری میزان گلوتاتیون احیا

محتوای گلوتاتیون بافتی توسط واکنش گلوتاتیون با معرف المن-[۱۱](از شرکت سیگمای آمریکا) و ایجاد رنگ زرد اندازه‌گیری شد [۲۵]. به‌طور خلاصه چهل میکرولیتر محلول سوپرناتانت به دو میلی‌لیتر بافر فسفات (از شرکت Bio-Idea) اضافه و مخلوط شد. سپس چهل میکرولیتر معرف المن اضافه شد و رنگ زرد ایجادشده در طول موج ۴۱۲ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل SPEKOL ۲۰۰۰ ساخت کشور کره قرائت و نتایج به صورت میمول بر گرم بافت گزارش شد [۲۴].

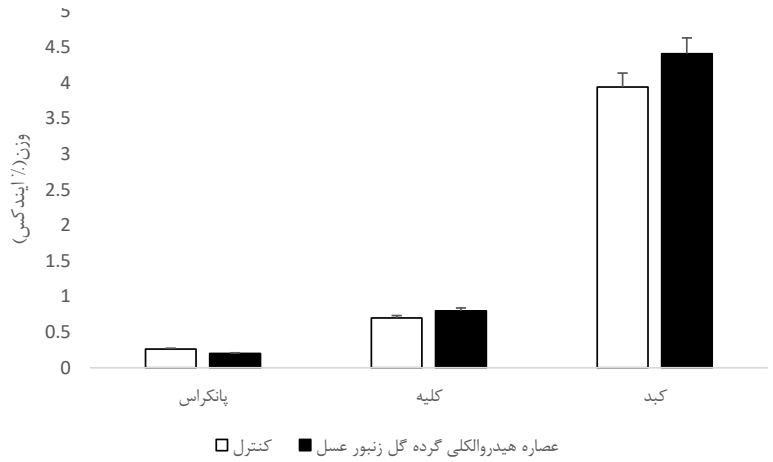
بررسی هیستوپاتولوژی

بعد از خون‌گیری ابتدا موش‌ها آسان‌کشی شده و سپس بافت‌های کبد، کلیه و پانکراس جدا شده و در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شدند. بعد از فیکس کردن با الکل، بخش‌ها دهیدراته و در پارافین پارافینه شدند. بلوک‌های پارافین با ضخامت µm6-4برش داده شدند و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین[۱۲] انجام و برای آنالیز با میکروسکوپ نوری آماده شدند [۲۶].

روش‌های آماری

آنالیز آماری با از نرم‌افزار SPSS-نسخه-۲۲انجام شد. برای هر گروه

3. Blood urea nitrogen (BUN)
4. Creatinine (Cr)
5. Aspartate Aminotransferase (AST)
6. Alanine Aminotransferase (ALT)
7. Malondialdehyde (MDA)
8. Glutathione (GSH)
9. Tricyclic antidepressants (TCAs)
10. Thiobarbituric acid (TBA)
11. Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid) (DTNB)
12. Hematoxylin And Eosin Stain (H&E)



مجله طب مکمل
دانشگاه علوم پزشکی اراک

تصویر ۱. درصد ایندکس وزنی بافت‌های (کبد، کلیه و پانکراس) در موش‌های صحرایی نر گروه دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی گرده گل زنبور عسل با تک دُز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی و گروه کنترل

از موش‌ها، میانگین سطح متغیر به صورت میانگین±انحراف معیار محاسبه و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون تی مستقل در محدوده P<۰/۰۵ استفاده شد. نمودارها با نرم‌افزار گراف‌پد Prism 8 XML -Projectو میکروسافت اکسل ۲۰۱۶ ترسیم شد.

یافته‌ها

نتایج وزن

درصد ایندکس وزنی بافت‌های کبد، کلیه و پانکراس محاسبه شده و مشاهده شد اختلاف معناداری بین گروه دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی گرده گل زنبور عسل و گروه کنترل از لحاظ وزنی وجود ندارد (تصویر شماره ۱).

بیومارکرهای سرمی و بافتی

کبد:

میزان آلانین آمینوترانسفراز سرم در گروه دریافت‌کننده عصاره نسبت به گروه کنترل کاهش داشت، اما این کاهش از نظر آماری معنادار نبود. (تصویر شماره ۲-الف).

اما میزان آسپارتات آمینوتراسفراز سرم در گروه دریافت‌کننده عصاره نسبت به گروه کنترل کاهش داشت که این کاهش از نظر آماری نیز معنادار بود (تصویر شماره ۲-ب).

بیومارکرهای بافتی در کبد شامل مالون‌دی‌آلدئید و گلوتاتیون-(تصویر شماره ۲-ج و ۲-د) در گروه کنترل و گروه دریافت‌کننده عصاره با تک دُز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت درون‌صفاقی بررسی و مشخص شد که بین دو گروه از نظر آماری اختلاف معناداری وجود ندارد (تصویر شماره ۲).

کلیه

سطح سرمی نیتروژن اوره خون در گروه دریافت‌کننده عصاره نسبت به گروه کنترل کاهش یافت که این تغییر از نظر آماری معنادار بود (P<۰/۰۵) (تصویر شماره ۳-الف).

میزان کراتین سرم در گروه دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی گرده گل زنبور عسل نسبت به گروه کنترل افزایش داشت، اما این افزایش ازنظر آماری معنادار نبود (تصویر شماره ۳-ب).

