

## Evaluation of Anti Hypoxic Activities of Pomegranate (*Punica Granatum*) Seeds and Peels in Mice

Farideh Kamalifar<sup>1</sup>,  
 Mohammad Hossein Hosseinzadeh<sup>2</sup>,  
 Mohammad Eghbali<sup>2</sup>,  
 Mohammad Ali Ebrahimzadeh<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Medical Student, Ramsar Campus, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, Iran

<sup>2</sup> PharmD, Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>3</sup> Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received November 5, 2023 ; Accepted February 24, 2024)

### Abstract

**Background and purpose:** Hypoxia, a decrease in available oxygen reaching the tissues, may cause a variety of physiological abnormalities. It is linked to the pathology of stroke, cardiovascular disease, and acute mountain sickness. Hypoxia occurs especially in heart diseases, ischemia, and heart attack, and finally causing death. Hypoxia causes oxidative stress involving the production of reactive oxygen species (ROS). Compounds with antioxidant activity can scavenge ROS and can exhibit anti-hypoxic properties. Pomegranate (*Punica granatum*) is a well-known fruit with very good anti-ischemic and antioxidant activities. Little is known about the protective effects of pomegranate against hypoxia-induced lethality. Several medicinal plants have accepted anti-hypoxic activities. In the present study, the protective effect of this fruit against hypoxia-induced lethality in mice was determined by three different experimental models.

**Materials and methods:** Protective effects of methanolic extract of Pomegranate's seed and peel against hypoxia-induced lethality in mice were evaluated by three experimental models of hypoxia, i.e. asphyctic, haemic, and circulatory models. The latencies for death for mice were recorded. All the experimental procedures were conducted by the NIH guidelines of the Laboratory Animal Care and Use. The Institutional Animal Ethical Committee of Mazandaran University of Medical Sciences also approved the experimental protocol. In the asphyctic hypoxic model, phenytoin (50 mg/kg, i.p.) and in the next two tests, propranolol (20 and 30 mg/kg, i.p.) were used as the positive control. In all tests, Normal saline (0.5 ml, i.p.) was used as the negative control. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed followed by the Newman-Keuls multiple comparisons test was used to determine the differences in means. All p values less than 5% were considered as significant.

**Results:** Extracts showed good anti-hypoxic activities in some tested models in mice. In the hemic model, Peel extract at 250 mg/kg significantly prolonged mice survival time for about 4.8 minutes ( $P < 0.001$ ). At this dose, it showed the same activity of propranolol 20 mg/kg which was used as positive control. In the circulatory antihypoxic model, peel extract at 250 mg/kg, significantly increased the survival time by about 5.4 minutes ( $P < 0.0001$ ). At this dose, the extract showed the same activity as propranolol 30 mg/kg ( $P > 0.05$ ). In the asphyctic anti hypoxic model, seed extract at 250 mg/kg prolonged the survival time for 2.4 minutes in the control group. But this increase was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). Peel extract at 62.5 mg/kg prolonged the survival time for 4.2 minutes in the control group, but this increase was also not statistically significant ( $P > 0.05$ ). Peel extract showed good activity in an asphyctic model where at 125 mg/kg. It increased the survival time of mice about 2 times ( $P < 0.0001$ ). At this dose, extract showed higher activity than phenytoin 50 mg/kg. The survival time for the group that received phenytoin was  $29.60 \pm 2.51$  minutes which was statistically significant than that of the control group ( $P < 0.001$ ).

**Conclusion:** Extracts showed very good protective effects against hypoxia in some tested models. In particular, the effects in the asphyctic model of hypoxia were high. Peel extract was stronger than seed extract. Phenolic compounds may be responsible for the anti-hypoxic activities of these extracts.

**Keywords:** hypoxia, asphyctic hypoxia; circulatory hypoxia; haemic hypoxia; Pomegranate, *Punica granatum*.

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 33 (230): 138-145 (Persian).

**Corresponding Author:** Mohammad Ali Ebrahimzadeh - Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: azamnahvi.pedodontist@gmail.com)

