

Impact of Extraction Methods on Polyphenol Contents and Antioxidant Activities of *Melissa Officinalis* and Evaluation of Their Antihypoxic Activities in Mice

Ali Mirzazadeh^{1,2}
 Mohammad Hossein Hosseinzadeh³
 Mohammad Eghbali³
 Mohammad Ali Ebrahimzadeh^{4,2}
 Omran Habibi^{5,2}
 Ahmad Ramezani⁶
 Amin Barani⁷

¹ Pharmacy Student, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ PharmD, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

⁴ Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Associate Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁶ Clinical Pharmacist, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁷ Ph.D Student of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received January 2, 2023; Accepted March 2, 2024)

Abstract

Background and purpose: The role of free radicals in causing many diseases has been well proven. These particles can destroy biomolecules. Antioxidants can prevent these harmful effects. Considering that plants are a source of natural antioxidants, research in this field is increasing. Hypoxia means the reduction of oxygen in the body tissues, which can lead to dysfunction of the body. Hypoxia causes a significant increase in reactive oxygen species, thus, antioxidants are considered anti-hypoxia. *Melissa officinalis* L. is a well-known medicinal plant of Lamiaceae. Leaves of this plant have been widely used for the treatment of cardiovascular and respiratory problems and as a memory enhancer. This investigation was carried out to examine the impact of extraction on total phenolic contents and antioxidant activities of *M. officinalis* aerial parts. In addition, the Antihypoxic activities of all extracts were evaluated in three models in mice.

Materials and methods: In this experimental study, dried aerial parts were extracted by three different methods, i.e. maceration method, ultrasonic-assisted, and soxhlet-assisted extraction. Antioxidative capacity was assessed by utilizing DPPH free radicals scavenging and reducing power. The total phenolic and flavonoid contents were also determined. The protective effects of extract in the initial dose of 62.5-250 mg/kg were evaluated against hypoxia-induced lethality in mice by three experimental models of hypoxia, i.e. asphyctic, haemic, and circulatory. The latencies for death for mice in minutes were recorded. The Institutional Animal Ethical Committee of Mazandaran University of Medical Sciences 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. Analysis of variance was performed followed by Newman-Keuls multiple comparisons (by GraphPad Prism 8) were used to determine the differences in means.

Results: Meceration method and ultrasonic($P<0.0001$) assisted extraction were the best methods for extraction of polyphenols. In DPPH radical scavenging activity, soxhlet-assisted extraction and extraction by the meceration method were more efficient than ultrasonic-assisted extraction($P>0.05$). In the hemic model, none of the extracts showed any activity. Even the soxhlet-assisted extract at the dose of 250 mg/kg, even though it increased the death time by about one minute, could not cause a significant effect($P>0.05$). In the circulatory model, none of the extracts showed any effect at the lowest tested dose i.e. 62.5 mg/kg but all the extracts showed a very potent activity at higher doses. All the extracts at a dose of 250 mg/kg showed a much stronger effect than propranolol 30 mg/kg. In the asphyctic model, all the extracts showed very good effects so we had to reduce the dosage many times. The extract obtained from the maceration method at a dose of 1.95 mg/kg and ultrasonic-assisted and soxhlet assisted extracts at the dose of 7.81 mg/kg showed the same activity as phenytoin($P>0.05$).

Conclusion: The findings of the current study indicated that extraction methods significantly affect antioxidant capacities and total phenolic contents. The ultrasonic-assisted extraction and maceration method were the most suitable methods for extracting phenolic and flavonoid compounds from this plant. All extracts showed high antioxidant activities. All extracts showed very strong effects in the asphyctic model.

Keywords: *Melissa officinalis*, Extraction methods, Antioxidant, Antihypoxia, Asphyctic hypoxia, Circulatory hypoxia, haemic hypoxia

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 34 (231): 22-37 (Persian).

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

اهمیت روش استخراج بر محتوای پلی فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی بادرنجبویه و ارزیابی فعالیت آنتی هیپوکسی آن‌ها در موش سوری

علی میرزازاده^{۱*}
محمد حسین حسین زاده^۳
محمد اقبالی^۳
محمد علی ابراهیم زاده^{۲*}
دکتر عمران حبیبی^{۲*}
احمد رمضانی^۶
امین بارانی^۷