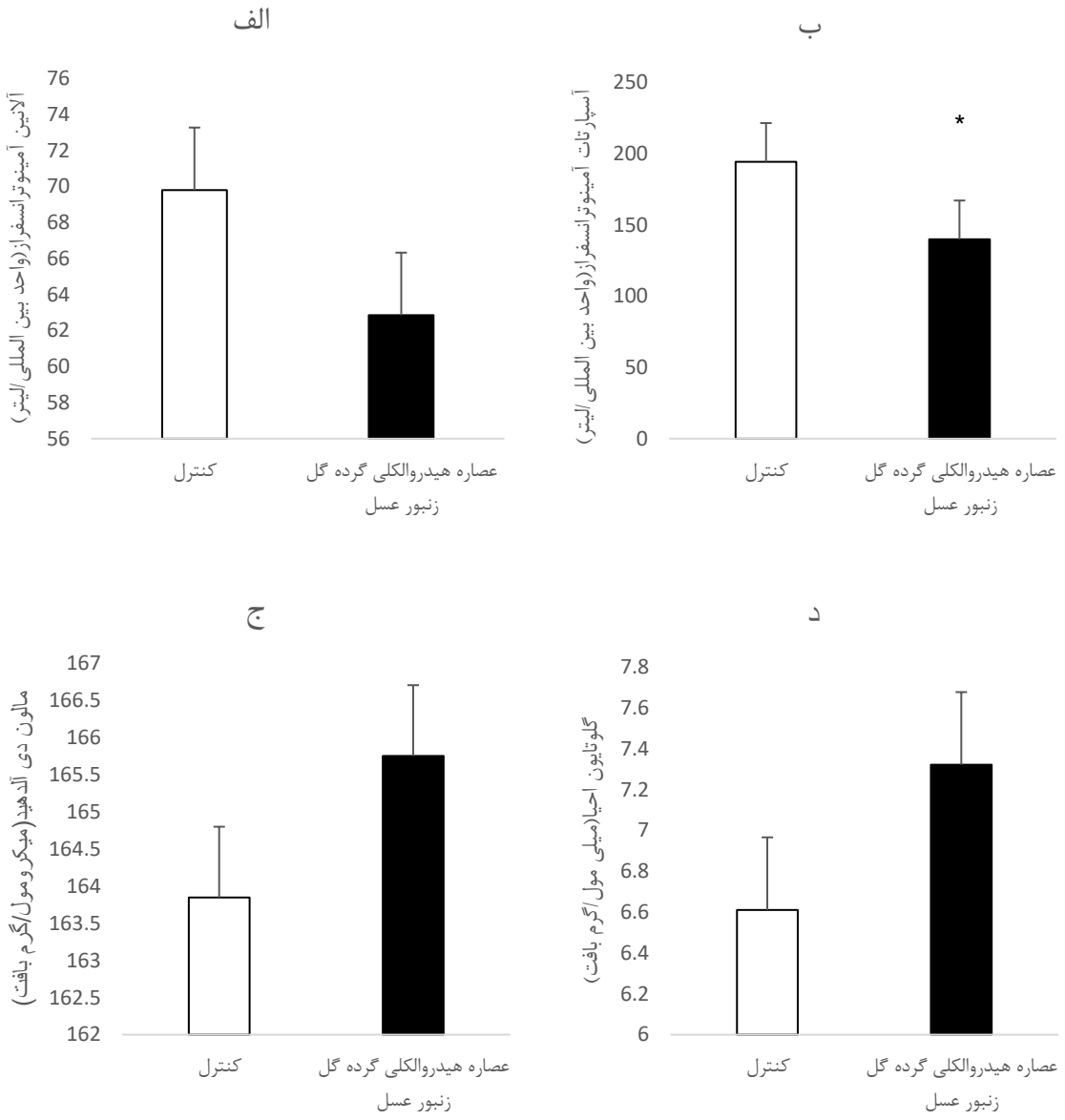
بیومارکر بافتی مالون‌دی‌آلدئید کلیه در گروه دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی گرده گل زنبورعسل با تک دُز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم-نسبت به گروه کنترل کاهش داشت و این کاهش بین دو گروه از نظر آماری معناداری بود (P<۰/۰۵) (تصویر شماره ۳- ج).

بیومارکر بافتی گلوتاتیون (تصویر شماره ۳-د) کلیه در گروه دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی گرده گل زنبورعسل با تک دُز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل با افزایش معناداری همراه بود (P<۰/۰۵) (تصویر شماره ۳-د).

پانکراس

سطح سرمی آلفا آمیلاز در گروه دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی گرده گل زنبور عسل با تک دُز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معناداری نداشت (P>۰/۰۵) (تصویر شماره ۴-الف).

همچنین سطح بیومارکرهای بافتی شامل گلوتاتیون (تصویر شماره ۴-ج) و مالون‌دی‌آلدئید (تصویر شماره ۴-ب) در گروه کنترل و گروه دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی گرده گل زنبور



تصویر ۲. بررسی بیومارکرهای آلانین آمینوترانسفراز سرم تصویر (الف) و آسپارتات آمینوتراسفراز سرم تصویر (ب)، مالون‌دی‌آلدئید نمودار (ج) و گلوتاتیون تصویر (د) بافت کبد در گروه کنترل و گروه دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی گرده گل زنبور عسل با دُز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی به صورت تک دُز و بعد از ۴۲ ساعت.