## ارزیابی فعالیت آنتی‌هیپوکسی دانه و پوست انار در موش سوری

فریده کمالی فر<sup>۱</sup>محمد حسین حسین زاده<sup>۲</sup>محمد اقبالی<sup>۲</sup>محمد علی ابراهیم زاده<sup>۳</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** هیپوکسی، کاهش اکسیژن موجود در بافت‌های بدن، می‌تواند باعث ناهنجاری‌های فیزیولوژیکی متعدد شود. هیپوکسی با پاتولوژی سکنه مغزی، بیماری قلبی عروقی و بیماری کوه‌گرفتگی مرتبط است. هیپوکسی به خصوص در حملات قلبی و ایسکمی رخ داده و در نهایت به مرگ منجر می‌شود. هیپوکسی موجب استرس اکسیدتیو و تولید ذرات فعال اکسیژن می‌گردد. ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌توانند این ذرات را حذف کرده و فعالیت آنتی‌هیپوکسی نشان دهند. انار میوه مشهوری است که فعالیت آنتی‌ایسکمی و آنتی‌اکسیدانی بسیار خوبی دارد. تا امروز اطلاعات کمی در خصوص اثرات محافظتی انار در برابر کشندگی ناشی از هیپوکسی وجود دارد. برخی از گیاهان دارویی، اثرات پذیرفته شده‌ای در هیپوکسی دارند. این مطالعه با هدف تعیین اثر محافظتی میوه انار در مقابل مرگ و میر ناشی از هیپوکسی در موش سوری با سه مدل تجربی مختلف، انجام پذیرفت.

**مواد و روش‌ها:** اثر محافظتی عصاره متانلی دانه و پوست میوه‌ی انار در مقابل مرگ و میر ناشی از هیپوکسی در موش سوری با سه مدل هیپوکسی خفگی، خونی و جریان خونی بررسی شد. زمان زنده ماندن موش‌ها اندازه‌گیری شد. تمام مراحل آزمایشی مطابق با دستورالعمل‌های موسسه ملی بهداشت (NIH) در خصوص مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران نیز پروتکل آزمایشی را تایید کرد. در تست هیپوکسی خفگی، فنی توئین (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) و در دو تست بعدی پروپرانولول (۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) به عنوان کنترل مثبت به کار رفتند. در تمامی تست‌ها، نرمال سالین به عنوان کنترل منفی به کار گرفته شد. آنالیز واریانس یک‌سویه (آنووا) و متعاقب آن نیومن کولز به منظور تعیین اختلاف بین میانگین‌ها استفاده شد. مقادیر P کم‌تر از ۵ درصد معنی‌دار در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها:** عصاره‌ها در برخی مدل‌های تست شده ضد هیپوکسی، فعالیت خوبی در موش‌ها از خود نشان دادند. در مدل خونی عصاره پوست در دوز ۲۵۰ mg/kg، زمان مرگ را موش‌ها حدود ۴/۸ دقیقه افزایش داد ( $P < 0/001$ ). در این دوز اثری مشابه پروپرانولول ۲۰ mg/kg داشت که به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. عصاره پوست در دوز ۲۵۰ mg/kg در مدل گردش خونی، زمان مرگ را در موش‌ها ۵/۴ دقیقه افزایش داد ( $P < 0/001$ ). در این دوز اثری مشابه پروپرانولول ۳۰ mg/kg از خود نشان داد ( $P > 0/05$ ). در مدل خفگی، عصاره دانه در دوز ۲۵۰ mg/kg، به میزان ۲/۴ دقیقه موجب افزایش زمان بقاء در موش‌ها شد؛ اما این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $P > 0/05$ ). عصاره پوست در دوز ۶۲/۵ mg/kg، زمان مرگ را ۴/۲ دقیقه افزایش داد؛ اما این افزایش نیز از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $P < 0/05$ ). عصاره پوست اثر خوبی در مدل خفگی نشان داد. در دوز ۱۲۵ mg/kg، زمان بقاء را حدوداً ۲ برابر نمود ( $P < 0/001$ ). در این دوز عصاره اثری قوی‌تر از فنی توئین ایجاد کرد ( $P < 0/05$ ). زمان زنده ماندن در گروه‌های دریافت‌کننده فنی توئین  $29/60 \pm 2/51$  دقیقه بود که تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل داشت ( $P < 0/001$ ).

**استنتاج:** عصاره فعالیت محافظتی خوبی در برخی مدل‌ها از خود نشان داد. تاثیر عصاره به ویژه در مدل خفگی بالا بود. عصاره پوست قوی‌تر از عصاره دانه بود. محتوای ترکیبات فنلی می‌تواند پاسخگوی اثرات ضد هیپوکسی مشاهده شده عصاره‌ها باشد.