چکیده

سابقه و هدف: نقش رادیکال‌های آزاد در ایجاد بسیاری از بیماری‌ها به خوبی اثبات شده است. این ذرات توانایی تخریب بیومولکول‌ها را دارند. آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند مانع از این اثرات زیان آور شوند. نظر به این که گیاهان منبع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشد تحقیقات در این زمینه رو به افزایش است. هیپوکسی به معنای کاهش اکسیژن موجود در بافت‌های بدن بوده که می‌تواند به اختلال در عملکرد بدن منجر شود. هیپوکسی موجب افزایش قابل ملاحظه ذرات فعال اکسیژن می‌گردد، پس آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان آنتی‌هیپوکسی مطرح می‌باشند. بادرنبویه (*Melissa officinalis* L.) گیاه دارویی شناخته شده از خانواده Lamiaceae بوده که برای درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله قلبی عروقی و در مشکلات تنفسی و همچنین به عنوان تقویت کننده حافظه مورد استفاده می‌گیرد. این مطالعه به منظور بررسی تأثیر روش استخراج بر محتوای تام فنلی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه طراحی شده است. فعالیت آنتی هیپوکسی تمامی عصاره‌ها در سه مدل در موش بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، اندام هوایی خشک شده بادرنبویه به سه روش ماسیراسیون، با کمک سوکسله و با کمک امواج التراسونیک با حلال متانول عصاره گیری شدند. فعالیت آنتی اکسیدانی تمامی عصاره‌ها با روش بدام اندازه‌گیری رادیکال آزاد DPPH و تست احیا کنندگی ارزیابی شد. محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی تعیین گردید. اثر محافظتی عصاره‌ها در دوزهای اولیه ۶۲/۵-۲۵۰ 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. کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران نیز پروتکل آزمایشی را تایید کرد. در تست هیپوکسی خفگی، فنی توئین (۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم، داخل صفاقی) و در دو تست بعدی پروپرانولول (۲۰ و ۳۰ میلی گرم بر کیلو گرم، داخل صفاقی) به عنوان کنترل مثبت به کار رفتند. در تمامی تست‌ها، نرمال سالین به عنوان کنترل منفی به کار گرفته شد. آنالیز واریانس یک سویه و متعاقب آن نیومن کولز با کمک نرم افزار گراف پد پریم ۸ به منظور تعیین اختلاف بین میانگین‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: برای استخراج ترکیبات پلی فنلی، روش خیساندن و عصاره گیری به روش التراسونیک ($P < 0.001$) و در تست بدام اندازه‌گیری رادیکال آزاد DPPH عصاره‌های حاصل از روش سوکسله و خیساندن موثر از روش دیگر بودند. در تست قدرت احیا کنندگی، تمامی عصاره فعالیت بالایی از خود نشان دادند ($P > 0.05$). در مدل خونی، هیچ یک از عصاره‌ها اثری از خود نشان ندادند. حتی عصاره حاصل از روش سوکسله در دوز ۲۵۰ mg/kg، علی‌رغم این که زمان مرگ را حدود یک دقیقه افزایش داد، نتوانست تغییر معنی‌داری ایجاد کند ($P > 0.05$). در مدل گردش خونی، هیچ یک از عصاره‌ها در پایین‌ترین دوز تست شده یعنی ۶۲/۵ mg/kg اثری از خود نشان ندادند اما تمامی عصاره‌ها در دوزهای بالاتر اثر بسیار قوی از خود نشان دادند. تمامی عصاره‌ها در دوز ۲۵۰ mg/kg اثری به مراتب قوی‌تر از پروپرانولول ۳۰ mg/kg از خود نشان دادند. در مدل خفگی، تمامی عصاره‌ها اثرات بسیار خوبی از خود نشان دادند به گونه‌ای که بارها مجبور به کاهش دوز شدیم. عصاره حاصل از روش خیساندن در دوز ۱/۹۵ mg/kg و عصاره‌های حاصل از روش سوکسله و روش التراسونیک در دوز ۷/۸۱ mg/kg اثری مشابه فنی توئین از خود نشان داد ($P > 0.05$).

استنتاج: باتوجه به نتایج این مطالعه مشخص شد که روش استخراج تأثیر زیادی بر فعالیت آنتی اکسیدانی و محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی دارد. روش استخراج با کمک التراسونیک و روش خیساندن به ترتیب مناسب‌ترین روش‌ها برای استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی از این گیاه بود. تمامی عصاره‌ها اثرات آنتی‌اکسیدانی بالایی نشان دادند. عصاره‌ها اثر بسیار خوبی در تست خفگی از خود نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: بادرنبویه، روش استخراج، آنتی اکسیدان، آنتی هیپوکسی، هیپوکسی خفگی، هیپوکسی گردش خونی، هیپوکسی خونی

مؤلف مسئول: محمد علی ابراهیم زاده - ساری، کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، مرکز تحقیقات علوم دارویی E-mail: zadeh20@gmail.com

۱. دانشجوی داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۲. دانشگاه داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۳. دکتر داروساز، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۴. استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۵. دانشیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۶. متخصص داروسازی بالینی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۷. دستیار شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
- * تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۱۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۱۰/۱۳ تاریخ تصویب: ۱۴۰۲/۱۲/۱۲

مقدمه

نقش رادیکال‌های آزاد در ایجاد بسیاری از بیماری‌ها به خوبی اثبات شده است. برخی واکنش‌های بیوشیمیایی در بدن اکسیژن فعال تولید نموده که توانایی تخریب بیو مولکول‌ها را دارند. آنتی اکسیدان‌ها می‌توانند مانع از این اثرات زیان‌آور شوند. این مواد موجب به دام اندازی رادیکال‌های آزاد شده و بدین وسیله موجب رفع سمیت می‌شوند. غذاهای غنی از آنتی اکسیدان‌ها نقش مهمی در پیشگیری از بیماری‌های قلبی - عروقی، سرطان، بیماری‌های دژنراتیو مانند پارکینسون و الزایمر بازی می‌کنند. نظر به این که گیاهان منبع آنتی اکسیدان‌های طبیعی می‌باشد، تحقیقات در این زمینه رو به افزایش است (۱،۲). هیپوکسی به معنای کاهش اکسیژن موجود در بافت‌های بدن بوده که می‌تواند به اختلال در عملکرد بدن منجر شود و ممکن است باعث ناهنجاری‌های فیزیولوژیکی مختلف گردد. هیپوکسی با پاتولوژی بیماری قلبی - عروقی و سکتة مغزی مرتبط بوده و منجر به مرگ می‌شود (۳). هیپوکسی موجب افزایش قابل ملاحظه ذرات فعال اکسیژن می‌گردد، پس آنتی اکسیدان‌ها به عنوان آنتی هیپوکسی مطرح می‌باشند (۴). اخیراً از چندین گیاه با اثرات آنتی اکسیدانی بالا، فعالیت آنتی هیپوکسی جالبی گزارش شده است (۵،۶).