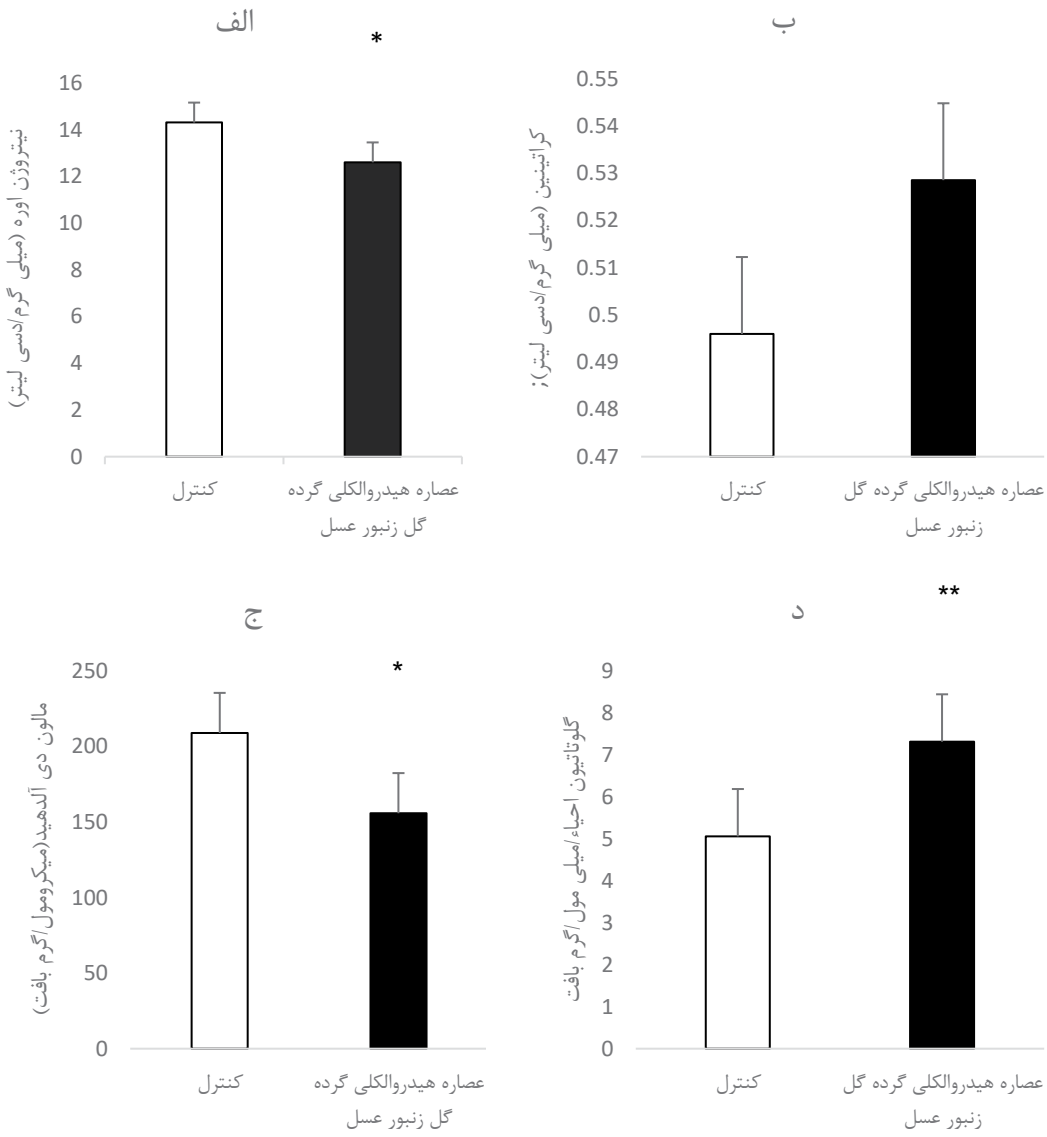
***تفاوت معنادار با گروه کنترل در حد P<۰/۰۵**

عسل با تک دُز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی و پس از ۲۴ ساعت بررسی و مشخص شد که بین دو گروه از نظر آماری در تست‌های مالون‌دی‌آلدئید و گلوتاتیون اختلاف معناداری وجود ندارد (P>۰/۰۵) (تصویر شماره ۴-الف).

هیستوپاتولوژی

در مطالعات هیستوپاتولوژی بافت‌ها مشخص شد که بین گروه کنترل و گروه دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی گرده گل زنبور عسل در تمام بافت‌های کبد، کلیه و پانکراس تفاوت آن‌چنانی وجود ندارد و عملاً همه بافت‌ها سالم و هیچ‌گونه آسیبی ناشی از عصاره مشاهده نشد (تصویر شماره ۵). در نمونه‌های بافتی تهیه‌شده، احتقان گلبول‌های قرمز، ارتشاح سلول‌های التهابی و پیکنوز هسته‌ای[13] به عنوان شاخص‌های آسیب بافتی ارزیابی شد و تفاوت معناداری بین گروه‌های کنترل و گروه دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی گرده گل زنبور عسل مشاهده نشد.

13. Nuclear Pyknosis



مجله طب مکمل
دانشگاه علوم پزشکی اراک

تصویر ۳. بررسی نیتروژن اوره خون سرم تصویر (الف)، کراتین سرم تصویر (ب)، بیومارکرهای مالون‌دی‌آلدئید تصویر (ج) و گلوتاتیون تصویر (د) بافت کلیه در دو گروه کنترل و گروه دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی گرده گل زنبور عسل با دُز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی به صورت تک دُز و بعد از ۴۲ ساعت.