**واژه‌های کلیدی:** هیپوکسی، هیپوکسی خفگی، هیپوکسی خونی، هیپوکسی جریان خون، انار

**مؤلف مسئول:** محمدعلی ابراهیم‌زاده - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی E-mail: zadeh20@yahoo.com

۱. دانشجوی پزشکی، پردیس رامسر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران

۲. دکتر داروساز، مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۸/۱۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۸/۲۸ تاریخ تصویب: ۱۴۰۲/۱۲/۵

## مقدمه

به نظر می‌رسد سریع‌ترین راه برای مدیریت چالش‌های دارویی و بهداشتی در کشورهای در حال توسعه استفاده از گیاهان دارویی باشد. این گیاهان حاوی ترکیباتی هستند که پتانسیل‌های دارویی به آن‌ها می‌بخشد. از جمله این ترکیبات، پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها هستند که خواص فارماکولوژیکی گسترده‌ای از جمله ضد سرطانی، ضد باکتریایی، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی دارند. بنابراین، تحقیقات بر روی توسعه این ترکیبات فعال زیستی قوی متمرکز شده است. فیتوکیمیکال‌ها در واقع به عوامل درمانی نوظهور تبدیل شده‌اند (۱). هیپوکسی معضل بزرگی است که در بسیاری از بیماری‌ها بروز می‌کند. کمبود اکسیژن بافتی در بیماری‌های قلبی عروقی مانند سکته، خونریزی، ایسکمی، تولد نوزاد نارس، در بیماری کوه‌گرفتگی و در برخی تومورهای سرطانی بروز می‌کند. بروز هیپوکسی می‌تواند به مرگ منجر شود. نظر به این که داروهای بسیار محدودی در بازار دارویی در حل مشکل هیپوکسی وجود دارد، هر گونه تلاش در جهت یافتن ترکیبات آنتی هیپوکسی که باعث تخفیف و کاهش عوارض یا مرگ و میر ناشی از آن شود، مفید و ضروری به نظر می‌رسد (۲). در برخی سویه‌های مولد کووید-۱۹ نیز هیپوکسی رخ می‌دهد؛ بر همین اساس استراتژی مبتنی بر استفاده از آنتی هیپوکسی‌ها در درمان کووید-۱۹ طرح شده است. فعالیت بالای آنتی هیپوکسی دگزامتازون به عنوان یکی از مکانیسم‌های پیشنهادی عملکرد این دارو در کووید-۱۹ گزارش شد (۳).

خانواده پونیکاسه دارای یک جنس *Punica* و دو گونه است که گونه مشهور آن انار *P. granatum* است. انار به دلیل خواص دارویی فراوان به عنوان یک میوه شگفت‌انگیز شناخته شده است (۴). پوست انار به عنوان یک دور ریز کشاورزی، دست کم گرفته می‌شود، اگرچه با کاربردهای بومی و خاصیت قابض است. پوست انار به دلیل کاربردهای متعدد آن به عنوان عامل احیاء کننده در ساخت نانوذرات نقره به صورت دوستدار محیط زیست عمل می‌کند. هم‌چنین برای خوراک دام و استخراج

رنگ‌های طبیعی استفاده می‌شود. خواص درمانی بالقوه پوست انار گسترده بوده و شامل درمان و پیشگیری از سرطان، بیماری قلبی عروقی، محافظ کبدی، دیابت، ضد چربی، در مشکلات دندانی و اختلال نعوظ، محافظت در برابر اشعه ماوراء بنفش، ضد التهاب، ضد میکروبی و کاربردهای دیگر شامل ایسکمی مغز نوزاد، بیماری آلزایمر، آرتروز، زخم‌های پوستی و چاقی است (۶-۴). انار پتانسیل ضد ویروسی و ضد کووید-۱۹ نیز دارد (۷). اثر محافظتی عصاره انار در مقابل ایسکمی در مغز موش نوزاد، جراحی ایسکمی - ری پرفیوژن مغزی در موش صحرایی، جراحی ایسکمی - ری پرفیوژن در کلیه موش صحرایی و جراحی ایسکمی - ری پرفیوژن در تخمدان موش صحرایی گزارش شده است (۸-۱۱). اخیراً تحقیقی به کمک فارماکولوژی شبکه (Network pharmacology)، داکینگ مولکولی و اعتبارسنجی تجربی (experimental validation) با هدف بررسی این که آیا پوست انار ممکن است داروی مناسبی برای بیماری کوه‌گرفتگی باشد، انجام شده است. این مطالعه به شکل برون‌تنی کاهش آسیب‌های هیپوکسیک پیر سلول‌های H9c2 توسط عصاره پوست انار نشان داد. بنابراین نتیجه گرفته شد که عصاره پوست انار در بیماری کوه‌گرفتگی ناشی از کمبود اکسیژن در ارتفاعات موثر است (۱۲).

نظر به اثرات قلبی عروقی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوب و اثر ضد ایسکمی انار، تصمیم گرفته شد تا در غالب یک غربالگری، در ادامه کار به سوی کشف ترکیبات طبیعی و گیاهان موثر در کووید-۱۹، فعالیت آنتی‌هیپوکسی دانه و پوست انار در سه روش خونی، گردش خونی و خفگی مورد بررسی قرار گیرد (۱۳).

