

## Evaluation of Antihypoxic Activities of Naringin and Naringenin in Asphyxia, Haemic and Circulatory Hypoxia Models in Mice

Amin Barani<sup>1</sup>  
 Hossein Rezaee<sup>2</sup>  
 Karimollah Dinee<sup>2</sup>  
 Mohammad Ali Ebrahimzadeh<sup>3</sup>

<sup>1</sup> PhD Student in Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>2</sup> Pharmacy Student, Ramsar Campus, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, Iran

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

(Received September 3, 2023; Accepted April 17, 2024)

### Abstract

**Background and purpose:** Hypoxia is a decrease in available oxygen reaching the tissues of the body which can lead to body function impairment. It is linked to the pathology of acute mountain sickness, cardiovascular disease, and stroke. Hypoxia causes oxidative stress involving the production of reactive oxygen species (ROS). Naringenin and naringin are widely found in *Citrus* spp. These compounds have many biological effects, potent antioxidant activities, and influential effects in ischemia/reperfusion. Nothing is found about the anti-hypoxic activities of these compounds. This study aimed to investigate the anti-hypoxia activities of these compounds in mice.

**Materials and methods:** In this experimental study, the protective effects of these compounds at 5-20 mg/kg were evaluated against hypoxia-induced lethality in mice by three experimental models of hypoxia, i.e. asphyctic, haemic, and circulatory hypoxia. The latencies for death for mice in minutes 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 controls. In all tests, Normal saline (0.5 ml, i.p.) was used as the negative control. Analysis of variance was performed followed by Newman-Keuls multiple comparisons (by GraphPad Prism 8) were used to determine the differences in means.

**Results:** In the circulatory model, both compounds showed very good effects. The effects were completely dose-dependent. Naringin at a dose of 5 mg/kg increased the death time by approximately 7.3 minutes ( $P<0.01$ ). Naringenin at 10 mg/kg significantly increased the death time by 3.2 minutes ( $P<0.01$ ). These compounds in these doses showed a similar effect to propranolol, which was used as a positive control. In the haemic model, only naringin showed a very good and dose-dependent effect. These compounds at 5 mg/kg increased the survival time by about 4.5 minutes ( $P<0.01$ ). Naringenin had no effect in this model even at a dose of 40 mg/kg. Naringin at 5 mg/kg and naringenin at 40 mg/kg showed a similar effect to propranolol. In the asphyctic model, both compounds showed great effects. Their effects were completely dose-dependent. Naringin at 5 mg/kg increased the time to death by 7.2 minutes ( $P<0.001$ ). At the dose of 10 mg/kg, the death time was increased by 10 minutes and reached 29 minutes ( $P<0.0001$ ). Naringenin at 5 mg/kg increased the survival time of mice by 4.2 minutes ( $P<0.05$ ). At the dose of 10 mg/kg, the death time was increased by 10 minutes and reached 27 minutes ( $P<0.0001$ ). Naringenin at 5 and naringenin at 10 mg/kg produced a similar effect to phenytoin, which was used as a positive control ( $P>0.05$ ).

**Conclusion:** According to the results of this study, it was found that Naringin has very good protective activities in all models. Naringenin was not effective in the haemic model. The result of this research can be responsible for cardiovascular effects and their good effects on ischemia/reperfusion.

**Keywords:** hypoxia, asphyctic hypoxia, haemic hypoxia, circulatory hypoxia, naringenin, naringin, citrus

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 34 (232): 204-212 (Persian).

**Corresponding Author:** Mohammad Ali Ebrahimzadeh - Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: zadeh20@yahoo.com)

# ارزیابی فعالیت آنتی هیپوکسی نارینجین و نارینجین در سه مدل خفگی، خونی و گردش خونی در موش سوری

امین بارانی<sup>۱</sup>  
حسین رضایی<sup>۲</sup>  
کریم اله دینی<sup>۲</sup>  
محمد علی ابراهیم زاده<sup>۳</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** هیپوکسی کاهش اکسیژن موجود در بافت‌های بدن است که می‌تواند منجر به اختلال در عملکرد بدن شود. هیپوکسی با پاتولوژی بیماری کوه‌گرفتگی، بیماری قلبی عروقی و سکتة مغزی مرتبط است. هیپوکسی موجب استرس اکسیداتیو و تولید ذرات فعال اکسیژن می‌گردد. نارینجین و نارینجین به‌طور گسترده در مرکبات وجود دارند. این ترکیبات اثرات بیولوژیکی زیادی داشته، فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های بالایی داشته و اثر خوبی هم در ایسکمی / ری‌پرفیوژن دارند. تا امروز چیزی در خصوص فعالیت آنتی‌هیپوکسی این ترکیبات گزارش نشده است. این تحقیق به منظور بررسی فعالیت آنتی‌هیپوکسی این ترکیبات در موش انجام شده است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، اثر محافظتی این ترکیبات در دوزهای ۲۰-۵۰ mg/kg در مقابل مرگ و میر ناشی از هیپوکسی در موش سوری با سه مدل خفگی، خونی و جریان خونی مورد ارزیابی قرار گرفت. زمان زنده ماندن موش‌ها به دقیقه 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، فنی‌توئین (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 و متعاقب آن نیومن-کولز با کمک نرم‌افزار گراف‌پد پریم ۸ به منظور تعیین اختلاف بین میانگین‌ها استفاده شد.