*تفاوت معنادار با گروه کنترل در حد P<۰/۰۵

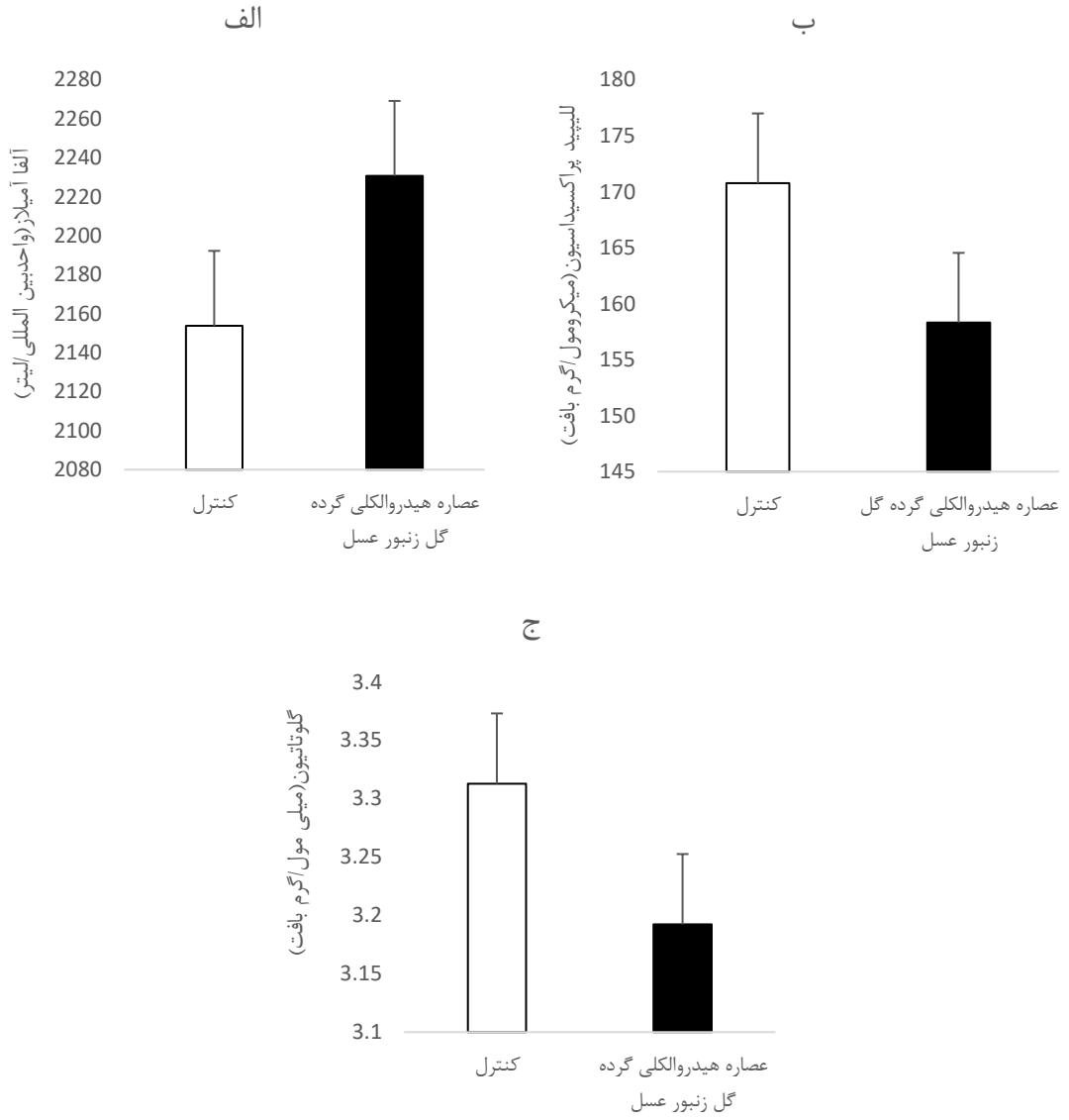
**تفاوت معنادار با گروه کنترل در حد P<۰/۰۱

بحث

قبل از استفاده دارویی از گیاهان، می‌بایست از سلامت آن‌ها اطمینان کسب کرد. یک راه کلیدی اطمینان از سلامت داروها انجام تست‌های سمیت در مدل حیوانی مناسب است [۱].

در این مطالعه، مرگ‌ومیر و تغییری در رفتار تغذیه‌ای بین موش‌های هر دو گروه کنترل و دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی گرده گل زنبور عسل مشاهده نشد. درصد ایندکس وزنی بافت‌های جداشده در پایان مطالعه نیز بیانگر عدم تغییر معناداری بین بافت‌های دو گروه کنترل و عصاره بود. در این مطالعه، وزن ارگان‌های داخلی به صورت درصد ایندکس وزنی بافت، ارزیابی شد و نتایج بیانگر عدم سمیت گرده گل روی بافت‌های مورد مطالعه بود.