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی با کد اخلاق IR.MAZUMS.3.REC.1402.17263، میوه‌های رسیده انار از شهرستان بهشهر (مازندران) خریداری و توسط

دکترای سیستماتیک گیاهی (آقای دکتر بهمن اسلامی) تایید شد. میوه‌ها پوست گیری شده و از دانه‌ها جدا شدند. پس از خشک شدن در آون (دمای ۴۵ درجه برای ۳ روز) به صورت جداگانه، هر یک به پودر ریز (۲-۳ میلی متر) تبدیل شدند. از دانه‌ها و پوست این گیاه، عصاره متانلی با روش خیساندن تهیه شد. بدین منظور ۵۰ گرم از هر پودر به طور جداگانه با ۲۵۰ میلی لیتر متانل مخلوط شده و ۳ روز به همین حالت در دمای محیط رها شد. در پایان روز سوم، مجموعه صاف شده و متانل حاصل در دمای ۳۵ درجه در دستگاه روتاری تحت خلا حذف گردید. عصاره‌های حاصل در یخچال نگهداری شد و در هنگام استفاده در نرمال سالین حل و به غلظت (دوز) مورد نظر رسانده شد (۱۴). از موش‌های سوری نر با وزن ۲۱-۲۵ گرم که از انیستیتو پاستور آمل تهیه شده بود، استفاده گردید. گروه‌های مورد مطالعه که هر گروه شامل ۵ سر موش سوری بود، در قفس‌های مجزا تحت وضعیت کنترل شده درجه حرارت (بین ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد) و روشنایی (دوره‌ای ۱۲ ساعت روشن ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری شد. پلت غذا و آب جهت تغذیه به صورت آزادانه در دسترس آن‌ها قرار گرفت. رعایت اصول اخلاقی به تایید کمیته اخلاق رسید. در هر تست دوز ۶۲/۵ mg/kg از هر عصاره در نرمال سالین استفاده شد و سپس حسب پاسخ، دوز بعدی انتخاب شد (۱۵). در هر تست سه دوز به کار رفت. در مدل هیپوکسی خفگی، ۳۰ دقیقه بعد از تزریق داخل صفاقی (i.p.) عصاره‌ها، حیوان در یک محفظه شیشه‌ای در بسته به حجم ۳۰۰ میلی لیتر قرار گرفت. به منظور جلوگیری از مرگ به علت ایجاد اسیدوز، یک بسته کوچک آهک در هر ظرف قرار داده شد. در مدل هیپوکسی خونی، نیتريت سدیم ۳۶۰ mg/kg، ۳۰ دقیقه بعد از تزریق i.p. دوزهای مورد نظر از هر عصاره و در مدل هیپوکسی وابسته به گردش خون، سدیم فلورید ۱۵۰ mg/kg (هر دو در نرمال سالین) تزریق گردید. اثر ضد هیپوکسی به صورت "میزان زمان زنده بودن موش" گزارش شد. در تمامی تست‌ها، نرمال سالین به عنوان

کنترل منفی، در هیپوکسی خفگی، فنی توئین و در دو مدل دیگر، پروپرانولول به عنوان کنترل مثبت به کار رفت.

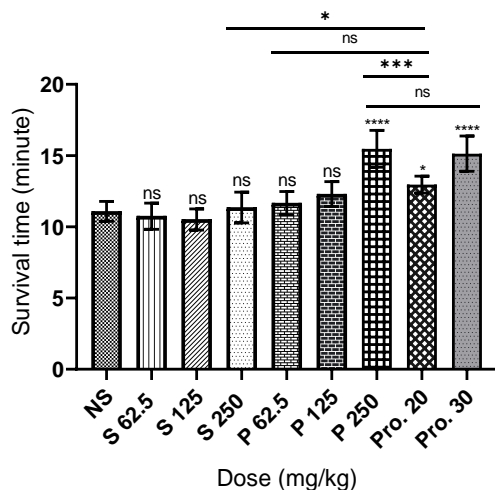
#### تعیین محتوای تام فنولی و فلاونوئید

محتوای تام فنولی از طریق متد فولین سیو کالتیو انجام شد (۱۶). ۰/۵ میلی لیتر از عصاره با ۲/۵ میلی لیتر واکنش گر فولین سیو و ۲ میلی لیتر محلول کربنات سدیم مخلوط و جذب نمونه پس از ۲ ساعت در ۷۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. میزان محتوای تام فلاونوئید هر عصاره از طریق رنگ سنجی ارزیابی شد (۱۷). ۰/۵ میلی لیتر از نمونه با ۱/۵ میلی لیتر متانول و ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلراید و ۰/۱ میلی لیتر از پتاسیم استات و در ۲/۸ میلی لیتر آب مخلوط و جذب آن پس از ۳۰ دقیقه در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه گیری شد. اطلاعات به صورت Mean±SD گزارش شد. آنالیز واریانس یک سویه و متعاقب آن نیومن کولز برای مقایسه میانگین‌ها به کار رفت. برای انجام برنامه‌های آماری از گراف پد پریزم ۸ استفاده شد.