**یافته‌ها:** در مدل گردش خونی، هر دو ترکیب تاثیر بسیار خوبی از خود نشان دادند. تاثیرات کاملاً وابسته به دوز بود. نارینجین در دوز ۵ mg/kg زمان مرگ را تقریباً ۷/۳ دقیقه افزایش داد ( $P<0/01$ ). نارینجین در دوز ۱۰ mg/kg به‌طور معنی‌داری زمان مرگ را ۳/۲ دقیقه افزایش داد ( $P<0/01$ ). این ترکیبات در این دوزها اثری مشابه پروپرانولول که به عنوان کنترل مثبت به کار رفت از خود نشان دادند. در مدل خونی، تنها نارینجین تاثیر بسیار خوبی و وابسته به دوز از خود نشان داد. این ترکیب در ۵ mg/kg زمان مرگ را حدود ۴/۵ دقیقه افزایش داد ( $P<0/01$ ). نارینجین حتی در دوز ۴۰ mg/kg نیز تاثیری نداشت. نارینجین در ۵ mg/kg و نارینجین در ۴۰ mg/kg اثری مشابه پروپرانولول از خود نشان دادند. در مدل خفگی، هر دو ترکیب تاثیر بسیار خوبی از خود نشان دادند. تاثیرات آن‌ها کاملاً وابسته به دوز بود. نارینجین در ۵ mg/kg زمان مرگ را ۷/۲ دقیقه افزایش داد ( $P<0/001$ ). در دوز ۱۰ mg/kg زمان مرگ ۱۰ دقیقه اضافه شد و به ۲۹ دقیقه رسید ( $P<0/0001$ ). نارینجین نیز در ۵ mg/kg زمان مرگ موش‌ها را ۴/۲ دقیقه افزایش داد ( $P<0/005$ ). در دوز ۱۰ mg/kg زمان مرگ ۱۰ دقیقه اضافه شد و به ۲۷ دقیقه رسید ( $P<0/0001$ ). نارینجین در دوز ۵ mg/kg و نارینجین در دوز ۱۰ mg/kg اثری مشابه فنی‌توئین که به عنوان کنترل مثبت به کار رفت، ایجاد کردند ( $P<0/005$ ).

**استنتاج:** با توجه به نتایج این مطالعه مشخص شد که نارینجین فعالیت محافظتی بسیار خوبی را در تمامی مدل‌های از خود نشان می‌دهد. نارینجین تنها در مدل خونی موثر نبود. نتیجه این تحقیق می‌تواند پاسخگوی اثرات قلبی عروقی و تاثیر خوب آن‌ها بر ایسکمی / ری‌پرفیوژن باشد.

**واژه‌های کلیدی:** هیپوکسی، هیپوکسی خفگی، هیپوکسی خونی، هیپوکسی جریان خون، نارینجین، نارینجین، مرکبات

E-mail: zadeh20@yahoo.com

**مؤلف مسئول:** محمد علی ابراهیم زاده - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی

۱. دستیار شیمی دارویی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. دانشجوی داروسازی، پردیس رامسر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۶/۱۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۷/۱۵ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۱/۲۹

## مقدمه

کاهش میزان اکسیژن در بافت‌های بدن به دلیل هر گونه تغییر در انجام تنفس طبیعی، هیپوکسی نام دارد. این کاهش اکسیژن در سرخرگ‌ها به شکل خفگی، اختناق و سیانوز نمایان می‌شود. عواملی چون کمبود اکسیژن محیط، خون‌ریزی و مسمومیت‌های سلولی از عوامل ایجادکننده هیپوکسی هستند (۱). هیپوکسی عامل مشکلات یا آسیب‌های جدی در بیماری‌های قلبی عروقی از جمله ایسکمی و سکته بوده و در مواردی چون حین زایمان، در کوه‌گرفتن و سلول‌های تومور ایجاد می‌شود. بر این اساس تحقیق در زمینه ترکیبات آنتی‌هیپوکسی به منظور پیشگیری و درمان عوارض ناشی از این بیماری‌ها حائز اهمیت است (۲). در برخی سوبه‌های مولد کووید-۱۹ نیز هیپوکسی رخ می‌دهد و به همین دلیل فعالیت بالای آنتی‌هیپوکسی دگزامتازون به عنوان یکی از مکانیسم‌های احتمالی عملکرد این دارو در درمان کووید-۱۹ گزارش شده است (۳). نارینجین و نارینجین (فرم گلیکوزیده آن) از دسته فلاونوئیدها بوده که به طور گسترده در مرکبات، برگاموت، گوجه‌فرنگی و سایر میوه‌ها وجود دارند. این ترکیبات بدماندازه رادیکال آزاد، شلاته‌کننده یون فلزی و فعال‌کننده دفاع آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بوده و فعالیت‌های بیولوژیکی بسیاری از جمله آنتی‌اکسیدانی، ضد توموری، ضد ویروسی، ضد باکتریایی، ضد دیابتی، ضد التهابی، کاهنده چربی و محافظت‌کننده گوارش، تعدیل‌کننده ایمنی، محافظت‌کننده قلبی، محافظت‌کننده از کلیه و محافظت‌کننده عصبی دارند (۴-۶). است. این خواص در درجه اول به فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی آن نسبت داده می‌شود (۷، ۸). نارینجین از سلول‌های قلبی در برابر آسیب‌های شیمیایی ناشی از هیپوکسی محافظت می‌کند (۹). این ترکیبات اثرات اثبات شده‌ای در ایسکمی/ری‌پرفیوژن دارند (۱۰-۱۳). علی‌رغم این فعالیت‌های خوب آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌ایسکمی، اطلاعات بسیار اندکی در خصوص فعالیت آنتی‌هیپوکسی ترکیبات