بادرنجبویه با نام علمی *Melissa officinalis* L. یک گیاه دارویی شناخته شده از خانواده Lamiaceae است. بیش از ۲۰۰۰ سال است که از برگ‌های معطر این گیاه در آشپزی برای طعم دادن به غذاها استفاده می‌شود. در طب سنتی از این گیاه برای درمان بیماری‌های روانی و CNS، مشکلات قلبی عروقی و تنفسی، انواع سرطان‌ها و به عنوان تقویت کننده حافظه، قلب، ضد افسردگی و خواب‌آور استفاده می‌شود (۷). در حال حاضر این گیاه در سراسر جهان کشت می‌گردد. در ایران نیز از جمله گیاهان بومی شمال ایران است و عموماً قسمت بالای زمین (اندام هوایی) به طور سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از آن‌ها عمدتاً می‌توان دم کرده، چای یا جوشانده تهیه کرد. مهم ترین

دسته ترکیبات موجود در گیاه، آلکالوئیدها، تانن‌ها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها و ترکیبات فنلی هستند (۸-۱۰). تنوع این مولکول‌های زیست فعال آن‌ها را به یک نامزد امیدوارکننده برای توسعه مواد مغذی و آرایشی تبدیل می‌کند (۹). رزمارینیک اسید، اسید اورسولیک و اسید اولئانولیک از اندام‌های هوایی بادرنجبویه جدا شده است (۱۱). اسید کافیک، اسید پاراکوماریک و ترکیبات فعال آنتی اکسیدانی، در برگ خشک بادرنجبویه شناسایی و تعیین مقدار شده است (۱۲،۱۳). برگ‌ها حاوی اسید گالیک، اسید کلروژنیک، اسید کافیک، اسید رزمارینیک، اسید الازیک، روتین، ایزوکورسیتین، کوئرستین و کامفرول هستند (۱۴). بادرنجبویه دارای خواص آنتی اکسیدانی قوی می‌باشد. علی‌رغم فعالیت خوب آنتی اکسیدانی، فعالیت آنتی هیپوکسی از این گیاه گزارش نشده است. در این تحقیق از اندام هوایی بادرنجبویه استفاده شد. با توجه به این که چندین روش برای تهیه عصاره گیاهی وجود دارد و هر روش در مقایسه با دیگر روش‌ها از محدودیت‌ها و مزایای منحصر به فرد برخوردار می‌باشد، در سال‌های اخیر توجه فراوانی به ارائه روش‌های جدید استخراج شده است به گونه‌ای که بیشترین اجزای اصلی در کوتاه‌ترین زمان ممکن با کمترین قیمت به دست آید (۲).

در این تحقیق عمل استخراج با روش کلاسیک (ماسیراسیون)، استفاده از حمام التراسوند و هم‌چنین با روش سوکسله انجام شده است. میزان تام‌فنلی و فلاونوئیدی عصاره‌های حاصل سنجیده شد و سپس فعالیت آنتی اکسیدانی آن‌ها با یکدیگر مقایسه گردید. در نهایت فعالیت آنتی هیپوکسی تمامی عصاره‌ها در سه روش مختلف (Circulatory، Haemic، و Asphyctic) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه گیاهی

در این مطالعه تجربی، اندام هوایی گیاه بادرنجبویه

از باغ گیاهان دارویی بهدیس (بهشهر) خریداری و توسط دکترای سیستماتیک گیاهی (آقای دکتر بهمن اسلامی) تایید شد. اندام هوایی به قطعات ریز تبدیل شد و سپس در آون در دمای ۴۰ درجه برای مدت سه روز خشک گردید. در نهایت عصاره گیری با روش های، خیساندن، اولتراسونیک و سوکسله با استفاده از متانول خالص انجام شد.

تهیه عصاره به روش خیساندن

در این روش ۱۰ گرم از برگ خشک گیاه با ۴۰ میلی لیتر متانول مخلوط شد. مجموعه به مدت ۲۴ ساعت رها گردید. روز بعد فاز آلی (متانول) جدا و مجدداً حلال جدید اضافه شد. این عمل برای سه بار تکرار شد. در روز آخر، مجموعه حلال آلی توسط دستگاه تبخیر کننده چرخان حذف گردید (۲،۱).

تهیه عصاره به روش اولتراسونیک

در این روش، از امواج غیر مستقیم اولتراسونیک با فرکانس ۶۰ کیلو هرتز در دمای محیط به مدت یک ساعت استفاده شد. ۱۰ گرم برگ ریز شده گیاه به همراه ۴۰ میلی لیتر حلال متانول در بشر قرار داده شد. مجموعه به مدت یک ساعت در حمام اولتراسونیک قرار گرفت. سپس محلول صاف گردید و متانول به دست آمده توسط دستگاه تبخیر کننده چرخان حذف گردید (۱۵،۱).