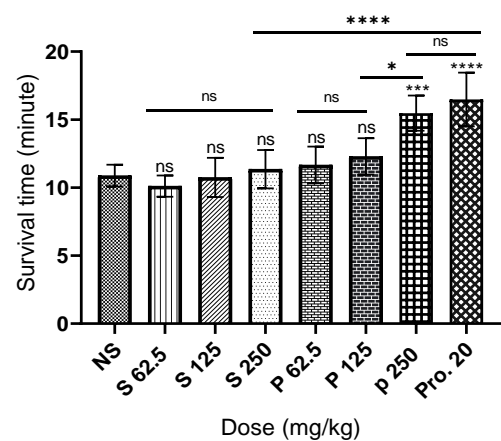
### یافته‌ها و بحث

عصاره متانلی دانه و پوست انار اثر چندانی در تست آنتی هیپوکسی خونی از خود نشان ندادند. عصاره پوست در دوز ۱۲۵ mg/kg موجب افزایش حدود ۱/۴ دقیقه‌ای زمان زنده ماندن موش‌ها شد که از نظر آماری معنی دار نبود ( $P > 0.05$ ). اما همین عصاره در بالاترین دوز تست شده، ۲۵۰ mg/kg، فعالیت خوبی از خود نشان داد و زمان مرگ را از  $10/88 \pm 0/81$  دقیقه برای گروه کنترل به  $15/48 \pm 1/29$  دقیقه افزایش داد. این افزایش ۴/۶ دقیقه‌ای از نظر آماری معنی دار بود ( $P < 0.001$ ). پروپرانولول در دوز ۲۰ mg/kg به طور معنی داری زمان مرگ را  $5/40$  دقیقه افزایش داد ( $P < 0.001$ ). عصاره پوست انار در دوز ۲۵۰ mg/kg اثر یکسانی با پروپرانولول از خود نشان داد ( $P > 0.05$ ) (نمودار شماره ۱). تاثیر عصاره‌ها در دوزهای ۶۲/۵ و ۱۲۵ mg/kg با هم مشابه بود اما تاثیر عصاره پوست انار در ۲۵۰ به مراتب بالاتر از عصاره دانه بود ( $P < 0.01$ ).

دوز تست شده، ۲۵۰ mg/kg فعالیت بسیار خوبی از خود نشان داد و زمان مرگ را از  $11/08 \pm 0/70$  دقیقه برای گروه کنترل به  $15/48 \pm 1/29$  دقیقه افزایش داد. این افزایش از نظر آماری کاملاً معنی‌دار بود ( $P < 0/0001$ ). پروپرانولول در دوز ۲۰ mg/kg موجب افزایش ۱/۹ دقیقه‌ای در زمان مرگ در موش‌ها شد ( $P < 0/05$ ). عصاره دانه انار حتی در بالاترین دوز تست شده یعنی ۲۵۰ mg/kg نتوانست زمان بقاء را به این زمان برساند و از پروپرانولول ضعیف‌تر بود ( $P < 0/05$ )؛ اما عصاره پوست انار در دوز ۶۲/۵ mg/kg اثری معادل پروپرانولول در دوز ۲۰ mg/kg از خود نشان داد ( $P > 0/05$ ). پروپرانولول در دوز ۳۰ mg/kg موجب افزایش ۴ دقیقه‌ای در زمان زنده ماندن موش‌ها شد ( $P < 0/0001$ ). عصاره پوست انار در دوز ۲۵۰ mg/kg اثری معادل پروپرانولول ۳۰ mg/kg از خود نشان داد ( $P > 0/05$ ) (نمودار شماره ۲). تاثیر عصاره‌های دانه و پوست انار در دوزهای ۶۲/۵ و ۱۲۵ mg/kg در هیپوکسی گردش خونی با هم مشابه بود ( $P > 0/05$ )؛ اما تاثیر عصاره پوست انار در ۲۵۰ به مراتب بالاتر از عصاره دانه بود ( $P < 0/0001$ ).