گزارش شده است، بر این اساس تصمیم گرفته شد در ادامه کار به سوی کشف ترکیبات طبیعی و گیاهان موثر بر ایسکمی و کووید-۱۹، فعالیت آنتی‌هیپوکسی نارینجین و نارینجین در سه مدل هیپوکسی مختلف یعنی هیپوکسی خونی، هیپوکسی جریان خونی و هیپوکسی خفگی با سه مکانیسم متفاوت، مورد بررسی قرار گیرد.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی با کد اخلاق IR.MAZUMS.3.REC.1402.14433 از موش‌های سوری نر با وزن ۲۱-۲۵ گرم که از انیستیتو پاستور آمل تهیه شده بود، استفاده گردید. هشت گروه در هر تست که هر گروه شامل ۵ سر موش سوری بود که در قفس‌های مجزا تحت وضعیت کنترل شده درجه حرارت (بین ۲۰ تا ۲۵ درجه) و روشنایی (دوره‌ای ۱۲ ساعت روشن ۱۲ ساعت تاریکی) و رطوبت مناسب نگهداری شد. پلت غذا و آب جهت تغذیه به صورت آزادانه در دسترس آن‌ها قرار گرفت. نارینجین و نارینجین به صورت خالص از فلوکا خریداری شد. در هر تست دوزهای ۵، ۱۰ و ۲۰ mg/kg از ترکیبات در نرمال سالین استفاده شد (۱۲، ۱۳). در مدل هیپوکسی خفگی، ۳۰ دقیقه بعد از تزریق داخل صفاقی i.p. ترکیبات، حیوان در یک محفظه شیشه‌ای در بسته به حجم ۳۰۰ میلی‌لیتر قرار گرفت. از آهک به عنوان جاذب CO<sub>2</sub> استفاده شد تا خفگی صرفاً به دلیل کاهش اکسیژن محیط باشد و اسیدوز متابولیک ناشی از افزایش CO<sub>2</sub> در فضای در بسته کوچک، نقشی در مرگ موش‌ها نداشته باشد. در مدل هیپوکسی خونی، نیتريت سدیم ۳۶۰ mg/kg، ۳۰ دقیقه بعد از تزریق i.p. دوزهای مورد نظر و در مدل هیپوکسی وابسته به گردش خون، سدیم فلورید ۱۵۰ mg/kg، ۳۰ دقیقه بعد از تزریق i.p. دوزهای مورد نظر تزریق گردید. اثر ضد هیپوکسی به صورت میزان زمان زنده بودن موش گزارش شد. در تمامی موارد نرمال سالین به عنوان کنترل منفی، در هیپوکسی خفگی،

فنی توئین (50 mg/kg) و در دو مدل دیگر، پروپرانولول 20 یا 30 mg/kg بر اساس مراجع قبلی به عنوان کنترل مثبت به کار رفت (12, 11). اطلاعات به صورت Mean±SD گزارش شد. آنالیز واریانس یک سویه و متعاقب آن نیومن کولز برای مقایسه میانگین‌ها به کار رفت. نتایج با احتمال  $P < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای انجام کارهای آماری از برنامه گراف پد پریزم 8 (GraphPad Prism) استفاده شد.