تهیه عصاره به روش سوکسله

در این روش ۱۰ گرم برگ ریز شده گیاه در کاغذ صافی قرار داده شد و سپس در دستگاه قرار گرفت. عمل استخراج با حلال متانول به مدت ۶ ساعت ادامه پیدا کرد سپس متانول حاوی مواد استخراج شده توسط دستگاه تبخیر کننده چرخان حذف گردید (۱۵،۱).

تعیین محتوای کلی فنولی و فلاونوئید

سنجش محتوای ترکیبات فنولی از طریق متد فولین سیو کالتیو صورت پذیرفت. غلظت ۱ mg/ml از هر

عصاره تهیه شد. ۰/۵ میلی لیتر از هر عصاره با ۲/۵ میلی لیتر واکشنر ۰/۲ نرمال فولین سیو کالتیو مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه هم زده شد. سپس ۲ میلی لیتر محلول کربنات سدیم با غلظت ۷۵ گرم در لیتر اضافه شد. جذب نمونه ها پس از ۲ ساعت در دمای اتاق توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ماوراء بنفش در ۷۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. نتایج به صورت مقادیر هم ارز با استاندارد اسید گالیک بیان شد. بدین صورت که میانگین جذب حاصل در معادله خط به دست آمده از ترسیم منحنی استاندارد گالیک اسید قرار داده شد و نتیجه به عنوان محتوای تام فنولی عصاره به صورت میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره گزارش شد. آزمایشات برای هر عصاره و استاندارد ۳ بار تکرار شد (۱۶). میزان محتوای فلاونوئید هر عصاره از طریق روش رنگ سنجی ارزیابی شد. غلظت ۱ mg/ml از هر عصاره تهیه شد. ۰/۵ میلی لیتر از نمونه در ۱/۵ میلی لیتر متانول حل شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد به آن اضافه شد، سپس ۰/۱ میلی لیتر از محلول پتاسیم استات ۱ مولار و در نهایت ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر هم به آن اضافه شد. به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و سپس جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی-ماوراء بنفش اندازه گیری شد. کوئرستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید به صورت میلی گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره گزارش گردید. آزمایشات ۳ بار تکرار شد و میانگین آن ها گزارش شد (۱۶).

ارزیابی میزان توانایی به دام اندازی رادیکال DPPH

برای انجام این آزمایش از رادیکال های پایدار DPPH استفاده شد. به ۱ میلی لیتر از هر عصاره ۱ میلی لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH اضافه شد و مخلوط حاصل به خوبی تکان داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک قرار داده شد. سپس جذب مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV در ۵۱۷ نانومتر با بلانک متانول

قرائت شد. BHA به عنوان استاندارد استفاده شدند و میزان IC₅₀ به معنی غلظتی از هر عصاره که لازم است تا ۵۰ درصد رادیکالها پاکسازی شوند، برای عصارهها تعیین شد. در نهایت درصد به دام اندازی رادیکال DPPH طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\left(\frac{A_B - A_S}{A_B} \right) \times 100$$

A_B = جذب بلانک،

A_S = جذب نمونه یا استاندارد (۱۷)

تعیین قدرت احیاء کنندگی

میزان قدرت احیاء کنندگی عصارهها از طریق متد گزارش شده قبلی ارزیابی شد. غلظت های مختلف از هر عصاره تهیه شد و با ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH ۶/۵ و ۲/۵ میلی لیتر محلول ۱ درصد پتاسیم فری سیانید [K₃Fe(CN)₆] مخلوط شد. در دمای ۵۰ درجه به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد، سپس ۲/۵ میلی لیتر از محلول تری کلرواستیک اسید به نمونهها اضافه شد تا واکنش متوقف شود. سپس نمونهها به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از اتمام این مرحله ۲/۵ میلی لیتر از قسمت بالای محلول با ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد و ۰/۵ میلی لیتر محلول ۰/۱ درصد فریک کلراید به آن اضافه شد. سپس جذب محلول در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. در این آزمایش آسکوربیک اسید با غلظت های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ µg/ml به عنوان استاندارد استفاده شد. آزمایش برای هر نمونه و استاندارد سه بار تکرار شد (۱۷).

حیوان مورد مطالعه

از موش های سوری نر با سن حدود ۹ تا ۱۰ هفته ای که از بخش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تهیه شده بود، استفاده گردید. گروه های مورد مطالعه که در هر گروه ۵ سر موش

سوری با وزن ۲۵-۲۱ گرم قرار داده شد، در قفس های مجزا تحت وضعیت کنترل شده درجه حرارت (بین ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد) و روشنایی (دوره ای ۱۲ ساعت روشن ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری شد و پلت غذا و آب جهت تغذیه در دسترس آنها قرار گرفت. تمام مراحل آزمایشی مطابق با دستورالعمل های موسسه ملی بهداشت (NIH) در خصوص مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. کمیته اخلاق دانشگاه (کد اخلاق: R.MAZUMS..REC.1398.4975) نیز پروتکل آزمایشی را تایید نمود.