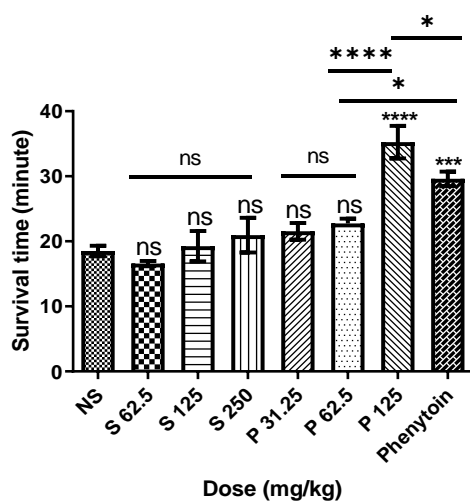
نمودار شماره ۲: مقایسه فعالیت آنتی هیپوکسی عصاره دانه و پوست انار در هیپوکسی گردش خون در موش سوری نر، \* نسبت به گروه کنترل منفی ( $P < 0/0001$ ), ( $P < 0/001$ ), (\*\*\*) ns: ( $P < 0/05$ ), ( $P < 0/05$ )



نمودار شماره ۱: مقایسه فعالیت آنتی هیپوکسی عصاره متانلی دانه و پوست انار در هیپوکسی خونی در موش سوری نر، \* نسبت به گروه کنترل منفی، ( $P < 0/0001$ ), ( $P < 0/001$ ), (\*\*\*) ns: ( $P < 0/05$ ), ( $P < 0/05$ )

در این مدل، تزریق سدیم نیتريت موجب تبدیل هموگلوبین به مت‌هموگلوبین شده و در نتیجه اکسیژن‌رسانی به بافت‌ها دچار می‌شود. پروپرانولول موجب بهبود فعالیت تنفسی میتوکندریایی شده و از عضله قلب در برابر اثرات هیپوکسی و ایسکمی محافظت می‌کند (۱۸). در نتایج به‌دست آمده از تحقیقات قبلی، عصاره سرخ ولیک در دوز ۴۰۰ mg/kg حدود یک دقیقه به‌طور معنی‌داری زمان بقا را در موش افزایش داد ( $P < 0/05$ ) (۱۹). اندام هوایی فرولا پرسیکا در ۶۲/۵ mg/kg موجب افزایش ۲ دقیقه در زمان بقاء موش‌ها شد ( $P < 0/05$ ) و در دوز ۱۲۵ mg/kg اثری مشابه پروپرانولول از خود نشان داد (۲۰). عصاره برگ و میوه پلم به ترتیب با دوز ۱۲۵ و ۶۲/۵ mg/kg نسبت به گروه کنترل فعالیت قابل توجهی از خود نشان دادند و زمان مرگ را به تأخیر انداختند؛ اما عصاره برگ مورد حتی با دوز ۱۲۵ mg/kg اثری نداشت (۱۵).

عصاره متانلی دانه و پوست انار اثر خوبی در تست هیپوکسی گردش خونی از خود نشان ندادند. تنها عصاره پوست در دوز ۱۲۵ mg/kg موجب افزایش حدود ۱/۲ دقیقه‌ای زمان زنده ماندن موش‌ها شد که از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $P > 0/05$ ). اما همین عصاره در بالاترین



نمودار شماره ۳: مقایسه فعالیت آنتی هیپوکسی عصاره دانه و پوست انار در هیپوکسی خفگی در موش سوری نر، \* نسبت به گروه کنترل منفی ns: ( $P < 0.05$ ), \* ( $P < 0.05$ ), \*\*\* ( $P < 0.001$ ), \*\*\*\* ( $P < 0.0001$ )

در مدل هیپوکسی خفگی، فنی توئین میزان مصرف اکسیژن، فعالیت سلولی و مصرف ATP را کم تر و مقاومت سلولی را در برابر ایجاد هیپوکسی بیش تر می کند (۱۸). در نتایج به دست آمده از تحقیقات قبلی، عصاره گل خطمی در دوز ۶۲/۵ mg/kg موثر بود و زمان مرگ را نسبت به گروه کنترل منفی افزایش داد. عصاره در ۱۲۵ mg/kg اثری معادل فنی توئین از خود نشان داد. در دوز ۲۵۰ mg/kg قوی تر از فنی توئین بود (۲۲). عصاره گل سیر در دوز ۱۲۵ mg/kg اثری معادل فنی توئین ( $P > 0.05$ ) و در دوز ۲۵۰ mg/kg اثری به مراتب قوی تر از آن ایجاد نمود ( $P < 0.001$ ) (۲۱). عصاره های برگ و میوه پلم در دوزهای تست شده فعالیتی از خود نشان ندادند؛ اما عصاره برگ مورد در دوز ۱۲۵ mg/kg اثر مشابه فنی توئین داشت (۱۵). عصاره گیاه تره نیز در دوز ۲۵۰ mg/kg به طور قابل ملاحظه ای نسبت به گروه کنترل زمان مرگ را به تعویق انداخت ( $P < 0.001$ ) (۲۳). محتوای تام فنلی پوست و دانه به ترتیب ۲۰۵/۸۱ ± ۴/۷۸ و ۸۴/۶۵ ± ۲/۵۶ GAE در گرم عصاره و محتوای تام فلاونوئیدی به ترتیب ۲۸/۱۵ ± ۱/۷۳ و ۱۶/۲۰ ± ۰/۹۲ QE در گرم عصاره به دست آمد.