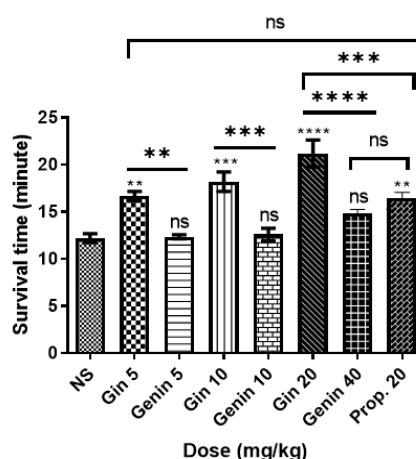
## یافته‌ها و بحث

در خلال اختلال عملکرد میوکارد (کاردیومیوپاتی سپتیک)، سلول‌های قلبی، ایسکمی و هیپوکسی را تجربه می‌کنند و مسیرهای سیگنال‌دهی متعددی را در بافت قلب فعال می‌کنند تا آسیب ایسکمیک-هیپوکسیک میوکارد را خنثی کند، که بیش‌تر آن‌ها توسط HIF-1 $\alpha$  تنظیم می‌شوند. نارینجین آسیب قلبی را بهبود می‌بخشد. HIF-1 $\alpha$  یک پروتئین هدف کلیدی نارینجین است. افزایش بیان HIF-1 $\alpha$  در قلب آسیب دیده وجود دارد و مهارکننده آن به‌طور موثر در برابر آسیب قلبی محافظت می‌کند. اتصال مستقیم بین نارینجین و پروتئین HIF-1 $\alpha$  تایید شده است (14). مرحله اولیه در hypoxic-ischemic brain injury، هیپوکسی، ایسکمی و تخلیه انرژی است که منجر به ورود کلسیم می‌شود. با ورود کلسیم، رادیکال‌های آزاد سوپر اکسید، هیدروکسیل، اکسیژن سینگلت و پراکسید هیدروژن تولید می‌شوند (1). از سویی عوامل محافظت کننده عصبی نقش مهمی در درمان انسفالوپاتی هیپوکسیک-ایسکمیک (HIE) دارند. نارینجین دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قوی و محافظت کننده عصبی است. نارینجین کاربرد بالینی بالقوه‌ای در درمان HIE به عنوان یک عامل محافظ عصبی جدید دارد. این ترکیب با تعدیل بیان Vegfa و فعال کردن مسیر PI3K/AKT برای مهار آپوپتوز، اثر محافظت کننده عصبی در آسیب مغزی هیپوکسیک-ایسکمیک دارد. نتایج اتصال مولکولی نشان داده که Vegfa یک

هدف بالقوه اتصال نارینجین است و خاموش کردن آن تا حدی اثرات دارویی نارینجین را معکوس می‌کند (15). مکانیسم نارینجین در بهبود آسیب روده ناشی از ایسکمی/ریپرفیوژن I/R در موش مورد بررسی قرار گرفته است. نارینجین آسیب روده را بهبود بخشید و محتوای آلانین آمینوترانسفراز و آسپارات آمینوترانسفراز را در پلاسما کاهش داد. هم‌چنین التهاب را کاهش داد که با کاهش محتوای اینترلوکین 1 بتا و 6، TNF- $\alpha$  و IFN- $\beta$  همراه است. نارینجین بیان پروتئین‌های آپوپتوتیک، Bax، کاسپاز-3 و Bcl-2 را کاهش می‌دهد. غیرفعال کردن سیگنالینگ cGAS-STING هدف مهمی برای بهبودی ناشی از نارینجین در روده آسیب دیده توسط ایسکمی/ریپرفیوژن است (16). مکانیسم‌های محافظت قلبی نارینجین در برابر آسیب ایسکمی خون‌رسانی مجدد I/R نشان داده که پیش‌درمانی نارینجین عملکرد قلب و تغییرات الکتروکاردیوگرام ECG ناشی از آسیب I/R را ترمیم نموده و درجه آریتمی را کاهش داده است. نارینجین باعث کاهش ادم سلولی، کاردیومیوسیت‌ها و قطر هسته می‌شود. اثر محافظتی قلبی در برابر آسیب I/R قلبی به واسطه اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد آپوپتوز آن ایجاد می‌شود (17). در این تحقیق، در غالب یک غربالگری، در ادامه کار به سوی کشف ترکیبات طبیعی و گیاهان موثر در ایسکمی و کووید-19، فعالیت آنتی‌هیپوکسی (آنتی ایسکمی) دو ماده موثره گیاهی در سه روش مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. فعالیت آنتی‌هیپوکسی می‌تواند فعالیت ضد ایسکمی گزارش شده از ترکیبات را تایید کند.

در مدل مسمومیت خونی از سدیم نیتريت برای القای هیپوکسی استفاده می‌شود. در این مدل، ساختار هموگلوبین‌ها دچار اختلال نیستند اما ظرفیت حمل اکسیژن از طریق تبدیل هموگلوبین به مت هموگلوبین کاهش یافته و در نتیجه با ایجاد هیپوکسی موجب مرگ می‌گردند (18). علت مسمومیت سدیم نیتريت از طریق فعال کردن مسیرهای اکسیداسیون مغزی می‌باشد که به

دلیل تولید رادیکال‌های آزاد سبب مرگ سلولی می‌گردد (۱۹). نارینجین تاثیر بسیار خوبی در مدل خونی از خود نشان داد. تاثیر این ترکیب در این تست وابسته به دوز بود. نارینجین در دوز ۵ mg/kg زمان مرگ را از ۱۶/۶۷±۱/۰۱ برای گروه کنترل به ۱۲/۲۰±۱/۷ افزایش داد ( $P<0/01$ ). با دوز بالاتر، ۱۰ mg/kg زمان زنده ماندن ۶ دقیقه افزایش یافت ( $P<0/001$ ). در دوز ۲۰ mg/kg زمان بقاء موش‌ها را نسبت به گروه کنترل ۹ دقیقه افزایش داد ( $P<0/001$ ). نارینجین در این مدل تاثیری چندانی بر زمان مرگ و میر موش‌ها نداشت. حتی در دوز ۴۰ mg/kg تاثیر معنی‌داری بر زمان مرگ نداشت ( $P<0/05$ ). پروپرانولول در دوز ۲۰ mg/kg زمان بقاء را ۴/۲ دقیقه افزایش داد و به ۱۶/۴۴±۱/۳۹ رساند ( $P<0/01$ ). نارینجین در ۵ mg/kg اثری مشابه پروپرانولول از خود نشان داد ( $P<0/05$ ). در دوز ۲۰ mg/kg به مراتب از آن قوی‌تر بود ( $P<0/001$ ). نارینجین در ۴۰ mg/kg اثری مشابه پروپرانولول داشت ( $P<0/05$ ). (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱: فعالیت آنتی‌هیپوکسی نارینجین (Gin) و نارینجین