در این مطالعه، بیومارکرهای کلیوی (کراتین و نیتروژن اوره خون) بررسی شد. اندازه‌گیری و بررسی آنزیم نیتروژن اوره خون در گروه دریافت‌کننده عصاره در مقایسه با گروه کنترل به صورت



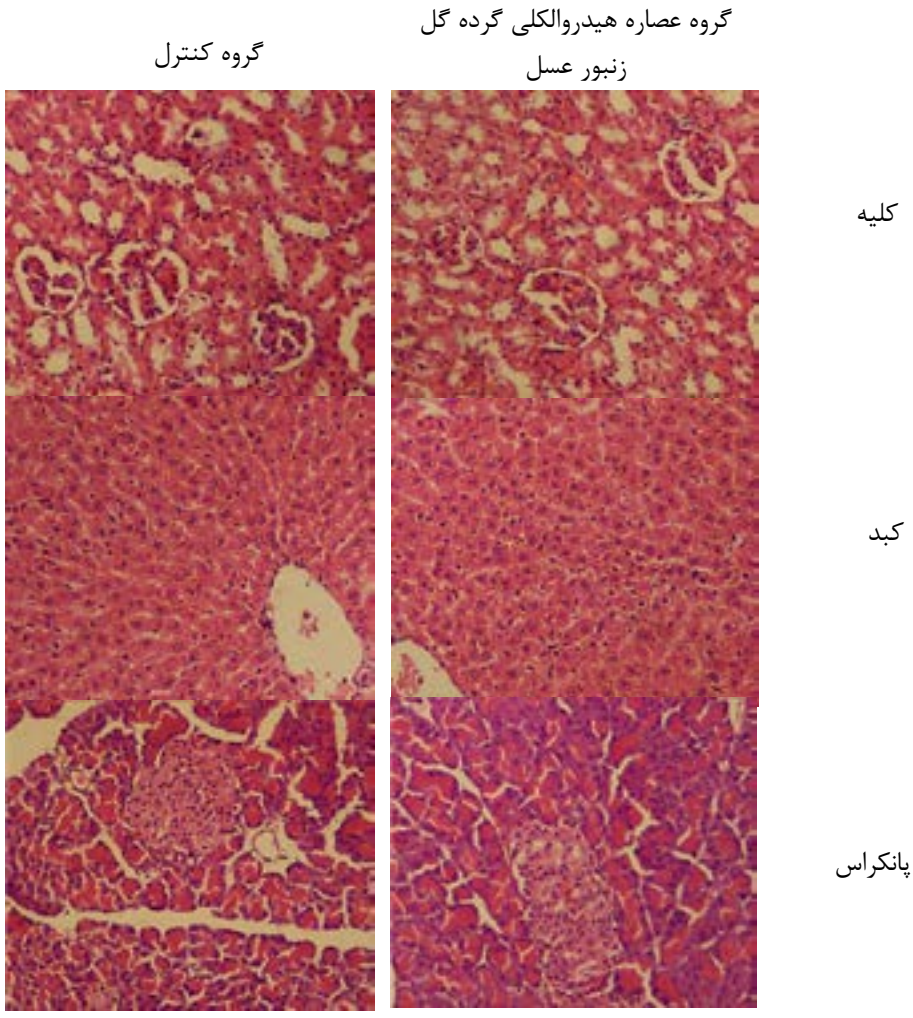
تصویر ۴. بررسی بیومارکرهای آلفا آمیلاز سرم تصویر (الف) و مالون‌دی‌آلدئید تصویر (ب)، گلوتاتیون تصویر (ج) بافت پانکراس در دو گروه کنترل و گروه دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی گرده گل زنبور عسل با دُز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی و تک دُز و بعد از ۴۲ ساعت

معناداری کاهش یافت، ولی آنزیم کراتین هیچ تغییر معناداری در آن مشاهده نشد. در مطالعه‌ای که توسط هوآنگ و همکاران صورت گرفت نیز به بررسی اثر محافظتی گرده گل در برابر اثرات توکسیک سیس پلاتین پرداخته شد و مشاهده شد که گرده باعث کاهش معنادار سطح سرمی نیتروژن اوره خون در مقایسه با گروه کنترل می‌شود که حاکی از نقش محافظتی و آنتی‌اکسیدانی گرده گل است [۲۷].

در شرایط استرس اکسیداتیو، رادیکال‌های آزاد تولیدشده بیش از مقدار آنتی‌اکسیدان‌های موجود در بدن است که توسط انواع آنتی‌اکسیدان‌ها مانند گلوتاتیون تا حدودی مهار می‌شود. رادیکال‌های آزاد در بدن باعث لیپید پراکسیداسیون، آسیب دی‌ان‌ای، اکسیداسیون پروتئین و تخریب فسفولیپیدها در غشای سلولی می‌شوند. محصول نهایی لیپید پراکسیداسیون مالون‌دی‌آلدئید است که می‌تواند مقیاس خوبی برای محاسبه سرعت لیپید پراکسیداسیون باشد [۲۸].

میزان مالون‌دی‌آلدئید بافت کلیه اندازه‌گیری و مشاهده شد که میزان مالون‌دی‌آلدئید بافت کلیه در گروه دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی گرده گل زنبور عسل نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشته و میزان گلوتاتیون[۱۴] بافتی که یک عامل

14. Glutathione (GSH)



مجله طب مکمل
دانشگاه علوم پزشکی اراک

تصویر ۵. هیستولوژی بافت‌های کبد، کلیه و پانکراس در گروه تیمارشده با عصاره هیدروالکلی گرده گل زنبور عسل با دُز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی تک دُز بعد از ۴۲ ساعت و گروه کنترل با بزرگ‌نمایی ۰۵۲ × (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین)

آنتی‌اکسیدانی است، در بافت کلیه در گروه دریافت‌کننده عصاره- نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است.