در این تست فلورید سدیم باعث لیز شدن هموگلوبین و در نتیجه کاهش ظرفیت حمل اکسیژن می گردد. در نتیجه سلولها به دلیل عدم دریافت اکسیژن کافی از خون، دچار هیپوکسی و مرگ می گردند (۱۸). در نتایج به دست آمده در تحقیقات قبلی، عصاره گل سیر در دوز ۶۲/۵ mg/kg تأثیری نداشت ( $P > 0.05$ )؛ اما در دوز ۱۲۵ mg/kg زمان زنده ماندن را افزایش داد ( $P < 0.05$ ) (۲۱). عصاره گل خطمی در دوز ۶۲/۵ mg/kg موثر بود و زمان بقا را کنترل افزایش داد. در دوز ۱۲۵ mg/kg زمان زنده ماندن را حدود ۳ دقیقه افزایش داد ( $P < 0.01$ )؛ اما کمی ضعیف تر از پروپرانولول بود ( $P < 0.01$ ) (۲۲). عصاره برگ پلم فعالیت محافظتی خوبی از خود نشان داد؛ اما عصاره میوه حتی در دوز ۲۵۰ mg/kg هیچ فعالیتی نشان نداد (۱۵).

عصاره متانلی دانه و پوست انار اثر خوبی در تست خفگی از خود نشان نداد. اگرچه عصاره دانه در دوز ۲۵۰ mg/kg، به میزان ۲/۴ دقیقه موجب افزایش زمان بقا در موشها شد؛ اما این افزایش از نظر آمار معنی دار نبود ( $P > 0.05$ ). عصاره پوست در دوز ۶۲/۵ mg/kg، زمان مرگ را از ۱۸/۵۱ ± ۱/۷۹ دقیقه برای گروه کنترل به ۲۲/۷۶ ± ۱/۲۷ دقیقه افزایش داد. اما این افزایش ۴/۲ دقیقه ای از نظر آماری معنی دار نبود ( $P < 0.05$ ). این عصاره در دوز ۱۲۵ mg/kg این زمان بسیار طولانی تر گردید و زمان بقا موشها را تقریباً دو برابر نمود و به ۳۵/۲۵ ± ۵/۵۶ دقیقه رساند. این افزایش در زمان زنده ماندن از نظر آماری معنی دار بود ( $P < 0.0001$ ). در این مدل، فنی توئین در دوز ۵۰ mg/kg به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. زنده ماندن در گروه های دریافت کننده فنی توئین ۲۹/۶۰ ± ۲/۵۱ دقیقه بود که تفاوت معنی داری با گروه کنترل داشت ( $P < 0.001$ ). تنها عصاره پوست در بالاترین دوز تست شده خود، ۱۲۵ mg/kg توانست اثری قوی تر از فنی توئین ایجاد کند ( $P < 0.05$ ) (نمودار شماره ۳).

خفگی بالا بود. تاثیر عصاره پوست قوی تر از عصاره دانه بود که می تواند به علت وجود بیش تر محتوای تام فنلی و فلاونیدی در آن باشد.

## سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه های دانشجویی به شماره (کد طرح ۱۷۲۶۳) می باشد که بدین وسیله از حمایت مالی معاونت پردیس رامسر تشکر می گردد (IR.MAZUMS.3.REC.1402.17263).

لازم به ذکر است که در انجام این کار بهتر بود حداقل یکی از فاکتورهای اصلی نشان دهنده هایپوکسی مانند ارزیابی مقدار اشباع اکسیژن یا سطح خونی فاکتور القاشده با هایپوکسی سنجیده و گزارش شود. اما عملاً بودجه لازم و زمان کافی برای انجام این آزمایشات وجود نداشت. این موضوع به عنوان محدودیت کار ذکر می گردد و پیشنهاد می شود، سایر محققان این موارد را مد نظر قرار دهند. در مجموع عصاره فعالیت محافظتی خوبی در برخی مدل ها از خود نشان داد. تاثیر عصاره به ویژه در مدل