هیپوکسی خفگی

در این تست از دوز اولیه ۶۲/۵ mg/kg از عصاره های حاصل از روش های خسیاندن، سوکسله و التراسونیک استفاده شد و کاهش دوزها تا زمانی که پاسخ درمانی نسبت به کنترل منفی (نرمال سالین) از نظر آماری یکسان گردد، ادامه یافت. ۳۰ دقیقه بعد از تزریق داخل صفاقی دوزهای مورد نظر از هر عصاره، حیوان در یک محفظه شیشه ای در بسته و مهر و موم شده توسط پارافیلیم (به حجم ۳۰۰ ml) قرار گرفت. از آهک به عنوان جاذب CO₂ استفاده شد تا خفگی صرفاً به دلیل کاهش اکسیژن محیط باشد و اسیدوز متابولیک ناشی از افزایش CO₂ در فضای در بسته کوچک، نقشی در مرگ موش ها نداشته باشد. موش ها بر اثر هیپوکسی تشنج گرفته و مردند. اثر ضد هیپوکسی ترکیب به صورت زمان زنده بودن موش بیان گردید. نرمال سالین به عنوان کنترل منفی و فنی توئین (۵۰ mg/kg) به صورت تزریق داخل صفاقی به عنوان کنترل مثبت به کار رفت (۶،۵).

هیپوکسی خونی

از نیتريت سدیم به عنوان عامل ایجاد کننده هیپوکسی استفاده شد. دوزهای ۲۵، ۱۲۵ و ۶۲/۵ mg/kg از عصاره های حاصل از روش های خسیاندن، سوکسله و التراسونیک به کار رفت. ۳۰ دقیقه بعد از تزریق داخل

صفافی دوزهای مورد نظر از هر عصاره به موش، NaNO_2 با دوز 360 mg/kg به صورت داخل صفافی تزریق شد. اثر ضد هیپوکسی به صورت زمان زنده ماندن در مقایسه با گروه کنترل منفی (نرمال سالین) بیان گردید. در این تست پروپرانولول (20 mg/kg) به عنوان کنترل مثبت به کار رفت (۶،۵).

هیپوکسی وابسته به گردش خون

در این روش از سدیم فلورید به عنوان عامل ایجاد کننده هیپوکسی استفاده شد. دوزهای 250 ، 125 و 62.5 mg/kg از عصاره های حاصل از روش های خیساندن، سوکسله و التراسونیک به کار رفت. 30 دقیقه بعد از تزریق داخل صفافی دوزهای مورد نظر از هر عصاره به هر موش، NaF با دوز 150 mg/kg به صورت داخل صفافی تزریق گردید و درصد فعالیت در مقابل کنترل منفی به صورت زمان زنده ماندن در مقایسه با نرمال سالین سنجیده شد. در این تست از پروپرانولول 20 و 30 mg/kg به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۶،۵).

آنالیز آماری

کلیه اطلاعات به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ گزارش شد. آنالیز واریانس یک سویه (ANOVA) و متعاقب آن Newman-Keuls multiple comparisons test برای مقایسه میانگین ها به کار رفت. نتایج با احتمال $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد. برای انجام برنامه های آماری از برنامه گراف پد پریم ۸ (GraphPad Prism 8) استفاده شد. مقادیر IC_{50} از روی رگرسیون خطی بین درصد مهار و غلظت های مربوطه به دست آمد.

یافته ها

بازده عصاره ها

راندمان عصاره گیری به روش اولتراسونیک، $7/5$ ، عصاره گیری به روش خیساندن 12 و عصاره گیری به روش سوکسله $19/4$ درصد به دست آمد. جدول شماره ۱

محتوای تام فنولی و تام فلاونوئیدی موجود در عصاره حاصل از روش خیساندن، عصاره به کمک التراسونیک و عصاره با کمک سوکسله با حلال متانول خالص را نشان می دهد.

جدول شماره ۱: محتوای تام فنولی و تام فلاونوئیدی موجود در عصاره های بادرنجبویه به روش های مختلف استخراج با حلال متانول

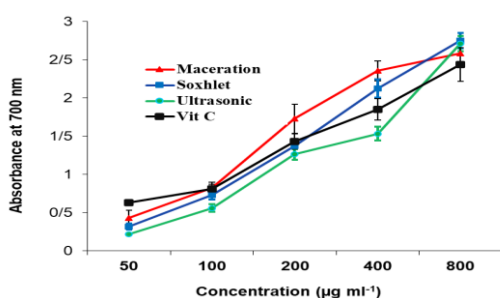
روش استخراج	محتوای فنلی a	محتوای فلاونوئیدی b
روش سوکسله	475.32 ± 10.59	71.02 ± 3.13
روش اولتراسونیک	587.05 ± 8.67 ****	10.39 ± 3.04 ****
روش ماسیراسیون	564.33 ± 6.98 ****	114.38 ± 1.57 ****

a میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره،

b میلی گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره،

ns: not significant ، **** $P < 0.0001$

روش خیساندن و عصاره گیری به روش التراسونیک روش مناسب تر روش برای استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی از این گیاه بود. تأثیر روش استخراج بر درصد به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره های مختلف از بادرنجبویه به صورت مقادیر IC_{50} بیان شده است. بر این اساس، میزان IC_{50} برای روش سوکسله $38/16 \pm 2/05$ ، برای روش اولتراسونیک $44/45 \pm 1/87$ و برای روش ماسیراسیون $38/34 \pm 1/36$ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. در سنجش فعالیت به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH، از BHA به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. مقدار IC_{50} برای BHA $53/9$ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد. تأثیر روش استخراج بر قدرت احیا کنندگی توسط عصاره های مختلف بادرنجبویه در غلظت های مختلف در نمودار شماره ۱ رسم شده است.