در این راستا، اراسلان و همکاران بررسی شد که در آن مطالعه به بررسی نقش گرده گل روی ماده مخرب و سمی پروپکسور[15] پرداختند و مشاهده شد که گرده گل سبب کاهش آسیب بافت کلیوی ناشی از مواجهه با این سم می‌شود و همچنین باعث- کاهش میزان مالون‌دی‌آلدئید و افزایش سطح گلوتاتیون این بافت به علت نقش آنتی‌اکسیدانی گرده گل می‌شود [۲۹]. در مطالعه دیگری توسط این محقق و همکارانش که به بررسی اثرات بهبوددهنده و محافظتی گرده گل روی ماده سمی کاربارایل[16] پرداختند و به نتایج مشابهی در این زمینه دست یافتند [۳۰].

آنا ساریک همکاران، ام. لِجا همکاران در مطالعاتی جداگانه اثرات و ویژگی‌های گرده گل زنبور عسل در موش سفید کوچک را بررسی کرده و به این نتیجه رسیدند که همه گونه‌های گرده گل دارای مقدار قابل توجهی ترکیباتی فنولی و ویتامین C (آسکوربات) با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که می‌تواند تأثیر بسزایی در محافظت و سلامت ارگان‌های مختلف داشته باشد [۱۹، ۳۱].

در این مطالعه، بیومارکرهای کبدی (آسپارتات آمینوتراسفراز و آلانین آمینوترانسفراز) سنجیده شد و میزان آنزیم آلانین آمینوترانسفراز از لحاظ آماری در دو گروه مطالعه اختلاف معناداری نداشت، ولی آنزیم آسپارتات آمینوتراسفراز در گروه عصاره به صورت معناداری (P<۰/۰۵) کاهش یافته بود.

15. Propoxur
16. Carbaryl

ترانس آمینازها (آسپارتات آمینوتراسفراز و آلانین آمینوترانسفراز)، آنزیم‌های شناخته‌شده‌ای هستند که به عنوان بیومارکرهای پیش‌بینی احتمالی سمیت کبدی استفاده می‌شوند. به طور کلی آسیب به سلول‌های پارانشیمال کبدی منجر به بالا رفتن این ترانس آمینازها می‌شود [۳۲]. مطالعه حاضر نشان می‌دهد که مصرف عصاره هیدروالکلی گرده گل زنبور عسل با دُز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت یک روز، نه‌تنها اثر مخربی روی هپاتوسیت‌های کبدی نداشته، بلکه با کاهش آسپارتات آمینوتراسفراز می‌تواند در درمان مشکلات کبدی نقش مؤثری داشته باشد و بررسی مطالعات گذشته نیز آثار محافظتی و عدم سمیت کبدی این ماده را تأیید می‌کند [۲۰].

در بررسی‌های مختلف آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره هیدروالکلی گرده گل زنبور عسل را به عنوان ماده مؤثر در فعالیت محافظتی کبد معرفی کرده‌اند [۲۹، ۲۷].

بیومارکرهای بافتی کبد (مالون‌دی‌آلدئید و گلوتاتیون) در گروه کنترل و گروه دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی گرده گل بررسی و مشخص شد که بین دو گروه از نظر آماری اختلاف معناداری وجود ندارد. در همین راستا، آل دایهان و همکاران نیز نشان دادند که گرده گل زنبور عسل می‌تواند در مقابل سدیم فلوراید با اثر هپاتونفروتوکسیسیتی نقش حفاظتی از خود نشان دهد [۳۳].

در بیومارکر پانکراس (آلفا آمیلاز) و بیومارکرهای بافتی (مالون‌دی‌آلدئید و گلوتاتیون) آن بین دو گروه عصاره و گروه کنترل از نظر آماری اختلاف معناداری مشاهده نشد که این حاکی از عدم نقش مضر و آسیب‌زننده این ماده به بافت پانکراس است.

بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی بافت‌های کبد، کلیه و پانکراس در این مطالعه نیز نشان می‌دهد که تفاوت معناداری بین بافت‌های بررسی‌شده در گروه دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی گرده گل زنبور عسل و گروه کنترل وجود ندارد و اثرات سمی در بافت‌های مورد بررسی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری

در کشور ما این ماده باارزش جایگاه خود را در صنایع دارویی و غذایی به‌طور کامل به دست نیاورده است؛ بنابراین لازم است با بررسی ویژگی‌ها، کاربرد و قابلیت‌های آن‌ها به عنوان یک افزودنی طبیعی و سلامت‌بخش و جلوگیری‌کننده از بسیاری از بیماری‌ها، توجه بسیاری از متخصصان در صنایع داروسازی، غذایی و زنبورداری به این ماده ارزشمند معطوف شود.

گرده گل زنبور عسل خواص درمانی بسیاری دارد و می‌تواند به عنوان یک ماده مغذی و درمانی برای انسان استفاده شود. با اینکه مطالعات انسانی در این زمینه بسیار محدود است، اما نتایج امیدوارکننده‌ای در مطالعات حیوانی مشاهده شده است. به هر حال، پیش از استفاده درمانی از این محصول طبیعی زنبور عسل، بررسی‌های سمیت و اثبات ایمنی آن امری ضروری است.

با توجه به نتایج حاصل از بررسی بیومارکرهای بافتی (مالون‌دی‌آلدئید و گلوتاتیون) و مارکرهای سرمی مرتبط با بافت‌های بررسی‌شده (نیتروژن اوره خون، کراتینین، آلفا آمیلاز آسپارتات آمینوتراسفراز و آلانین آمینوترانسفراز) و مطالعات هیستوپاتولوژی، تزریق درون‌صفاقی با دُز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت تک دُز گرده گل زنبور عسل پس از ۲۴ ساعت، نه‌تنها اثر سمیتی روی اندام‌های کبد، کلیه و پانکراس موش‌های صحرایی ایجاد نکرد، بلکه در مواردی توانست باعث حفاظت در بافت مورد نظر شود.