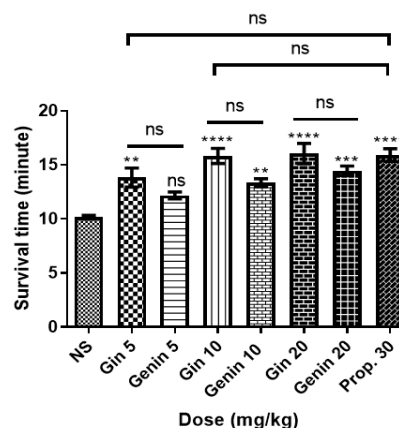
(Genin) در مدل خونی

ns:  $P>0/05$  not significant,  $P<0/01$  \*\*,  $P<0/001$  \*\*\*\*

در نتایج به‌دست آمده از تحقیقات قبلی، روتین و کلروژنیک اسید حتی در دوز ۱۰۰ mg/kg در این مدل اثری از خود نشان ندادند (۲۰). کوجیک اسید در دوز

۶۲/۵ mg/kg تاثیری بر زمان مرگ نداشت ( $P>0/05$ ), اما در دوز ۱۲۵ mg/kg فعالیت قابل توجهی از خود نشان داد و زمان مرگ را حدود ۳/۵ دقیقه افزایش داد (از ۱۱/۸۰ دقیقه به ۱۵/۲۶ دقیقه،  $P<0/05$ ). بتائین تاثیری خوبی در افزایش بقاء موش‌ها داشت. در ۲۵ mg/kg زمان مرگ را بیش از ۴ دقیقه افزایش داد (از ۱۲/۲۰ به ۱۶/۴۴ دقیقه،  $P<0/05$ ). فولیک اسید در دوز ۱۰ mg/kg زمان مرگ را ۱/۸ دقیقه افزایش داد که اختلاف معنی‌داری با کنترل منفی داشت ( $P<0/05$ ). در مسمومیت گردش خون، سدیم فلوراید سبب لیز شدن هموگلوبین شده در نتیجه ظرفیت حمل اکسیژن کاهش می‌یابد و سلول دچار هیپوکسی و مرگ می‌گردد. با لیز شدن هموگلوبین، ترکیبات موجود در ساختار آن به داخل خون می‌ریزد. از سویی با تضعیف مغز استخوان، تولید لکوسیت‌ها و اریتروسیت‌ها را در بدن فلج کرده و سبب مرگ سلول در اثر نرسیدن اکسیژن به سلول‌ها می‌گردد که به دنبال آن زنجیره تنفسی سلول قطع می‌گردد و سلول می‌میرد (۲۳). نارینجین در گردش خونی نیز تاثیر بسیار خوبی از خود نشان داد. تاثیر این ترکیب در این تست نیز کاملاً وابسته به دوز بود. در دوز ۵ mg/kg زمان مرگ را از ۱۰/۱۷±۰/۳۴ برای گروه کنترل به ۱۳/۸۳±۱/۷۸ دقیقه رساند که این افزایش اختلاف معنی‌داری با کنترل منفی داشت ( $P<0/01$ ). با دوز بالاتر، ۱۰ mg/kg زمان زنده ماندن را ۵/۷ دقیقه افزایش داد ( $P<0/0001$ ). در دوز ۲۰ mg/kg نیز زمان بقاء موش‌ها حدود ۶ دقیقه افزایش یافت ( $P<0/0001$ ). نارینجین نیز اثر بسیار قوی و بالایی در این تست از خود نشان داد. تمامی این اثرات وابسته به دوز بود. نارینجین در دوز ۵ mg/kg زمان زنده ماندن موش‌ها را ۲ دقیقه افزایش داد، اما این افزایش زمان بقاء از نظر آماری معنی‌دار نبود. در دوز ۱۰ mg/kg به‌طور معنی‌داری زمان مرگ را ۳/۲ دقیقه افزایش داد ( $P<0/01$ ). با افزایش دوز به ۲۰ mg/kg مرگ ۴/۳ دقیقه افزایش یافت ( $P<0/001$ ). پروپرانولول در دوز ۳۰ mg/kg زمان بقاء را حدود ۵/۷ دقیقه افزایش

داد و به  $15/91 \pm 1/16$  رساند ( $P < 0/0001$ ). نارینجین در دوز  $5 \text{ mg/kg}$  و نارینجین در دوز  $10 \text{ mg/kg}$  اثری مشابه پروپرانولول از خود نشان دادند (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲: فعالیت آنتی هایپوکسی نارینجین (Gin) و نارینجین (Genin) در مدل گردش خونی  
 $P < 0/01$  : \*\* , not significant  $P > 0/05$  : ns  
 $P < 0/0001$  : \*\*\*\* ,  $P < 0/0001$  : \*\*\*\*