نمودار شماره ۱: تأثیر روش استخراج بر میزان قدرت احیا کنندگی عصاره های اندام هوایی بادرنجبویه

تمامی عصاره و ویتامین ث تقریباً در تمامی غلظت‌های تست شده، اثر مشابه ای داشتند ($P > 0.05$) تنها در دوز $400 \mu\text{g/ml}$ عصاره حاصل از ماسیراسیون قوی‌تر از ویتامین ث ($P < 0.05$)، و عصاره حاصل از التراسونیک ضعیف‌تر از تمامی عصاره‌ها بود ($P < 0.05$).

بررسی اثرات آنتی هیپوکسی خونی

نتایج حاصل از تزریق نیتريت سدیم NaNO_2 به میزان 360 mg/kg به دریافت کنندگان عصاره‌های حاصل از روش‌های خسیاندن، سوکسله و التراسونیک در جدول شماره ۲ آمده است. این زمان بر حسب دقیقه بوده و مدت زمانی که موش پس از تزریق دچار تشنج و مرگ می‌شود را گزارش می‌کند.

جدول شماره ۲: فعالیت آنتی هیپوکسی عصاره‌های حاصل از روش‌های خسیاندن، سوکسله و التراسونیک در مدل هیپوکسی خونی در موش سوری نر

ترکیب/روش استخراج	دوز mg/kg	انحراف معیار $\pm$ میانگین (دقیقه)
نرمال سالین	0.5 ml	9.66 ± 0.86
خسیاندن	62.5	9.45 ± 0.30^{ns}
خسیاندن	125	9.43 ± 0.65^{ns}
خسیاندن	250	9.80 ± 0.27^{ns}
سوکسله	62.5	9.58 ± 1.49^{ns}
سوکسله	125	10.10 ± 0.58^{ns}
سوکسله	250	10.59 ± 1.99^{ns}
التراسونیک	62.5	9.88 ± 1.16^{ns}
التراسونیک	125	9.96 ± 1.68^{ns}
التراسونیک	250	10.21 ± 1.19^{ns}
پروپرانولول	20	$16.48 \pm 1.98^{****}$

*: اختلاف نسبت به گروه کنترل نرمال سالین (کنترل منفی)،

$P < 0.0001$ ****،

ns: not significant

هیچ یک از عصاره‌ها در این تست اثری از خود نشان نداد. حتی عصاره حاصل از روش سوکسله که در بالاترین دوز تست شده خود، یعنی 250 mg/kg ، علی‌رغم این که زمان مرگ را حدود یک دقیقه افزایش داد، نتوانست تغییر معنی‌داری ایجاد کند ($P > 0.05$). در این تست پروپرانولول در دوز 20 mg/kg به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. در این دوز، پروپرانولول به طور معنی‌داری زمان مرگ را از 9.66 ± 0.86 دقیقه

برای گروه کنترل به 16.48 ± 1.98 دقیقه افزایش داد ($P < 0.0001$). هر سه عصاره در بالاترین دوز و پایین‌ترین دوز تست شده خود، اثر یکسانی از خود نشان دادند و هیچ اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد ($P > 0.05$).

بررسی اثرات آنتی هیپوکسی وابسته به گردش خون

نتایج حاصل از تزریق سدیم فلوراید به میزان 150 میلی گرم بر کیلوگرم به دریافت کنندگان عصاره‌های حاصل از روش‌های خسیاندن، سوکسله و التراسونیک در جدول شماره ۳ آمده است. این زمان بر حسب دقیقه بیان شده و مدت زمانی که موش پس از تزریق دچار تشنج و مرگ می‌شود را نمایش می‌دهد.

جدول شماره ۳: فعالیت آنتی هیپوکسی عصاره‌های حاصل از روش‌های خسیاندن، سوکسله و التراسونیک در مدل وابسته به گردش خون در موش سوری نر

ترکیب/روش استخراج	دوز mg/kg	انحراف معیار $\pm$ میانگین (دقیقه)
نرمال سالین	0.5 ml	9.22 ± 0.91
خسیاندن	62.5	9.14 ± 1.39^{ns}
خسیاندن	125	$17.82 \pm 2.76^{****}$
خسیاندن	250	$19.59 \pm 0.81^{****}$
سوکسله	62.5	9.29 ± 1.36^{ns}
سوکسله	125	10.32 ± 0.46^{ns}
سوکسله	250	$23.17 \pm 1.91^{****}$
التراسونیک	62.5	9.68 ± 0.81^{ns}
التراسونیک	125	9.86 ± 2.30^{ns}
التراسونیک	250	$18.64 \pm 0.66^{****}$
پروپرانولول	20	$12.76 \pm 0.88^{**}$
پروپرانولول	30	$15.91 \pm 1.77^{****}$

*: اختلاف نسبت به گروه کنترل نرمال سالین (کنترل منفی)،

$P < 0.0001$ ****، $P < 0.001$ **، $P < 0.01$ **،

ns: not significant

هیچ یک از عصاره‌ها در پایین‌ترین دوز تست شده اثری در مدل هیپوکسی گردش خونی از خود نشان ندادند اما تمامی عصاره‌ها در دوزهای بالاتر اثر بسیار قوی در این مدل هیپوکسی از خود نشان دادند. اگرچه عصاره حاصل از روش خسیاندن در پایین‌ترین دوز تست شده، 62.5 mg/kg ، تاثیری بر افزایش بقاء

جدول شماره ۴: فعالیت آنتی هیپوکسی عصاره‌های حاصل از روش‌های خسیانندن، سوکسله و التراسونیک در هایپوکسی خفگی در موش سوری نر