## References

1. Ekalu A, DamaHabilab J. Flavonoids as the emerging therapeutic agents: A review of their bioactivity,chemoprevention and chemotherapy approach. *J Med Herb* 2019; 9(4): 209-220.
2. Yazdani S, Mohammadyan M, Hosseinzadeh M.H, Ebrahimzadeh M.A. Evaluation of antihypoxic activity of Kojic acid in mice. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences SJKU* 2023; 27(6): 1-12 (Persian).
3. Hosseinzadeh MH, Shamshirian A, Ebrahimzadeh MA. Dexamethasone Vs. COVID-19: An experimental study in line with the preliminary findings of a large trial. *Int J Clin Prac* 2021; 75(6): e13943.
4. Middha SK, Usha T, Pande V. A review on antihyperglycemic and antihepatoprotective activity of eco-friendly Punica granatum peel waste. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013: 656172.
5. Jurenka J. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum*L.): a review. *Altern Med Rev* 2008; 13(2): 128-144.
6. Viuda-Martos M, Fern´andez-L´opez J, Perez-Alvarez JA. Pomegranate and itsmany functional components as related to human health: a review,” *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2010; 9(2): 635-654.
7. Maphetu N, Unuofin JO, Masuku NP, Olisah C, Lebelo SL. Medicinal uses, pharmacological activities, phytochemistry, and the molecular mechanisms of *Punica granatum* L. (pomegranate) plant extracts: A review. *Biomed Pharmacother* 2022; 153: 113256.
8. West T, Atzeva M, Holtzman DM. Pomegranate polyphenols and resveratrol protect the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Dev Neurosci* 2007; 29(4-5): 363-372.
9. Ahmed MA, El Morsy EM, Ahmed AA. Pomegranate extract protects against cerebral ischemia/reperfusion injury and preserves brain DNA integrity in rats. *Life Sci* 2014; 110(2): 61-69.
10. Sancaktutar AA, Bodakci MN, Hatipoglu NK, Soylemez H, Basarılı K, Turkcü G. The protective effects of pomegranate extracts against renal ischemia-reperfusion injury in male rats. *Urol Ann* 2014; 6(1): 46-50.
11. Yayla M, Cetin D, Adali Y, Kilicli PA, Toktay E. Potential therapeutic effect of pomegranate seed oil on ovarian ischemia/reperfusion injury in rats. *Iran J Basic Med Sci* 2018; 21(12): 1262 (Persian).

12. Yeerjiang A, Maimaitiyiming D, Yang T, Fang L, Aihemaituoheti A, Aimaiti M, et al. Pomegranate Peel in the Amelioration of High-Altitude Disease: A Network Pharmacology and Molecular Docking Study of Underlying Mechanisms. *J Food Biochem* 2023; 2023: 7186747.
13. Razani Z, Dastani M, Kazerani HR. Cardioprotective effects of pomegranate (*Punica granatum*) juice in patients with ischemic heart disease. *Phytother Res* 2017; 31(11): 1731-1738.
14. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B. Free radical scavenging ability of methanolic extract of *Hyoscyamus squarrosus* leaves. *Pharmacologyonline* 2009; 2: 796-802.
15. Kaveh K, Mohamadyan M, Ebrahimzadeh MA. Antihypoxic activities of *Sambucus ebulus* leaf and fruit and *Myrtus communis* leaf in mice. *J Mazandaran Uni Med Sci* 2019; 29(176): 61-73 (Persian).
16. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B. Antioxidant activity of aqueous extract of *Pyrus boissieriana* fruit. *Pharmacologyonline* 2009; 1: 1318-1323.
17. Nabavi SM, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Bahramian F. In vitro antioxidant activity of *Phytolacca americana* berries. *Pharmacologyonline* 2009; 1(2009): 81-88.
18. Yazdani S, Mohammadyan M, Hosseinzadeh MH, Ebrahimzadeh MA. Evaluation of antihypoxic activity of Kojic acid in mice. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences SJKU* 2023; 27(6): 1-12 (Persian).
19. Ebrahimzadeh MA, Khalili M, Jafari N, Zareh G, Farzin D, Amin G. Antihypoxic activities of *Crataegus pentaegyn* and *Crataegus microphylla* fruits-an in vivo assay. *Braz J Pharmaceut Sci* 2018; 54(2): e17363.
20. Atae R, Hasani H, Mohammadyan M, Ebrahimzadeh MA. Antihypoxic activities of aerial parts and roots of *Ferula persica* in Mice. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 2020; 30(189): 126-132 (Persian).
21. Shahbazee M, Mohammadyan M, Ebrahimzadeh MA. Antihypoxic activities of *Allium sativum* Flower in Mice. *J Mazandaran Uni Med Sci* 2019; 29(175): 145-149 (Persian).
22. Hosseinzadeh M.H, Ebrahimzadeh MA. Antihypoxic activities of *Hibiscus rosa-sinensis* in Mice. *J Mazandaran Uni Med Sci* 2020; 30(186): 133-140 (Persian).
23. Shahnazi R, Mehrdadfar F, Ebrahimzadeh MA. Impact of extraction methods on total phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antihypoxic properties of *Allium ampeloprasum* in Mice. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2018; 27(158): 27-44 (Persian).