ایجاد تنفس سریع و زیاد در پاسخ به نوراپی نفرین هستند. پروپرانولول پاسخ به نوراپی نفرین و هم چنین هیپوکسی را مهار می کند (۲). نشان داده شده است که پروپرانولول از عضله قلب در برابر اثرات هیپوکسی و ایسکمی محافظت می کند. عضله قلب در پاسخ به هیپوکسی، کاتکول آمین ها را آزاد می کند که حساسیت عضله قلب را به کمبود اکسیژن افزایش می دهند. پروپرانولول از این عمل جلوگیری می کند. پروپرانولول با حفظ فسفوریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری مانع از افزایش سرعت تجمع یون کلسیم در شرایط هیپوکسی شده و بدین ترتیب فعالیت محافظتی خود را اعمال می کند (۲). نشان داده شده است که نارینجین اثر اینوتروپیک منفی در غلظت های بالا  $3 \text{ میلی مولار}$  نشان می دهد (۹). این اثر می تواند در افزایش زمان مرگ بر اثر هیپوکسی مفید باشد. مدل هیپوکسی خفگی یکی از مدل هایی است که شرایط کمبود اکسیژن را در سلول شبیه سازی می کند. در مدل خفگی، فسی توئین میزان فعالیت سلولی و اکسیژن و ATP مصرفی را کم تر و مقاومت در برابر هیپوکسی را بیش تر می نماید. از آن جا که عملکرد مغز در پستانداران به پیوستگی تهیه اکسیژن و گلوکز بستگی دارد، هنگامی که در تهیه یکی از این عوامل اختلال حاصل شود، این عملکرد به سرعت مختل می گردد (۲۴). گزارش یک مطالعه نشان می دهد که نفوذپذیری نارینجین نشان دهنده توانایی آن برای عبور از سد خونی مغزی در داخل بدن است (۱۵). پس انتظار دیدن اثرات مغزی از این ترکیبات منطقی است.

نارینجین اثر بسیار خوبی در مدل هیپوکسی خفگی نشان داد. در پایین ترین دوز تجویز شده،  $5 \text{ mg/kg}$  زمان مرگ را از  $19/20 \pm 0/81$  دقیقه برای گروه کنترل به  $26/45 \pm 1/99$  دقیقه افزایش داد ( $P < 0/0001$ ). در دوز  $10 \text{ mg/kg}$  زمان مرگ  $10$  دقیقه اضافه شد و به  $29$  دقیقه رسید ( $P < 0/0001$ ) و در دوز  $20 \text{ mg/kg}$  زمان بقاء باز هم افزایش یافت و به  $30/89 \pm 2/34$  دقیقه رسید ( $P < 0/0001$ ). نارینجین نیز اثر بسیار خوبی در این تست از خود نشان

در نتایج به دست آمده در تحقیقات قبلی، روتین در  $20 \text{ mg/kg}$  موجب افزایش زمان بقای موش ها از  $9/82$  دقیقه به  $13/92$  شد ( $P < 0/05$ ). کلروژنیک اسید در دوز  $100 \text{ mg/kg}$  زمان مرگ را به  $12/76$  دقیقه افزایش داد، اما حتی این افزایش هم از نظر آماری معنی دار نبود ( $P < 0/05$ ) (۲۰). کوجیک اسید در دوز  $62/5 \text{ mg/kg}$  بسیار موثر بود و موجب زنده ماندن موش ها تا  $16/76$  دقیقه گردید ( $P < 0/0001$ ) (۲). بتائین در  $25 \text{ mg/kg}$  اثری از خود نشان نداد، اما در دوز  $50 \text{ mg/kg}$  زمان زنده ماندن موش ها را از  $12/11$  دقیقه به  $15/29$  دقیقه افزایش داد ( $P < 0/05$ ) (۲۱). فولیک اسید در دوز  $20 \text{ mg/kg}$  زمان زنده ماندن را  $2/4$  دقیقه ( $P < 0/01$ ) و در  $40 \text{ mg/kg}$   $3/4$  دقیقه ( $P < 0/0001$ ) افزایش داد. فولیک اسید در دوز  $10 \text{ mg/kg}$  اثری معادل پروپرانولول داشت ( $P > 0/05$ ) (۲۳). در این دو تست از پروپرانولول به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در پستانداران، کاتکول آمین ها به ویژه نوراپی نفرین بر گیرنده های شیمیایی کاروتید که به اکسیژن حساس هستند، اثر می گذارند. این گیرنده ها مسئول

و در ۲۵ mg/kg به ۳۸/۴۸ دقیقه افزایش داد ( $P < 0.05$ ) (۲۱). فولیک اسید تنها در دوز ۴۰ mg/kg زمان مرگ را از به طور معنی داری طولانی نمود (۴/۵ دقیقه،  $P < 0.001$ ) (۲۲).