ترکیب/روش استخراج	دوز mg/kg	انحراف معیار $\pm$ میانگین (دقیقه)
نرمال سالین	۰/۵ ml	۲۰/۸۱ $\pm$ ۲/۲۶
خسیانندن	۰/۹۸	۲۰/۵۱ $\pm$ ۱/۷۰ ^{ns}
خسیانندن	۱/۹۵	۲۶/۷۵ $\pm$ ۲/۲۵****
خسیانندن	۳/۹۰	۲۷/۶۹ $\pm$ ۲/۴۲****
خسیانندن	۷/۸۱	۲۸/۳۱ $\pm$ ۱/۹۸****
خسیانندن	۱۵/۶۲	۲۸/۵۳ $\pm$ ۲/۵۵****
خسیانندن	۳۱/۲۵	۳۱/۳۷ $\pm$ ۲/۴۷****
سوکسله	۳/۹۰	۲۱/۲۶ $\pm$ ۱/۹۸ ^{ns}
سوکسله	۷/۸۱	۲۹/۵۴ $\pm$ ۳/۱۸****
سوکسله	۱۵/۶۲	۳۰/۳۰ $\pm$ ۲/۲۴****
سوکسله	۳۱/۲۵	۳۱/۶۰ $\pm$ ۲/۴۴****
التراسونیک	۱/۹۵	۲۱/۲۰ $\pm$ ۲/۳۱ ^{ns}
التراسونیک	۳/۹۰	۲۵/۴۴ $\pm$ ۲/۴۸****
التراسونیک	۷/۸۱	۲۷/۵۶ $\pm$ ۱/۵۵****
التراسونیک	۱۵/۶۲	۲۹/۷۲ $\pm$ ۲/۱۱****
التراسونیک	۳۱/۲۵	۳۲/۱۰ $\pm$ ۱/۹۶****
فنی تونین	۵۰	۲۹/۶۰ $\pm$ ۱/۳۴****

*: اختلاف نسبت به گروه کنترل نرمال سالین (کنترل منفی)،

****: $P < 0.0001$, ***: $P < 0.001$, **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$

ns: not significant

تمامی عصاره‌ها اثرات بسیار خوبی در این مدل هیپوکسی از خود نشان دادند به گونه‌ای که بارها مجبور به کاهش دوز شدیم. عصاره حاصل از روش خسیانندن در دوز ۱/۹۰ mg/kg، تاثیری زیادی بر افزایش بقاء موش‌های سوری داشت و به‌طور معنی‌داری زمان مرگ را از ۲۰/۸۱ $\pm$ ۲/۲۶ دقیقه برای گروه کنترل به ۲۶/۷۵ $\pm$ ۲/۲۵ دقیقه افزایش داد ($P < 0.001$). در دوز ۳/۹۰ mg/kg، اثر بهتری مشاهده شد. در این دوز زمان بقا ۲۷/۶۹ $\pm$ ۲/۴۲ دقیقه بود ($P < 0.0001$). عصاره حاصل از روش سوکسله در دوز ۷/۸۱ mg/kg، به‌طور معنی‌داری زمان مرگ را به ۲۹/۵۴ $\pm$ ۳/۱۸ دقیقه افزایش دادند ($P < 0.0001$). با افزایش دوز به ۳۱/۲۵ mg/kg، زمان زنده ماندن ۲ دقیقه بیش‌تر شد و به ۳۱/۶۰ $\pm$ ۲/۴۳ دقیقه رسید ($P < 0.0001$). عصاره حاصل از روش التراسونیک در دوز ۳/۹۰ mg/kg، به‌طور معنی‌داری زمان مرگ را به ۲۵/۴۴ $\pm$ ۲/۴۸ دقیقه افزایش داد ($P < 0.001$). با هر افزایش دوز به دو برابر، زمان بقاء در موش‌های سوری نر تقریباً ۲ دقیقه افزایش یافت. در دوز ۳۱/۲۵ mg/kg، زمان زنده ماندن به ۳۲/۱۰ $\pm$ ۱/۹۶

موش‌های سوری نداشت در دوز ۱۲۵ mg/kg، به‌طور معنی‌داری زمان مرگ را از ۹/۹۱ $\pm$ ۹/۲۲ دقیقه برای گروه کنترل به ۱۷/۸۲ $\pm$ ۲/۷۶ دقیقه افزایش داد ($P < 0.0001$). در دوز بالاتر، اثر بهتری مشاهده شد. در این دوز زمان بقا ۱۹/۵۹ $\pm$ ۰/۸۱ دقیقه بود ($P < 0.0001$). عصاره‌های حاصل از روش‌های سوکسله و التراسونیک در دوز ۲۵۰ mg/kg، به‌طور معنی‌داری زمان مرگ را به ترتیب به ۲۳/۱۷ $\pm$ ۱/۹۱ و ۱۸/۶۴ $\pm$ ۰/۶۶ دقیقه افزایش دادند ($P < 0.0001$). در این تست پروپرانولول در دوزهای ۲۰ و ۳۰ mg/kg به‌عنوان کنترل مثبت به کار رفت. پروپرانولول در دوز ۲۰، موجب افزایش زمان مرگ در موش‌ها شد (۱۲/۷۶ $\pm$ ۰/۸۸ دقیقه). این افزایش از نظر آماری نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود ($P < 0.01$). پروپرانولول در دوز ۳۰ mg/kg، زمان زنده ماندن موش‌ها را به ۱۵/۹۱ $\pm$ ۱/۷۷ دقیقه افزایش داد ($P < 0.0001$). عصاره حاصل از روش خسیانندن در دوز ۱۲۵ mg/kg اثری مشابه پروپرانولول ۳۰ mg/kg از خود نشان داد ($P > 0.05$). تمامی عصاره‌ها در دوز ۲۵۰ mg/kg اثری به مراتب قوی‌تر از پروپرانولول ۳۰ mg/kg از خود نشان دادند. هر سه عصاره در پایین‌ترین دوز تست شده خود، اثر یکسانی از خود نشان دادند و هیچ اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد ($P > 0.05$), اما در بالاترین دوز تست شده، عصاره‌ی حاصل از روش سوکسله به مراتب قوی‌تر از عصاره‌های حاصل از روش‌های خسیانندن و التراسونیک بود ($P < 0.0001$).