با اینکه نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه گامی در جهت رد سمیت گرده گل در دُزهای مؤثر درمانی روی کبد، کلیه و پانکراس موش‌های صحرایی بود، اما تحقیقات بیشتری برای اثبات ایمنی این ماده ارزشمند نیاز است و جهت اطمینان از اثرات سودمند گرده گل، نیاز به مطالعات گسترده و طبق قوانین و ضوابط موجود روی مدل انسانی است. از طرف دیگر، با به‌کارگیری این مواد زیست فعال باارزش، گامی به سوی حفظ سلامت جامعه و جلوگیری از بسیاری از بیماری‌ها برداشته شود.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه نتیجه پایان‌نامه دکترای حرفه‌ای داروسازی محمد جواد باقری است. هزینه این پایان‌نامه از محل اعتبار طرح تحقیقاتی مصوب شماره B-97055 دانشگاه علوم‌پزشکی جندی‌شاپور اهواز و با کد اخلاق IRAJUMS.ABHC.REC.1397.049 پرداخت شده است.

حامی مالی

هزینه‌های این مطالعه از محل اعتبار طرح تحقیقاتی مصوب شماره B-97055 دانشگاه علوم‌پزشکی جندی‌شاپور اهواز تأمین شده است.

مشارکت نویسندگان

کار با حیوان و رعایت اخلاق در کار با حیوان و نظارت: ندا سیستانی؛ انجام کارهای آزمایشگاهی: محمدجواد باقری؛ تست‌های پاتولوژی: لعیاسادات خرسندی؛ کار با دستگاه‌های آزمایشگاه: زینب دهقان محمدی؛ طراحی مطالعه، نظارت بر پروژه، آنالیز داده‌ها و نوشتن درفت اولیه مقاله: مریم سله چه.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

References

[1] Baradaran A. Administration of herbal drugs in geriatric individuals; trends on its helps and hazards. Geriatrics Persia. 2017; 1(1):e01.

[2] Yadav R, Agarwala M. Phytochemical analysis of some medicinal plants. Journal of Phytology. 2011; 3(12):10-4. https://updatepublishing.com/journal/index.php/jp/article/view/2737

[3] Maiti B, Nagori B, Singh R. Recent trends in herbal drugs: A review. International Journal of Drug Research and Technology. 2011; 1(1):17-25. https://www.ijdrt.com/articles/recent-trends-in-herbal-drugsa-review.pdf

[4] Disch L, Drewe J,Fricker G. Dissolution Testing of herbal medicines: Challenges and regulatory standards in Europe, the United States, Canada, and Asia. Dissolution Technologies. 2017; 24(2):6-12. [DOI:10.14227/DT240217P6]

[5] Muntha P. Drug discovery & development-A review. Research and Reviews: Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2016; 5(1):135-42. https://www.rroij.com/open-access/drug-discovery--development--a-review-.php?aid=78654

[6] Pascoal A, Rodriguse S, Teixeira A, Fea's X, Estevinho LM. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. Food and Chemical Toxicology. 2014; 63:233-9 [DOI:10.1016/j.fct.2013.11.010] [PMID]

[7] Medeiros KC, Figueiredo CA, Figueredo TB, Freire KR, Santos FA, Alcantara-Neves NM, et al. Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice. Journal of Ethnopharmacology. 2008; 119(1):41-6. [DOI:10.1016/j.jep.2008.05.036] [PMID]

[8] Abdella EM, Tohamy A, Ahmad RR. Antimutagenic activity of Egyptian propolis and bee pollen water extracts against cisplatin-induced chromosomal abnormalities in bone marrow cells of mice. Iranian Journal of Cancer Prevention. 2009; 2(4):175-81. https://www.sid.ir/en/Journal/ViewPaper.aspx?ID=167583

[9] Fatrcová-Šramková K, Nôžková J, Kačániová M, Máriássyová M, Rovná K, Stričík M. Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. Journal of Environmental Science and Health. 2013; 48(2):133-8.-[PMID]

[10] Morais M, Moreira L, Feás X, Estevinho LM. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. Food and Chemical Toxicology. 2011; 49(5):1096-101. [DOI:10.1016/j.fct.2011.01.020] [PMID]

[11] Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Alvarez JA.. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. Journal of Food Science. 2008; 73(9):R117-24. [DOI:10.1111/j.1750-3841.2008.00966.x] [PMID]

[12] Almedia-Muradian LB, Pamplona LC, Coimbra S, Barth OM. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee plellets. Journal of food composition and analysis. 2005; 18(1):105-11. [DOI:10.1016/j.jfca.2003.10.008]

[13] Silva BM, Andrade PB, Valentão P, Ferreres F, Seabra RM, Ferreira MA.-Quince (Cydoniaoblonga Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: Antioxidant activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004; 52(15):4705-12. [DOI:10.1021/jf040057v] [PMID]

[14] Choi EM. Antinociceptive and antiinflammatory activities of pine (Pinus densiflora) pollen extract. Phytotherapy Research. 2007; 21(5):471-5. [DOI:10.1002/ptr.2103] [PMID]

[15] Komosinska-Vassev K, Olczyk P, Kaźmierczak J, Mencner L, Olczyk K. Bee pollen: Chemical composition and therapeutic application. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM. 2015; 2015:297425. [PMID]

[16] Rzepecka-Stojko A, Pilawa B, Ramos P, Stojko J. Antioxidativeproperties of bee pollen extracts examined by EPR spectroscopy. Journal of Apicultural Science. 2012; 56(1):23-31. [DOI:10.2478/v10289-012-0003-0]