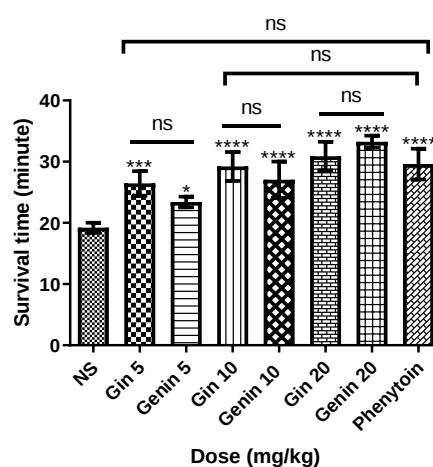
نتایج حاصل از این تحقیق به خوبی اثرات آنتی هیپوکسی را در این دو ترکیب نشان داد. این فعالیت می تواند اثرات گزارش شده قبلی نارینجین و نارینجین را در ایسکمی / ری پرفیوژن تایید کند.

فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان عمدتاً بواسطه حضور ترکیبات فنلی از قبیل فنل و فلاونوئید هاست (۲۵). دو ترکیب مورد بررسی در این تحقیق هم جزو همین ترکیبات بوده بنابراین انتظار میرفت براساس وجود فعالیت خوب آنتی اکسیدانی، شاهد بروز فعالیت آنتی هیپوکسی خوبی نیز از آن ها باشیم چرا که آنتی اکسیدان ها به عنوان آنتی هیپوکسی مطرح شده اند (۱). نتایج تحقیق حاضر می تواند به عنوان مکانیسم عمل احتمالی این ترکیبات در ایسکمی / ری پرفیوژن در نظر گرفته شود. در انجام این کار می شد یکی از فاکتورهای اصلی نشان دهنده هایپوکسی مانند ارزیابی مقدار اشباع اکسیژن یا سطح خونی فاکتور القا شده با هایپوکسی را سنجید و نتایج آن به نتایج حاصل از این هایپوکسی اضافه کرد. در خصوص تحقیق حاضر، عملاً بودجه لازم و زمان کافی برای انجام این آزمایشات وجود نداشت. این موضوع به عنوان محدودیت مطالعه ذکر می شود و پیشنهاد می شود سایر محققان در هنگام انجام تحقیقات مشابه، این موارد را مد نظر قرار دهند. پیشنهاد می شود ارزیابی فعالیت آنتی هیپوکسی این ترکیبات در مدل های دیگر هایپوکسی مانند هایپوکسی هیپوباریک سنجیده شود. هم چنین پیشنهاد می گردد فاکتورهای اکسیداتیو استرس در سطح سلولی در این مدل هایپوکسی مورد بررسی قرار گیرد.

## سپاسگزاری

این مقاله حاصل دو پایان نامه دانشجویی می باشد که بدین وسیله از حمایت مالی معاونت پردیس رامسر تشکر می گردد.

داد. در پایین ترین دوز تست شده، ۵ mg/kg، زمان مرگ موش ها را ۴/۲ دقیقه افزایش داد ( $P < 0.05$ ). در دوز ۱۰ mg/kg، زمان مرگ را به  $27/05 \pm 2/96$  دقیقه افزایش داد ( $P < 0.001$ ). در دوز ۲۰ mg/kg اثر فوق العاده ای از خود نشان داد و زمان مرگ را ۱۴ دقیقه افزایش داد ( $P < 0.001$ ). زمان زنده ماندن در گروه های دریافت کننده فنی توئین ۲/۵۱ ۲۹/۶۰ دقیقه بود ( $P < 0.001$ ). نارینجین در دوز ۵ و نارینجین در دوز ۱۰ mg/kg اثری مشابه فنی توئین ایجاد کردند ( $P > 0.05$ ) (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۳: فعالیت آنتی هایپوکسی نارینجین (Gin) و نارینجین (Genin) در مدل خفگی

ns:  $P > 0.05$  not significant,  $P < 0.05$  \*\*,  $P < 0.001$  \*\*\*\*,  $P < 0.001$  \*\*\*\*

در نتایج به دست آمده در تحقیقات قبلی، روتین در دوز ۱۰ mg/kg موجب افزایش زمان بقای موش ها از ۱۳/۲۰ دقیقه به ۲۷/۱۰ شد ( $P < 0.01$ ). در دوز ۲۰ mg/kg، این زمان به ۲۹/۸۰ رسید ( $P < 0.01$ ). کلروژنیک اسید نیز در دوز ۲۰ mg/kg زمان مرگ را به ۲۵/۷۲ دقیقه افزایش داد ( $P < 0.01$ ) (۲۰). کوچک اسید در دوز ۶۲/۵ mg/kg تاثیری بر زمان مرگ نداشت، اما در دوز ۱۲۵ mg/kg زمان مرگ را بیش از دو برابر نمود (از ۲۰/۰۴ دقیقه به ۴۳/۸۶ دقیقه،  $P < 0.01$ ) (۲). بتائین اثر بسیار خوبی در این مدل نشان داد. در دوز ۱۲/۵ mg/kg، زمان مرگ را از ۲۸/۲۰ دقیقه برای گروه کنترل به ۳۵/۰۵ دقیقه ( $P < 0.05$ )

## References

1. Barani A, Motafeghi F, Eghbali M, Mansourian D, Mirzaalilou S, Dadollahi Sarab P, Ebrahimzadeh MA. Evaluation of antihypoxic activities of Feijoa sellowiana, Nepetapogonosperma and Cucumis melo in mice. *J Mazandaran Uni Med Sci* 2023; 33(226): 14-27 (Persian).
2. 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* 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 Pract* 2021; 75(6): e13943.
4. Bharti S, Rani N, Krishnamurthy B, Arya DS. Preclinical evidence for the pharmacological actions of naringin: a review. *Planta Med* 2014; 80(06): 437-451.
5. Salehi B, Fokou PV, Sharifi-Rad M, Zucca P, Pezzani R, Martins N, Sharifi-Rad J. The therapeutic potential of naringenin: a review of clinical trials. *Pharmaceuticals* 2019; 12(1): 11.
6. Alam MA, Subhan N, Rahman MM, Uddin SJ, Reza HM, Sarker SD. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. *Adv Nutr* 2014; 5(4): 404-417.
7. Uçar K, Göktas Z. Biological activities of naringenin: A narrative review based on in vitro and in vivo studies. *Nutr Res* 2023; 119: 43-55.
8. Adetunji JA, Fasae KD, Awe AI, Paimo OK, Adegoke AM, Akintunde JK, et al. The protective roles of citrus flavonoids, naringenin, and naringin on endothelial cell dysfunction in diseases. *Heliyon* 2023; 9(6): e17166.
9. dos Santos LR, Souza DS, Mesquita TR, Dantas C, Araujo AM, de Cerqueira SV, et al. Naringin promotes positive inotropism in atrial tissue through  $\beta$ -AR/PKA-dependent pathway. *Scientia Plena* 2023; 19(2): 024901.
10. Akhlaghi M, Bandy B. Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 46(3): 309-317.
11. Testai L, Martelli A, Marino A, D'antongiovanni V, Ciregia F, Giusti L, et al. The activation of mitochondrial BK potassium channels contributes to the protective effects of naringenin against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Biochem Pharmacol* 2013; 85(11): 1634-1643.
12. Singh D, Chopra K. The effect of naringin, a bioflavonoid on ischemia-reperfusion induced renal injury in rats. *Pharmacol Res* 2004; 50(2): 187-193.
13. Gaur V, Aggarwal A, Kumar A. Protective effect of naringin against ischemic reperfusion cerebral injury: possible neurobehavioral, biochemical and cellular alterations in rat brain. *Eur J Pharmacol* 2009; 616(1-3): 147-154.
14. Pan J, Meng L, Li R, Wang Z, Yuan W, Li Y, et al. Naringenin protects against septic cardiomyopathy in mice by targeting HIF-1 $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Commun* 2024; 149613.
15. Li L, Lin Z, Yuan J, Li P, Wang Q, Cho N, et al. The neuroprotective mechanisms of naringenin: Inhibition of apoptosis through the PI3K/AKT pathway after hypoxic-ischemic brain damage. *J Ethnopharmacol* 2024; 318: 116941.

16. Gu L, Wang F, Wang Y, Sun D, Sun Y, Tian T, et al. Naringin protects against inflammation and apoptosis induced by intestinal ischemia-reperfusion injury through deactivation of cGAS-STING signaling pathway. *Phytother Res* 2023; 37(8): 3495-3507.
17. de Araujo AM, de Cerqueira SV, de Menezes-Filho JE, Heimfarth L, Matos KK, Mota KO, et al. Naringin improves post-ischemic myocardial injury by activation of KATP channels. *Eur J Pharmacol* 2023; 958: 176069.
18. Hock F. Effects of cromakalim on sodium nitrite intoxication. *Proceedings of the 21st Göttingen Neurobiology Conference*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 1993, 681.
19. Schindler U, Rush D K, Fielding S. Nootropic drugs: Animal models for studying effects on cognition. *Drug Development Research* 1984; 4(5): 567-576.
20. Modammadyan M, Motafeghi F, Eghbali M, Ebrahimzadeh MA. Antihypoxic activities of coenzyme Q and folic acid in asphyctic, hemic, and circulatory hypoxia models in mice. *J Mazandaran Uni Med Sci* 2023; 33(221): 126-31 (Persian).
21. Imaizumi S, Suzuki J, Kinouchi H, Yoshimoto T. Superior protective effects of phenytoin against hypoxia in a pharmacological screening test. *Neurol Res* 1988; 10(1): 18-24.
22. Masoomzadeh F, Khan BA, Alshahrani SM, Alqahtani A, Ebrahimzadeh MA, Khalili M. Protective effects of rutin and chlorogenic acid against antihypoxic conditions in mice. *Pak J Pharm Sci* 2021; 34(5): 1679-1683.
23. Eghbali M, Barani A, Rezapour N, Ebrahimzadeh MA. Antihypoxic activities of betaine in asphyxia, haemic and circulatory hypoxia models in mice. *J Mazandaran Uni Med Sci* 2023; 33(223): 119-124 (Persian).
24. Moriuchi H, Yuizono T. Pentoxifylline prevents a decrease in arterial oxygen tension in oleic acid-induced lung injury. *Crit Care Med* 1995; 23(2): 357-364.
25. Nabavi SM, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Bahramian F. In vitro antioxidant activity of *Phytolacca americana* berries. *Pharmacologyonline* 2009; 1: 81-88.