[17] Tohamy AA, Abdella EM, Ahmed RR, Ahmed YK. Assessment of antimutagenic, anti-histopathologic and antioxidant capacities of Egyptian bee pollen and propolis extracts. Cytotechnology. 2014; 66(2):283-97. [DOI:10.1007/s10616-013-9568-0] [PMID] [PMCID]

[18] Mohdaly AA, Mahmoud AA, Roby MH, Smetanska I, Ramadan MF. Phenolic extract from propolis and bee pollen: Composition, antioxidant and antibacterial activities. Journal of Food Biochemistry. 2015; 39(5):538-47. [DOI:10.1111/jfbc.12160]

[19] Sarić A, Balog T, Sobocanec S, Kusić B, Sverko V, Rusak G, et al. Antioxidant effects of flavonoid from Croatian Cystus incanus L. rich bee pollen. Food and Chemical Toxicology. 2009; 47(3):547-54. [DOI:10.1016/j.fct.2008.12.007] [PMID]

[20] Sistani Karampour N, Hemati AA, Malmir R. Effect of bee pollen hydro-alcoholic extract on nicotine induced anxiety in mice. National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology. 2016; 7(3):301-5. [DOI:10.5455/njppp.2017.7.0617914112016]

[21] Hemati AA, Arzi A, Sistani Karampour N, Akbari B. Study of the effect of ocimum basilicum Hydro-Alcoholic extract on induced by nicotine in mice. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2015; 6(5):805-13. https://www.rjpbcs.com/pdf/2015_6(5)/[112].pdf

[22] Sistani Karampour N, AA Hemmati, Ardeshir Malmir A. The anxiolytic effect of bee pollen hydroalcoholic extract in mice. National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology. 2017; 7(3):301-5. https://www.bibliomed.org/mnsfulltext/28/28-1467239128.pdf?1652613220

[23] Yıldız O, Can Z, Saral O, Yuluğ E, Oztürk F, Aliyazıcıoğlu R, at al. Hepatoprotective potential of chestnut bee pollen on carbon tetrachloride-induced hepatic damages in rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013; 2013:461478. [DOI:10.1155/2013/461478] [PMID] [PMCID]

[24] Ahangarpour A, Zeidooni L, Samimi A, Alboghobeish S, Khorsandi LS, Moradi M. Chronic exposure to arsenic and high fat diet additively induced cardiotoxicity in male mice. Research in Pharmaceutical Sciences. 2018; 13(1):47-56. [DOI:10.4103/1735-5362.220967] [PMID] [PMCID]

[25] Sadegh C, Schreck RP. The spectroscopic determination of aqueous sulfite using Ellman's reagent. MURJ. 2003; 8:39-43. https://www.researchgate.net/profile/Cameron-Sadegh/publication/267683433_The_Spectroscopic_Determination_of_Aqueous_Sulfite_Using_Ellman%27s_Reagent/links/548a1ad10cf214269f1ac253/The-Spectroscopic-Determination-of-Aqueous-Sulfite-Using-Ellmans-Reagent.pdf

[26] Mirhoseini M, Talebpour Amiri F, Karimpour Malekshah AA, Rezanejad Gatabi Z, Ghaffari E. Protective effects of melatonin on testis histology following acute torsion-detorsion in rats. International Journal of Reproductive Biomedicine. 2017; 15(3):141-6. [DOI:10.29252/ijrm.15.3.141] [PMID] [PMCID]

[27] Huang H, Shen Z, Geng Q, Wu Z, Shi P, Miao X. Protective effect of Schisandra chinensis bee pollen extract on liver and kidney injury induced by cisplatin in rats. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017; 95:1765-76. [DOI:10.1016/j.biopha.2017.09.083] [PMID]

[28] Ramadhani MR, Bachri MS, Widyaningsih W. Effects of ethanolic extract of arrowroot tubers (Maranta arundinacea L.) on the level of MDA, SGPT and SGOT in ethanol induced rats. Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia. 2017; 8(1):10-8. [DOI:10.20885/JKKI.Vol8.Iss1.art3]

[29] Eraslan G, Kanbur M, Silici S, Cem Liman B, Altinordulu S, Soyer Sarica Z. Evaluation of protective effect of bee pollen against propoxur toxicity in rat. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2009; 72(3):931-7. [DOI:10.1016/j.ecoenv.2008.06.008] [PMID]

[30] Eraslan G, Kanbur M, Silici S. Effect of carbaryl on some biochemical changes in rats: The ameliorative effect of bee pollen. Food and Chemical Toxicology. 2009; 47(1):86-91. [DOI:10.1016/j.fct.2008.10.013] [PMID]

[31] Leja M, Mareczek A, Wyżgolik G, Klepacz-Baniak J, Czekońska K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. Food chemistry. 2007; 100(1):237-40. [DOI:10.1016/j.foodchem.2005.09.047]

[32] Arjariya S, Nema N, Tiwari S. Investigate the toxicological effect on aqueous extract of terminalia Catappa linn. in rat. International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences. 2013; 2(5):596-601. https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.392.2544&rep=rep1&type=pdf

[33] Al-Daihan S, Bhat RS. Protective effect of bee pollen against sodium fluoride-induced hepatonephrotoxicity and serum electrolyte changes in rats. Fluoride. 2019 ; 52(1):9-17. https://www.fluorideresearch.org/521/files/FJ2019_v52_n1_p009-017_sfs.pdf