بررسی اثرات آنتی هیپوکسی خفگی

نتایج حاصل از شرایط کمبود اکسیژن برای تست خفگی در خصوص عصاره‌های حاصل از روش‌های خسیانندن، سوکسله و التراسونیک در جدول شماره ۴ آمده است. این زمان بر حسب دقیقه بوده و مدت زمانی که موش پس از قرارگیری در محفظه بسته دچار تشنج و سپس مرگ می‌شود را نمایش می‌دهد.

دقیقه رسید ($P < 0/0001$). در این مدل، فنی توئین 50 mg/kg به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. زنده ماندن در گروه های دریافت کننده فنی توئین $29/60 \pm 1/34$ دقیقه بود که تفاوت معنی داری با گروه کنترل داشت ($P < 0/0001$). عصاره حاصل از روش خیساندن در دوز $1/95 \text{ mg/kg}$ اثری مشابه فنی توئین از خود نشان داد ($P > 0/05$). در دوز $31/25$ ، اگرچه زمان زنده ماندن موش ها را ۲ دقیقه بیش تر از فنی توئین افزایش داد، اما از نظر آماری تفاوتی بین آن ها مشاهده نشد ($P > 0/05$). عصاره حاصل از روش سوکسله در دوز $7/81 \text{ mg/kg}$ اثری مشابه فنی توئین از خود نشان داد ($P > 0/05$). اگر چه این عصاره هم در دوز $31/25 \text{ mg/kg}$ ، زمان زنده ماندن موش ها را ۲ دقیقه بیش تر از فنی توئین افزایش داد، اما از نظر آماری تفاوتی بین آن ها نیز مشاهده نشد ($P > 0/05$). عصاره حاصل از روش التراسونیک در دوز $7/81 \text{ mg/kg}$ اثری مشابه فنی توئین از خود نشان داد ($P > 0/05$). اگرچه این عصاره هم در دوز $31/25 \text{ mg/kg}$ ، زمان زنده ماندن موش ها را $2/5$ دقیقه بیش تر از فنی توئین افزایش داد، اما از نظر آماری تفاوتی بین آن ها نیز مشاهده نشد ($P > 0/05$). عصاره حاصل از روش خیساندن موثر از بقیه بود. این عصاره حتی در دوز $1/95 \text{ mg/kg}$ ، بسیار موثر بود. در این دوز سایر عصاره ها اثری نداشتند. در پایین ترین دوز مشترک، $31/90 \text{ mg/kg}$ ، اگرچه عصاره حاصل از روش خیساندن ۲ دقیقه زمان مرگ را نسبت به عصاره حاصل از روش التراسونیک، بیش تر افزایش داد، اما اختلاف معنی داری بین این دوز در این عصاره مشاهده نشد ($P > 0/05$). اما هر دو عصاره به طور معنی داری از عصاره حاصل از روش سوکسله قوی تر بودند. در بالاترین دوز مشترک، $31/25 \text{ mg/kg}$ ، هر سه عصاره اثر یکسانی از خود نشان دادند و هیچ اختلاف معنی داری بین آن ها مشاهده نشد ($P > 0/05$).

بحث

ذرات اکسیژن فعال (ROS) دسته ای از مولکول های

بسیار واکنش پذیر هستند که از اکسیژن مشتق شده و توسط برخی فرآیندهای متابولیک طبیعی تولید می شوند (۱۸). آنتی اکسیدان های طبیعی موجود در گیاهان برای محافظت از انسان در برابر رادیکال های آزاد و پیشگیری از برخی بیماری ها به خوبی شناخته شده هستند. بادرنجبویه به طور سنتی برای اثرات آن بر سیستم عصبی استفاده می شود (۱۹). در این تحقیق سه عصاره با سه روش مختلف تهیه شد. عصاره با کمک سوکسله با $19/4$ درصد بالاترین راندمان استخراج را داشت. نظر به چرخش حلال تازه در این روش و استفاده همزمان از دما، بیش تر بودن راندمان استخراج منطقی است. عصاره با کمک التراسونیک بالاترین مقدار ترکیبات پلی فنولی را داشت. عصاره حاصل از روش خیساندن بالاترین مقدار فلاونوئید تام را دارا بود. فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان را می توان عمدتاً به حضور ترکیبات فنولی در آن نسبت داد. فعالیت های بیولوژیکی زیادی از جمله، فعالیت ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد التهاب، ضد آلرژی و گشاد کننده عروق از این ترکیبات گزارش شده است (۲۰). روند استخراج یک عامل مهم در تعیین خصوصیات آنتی اکسیدانی عصاره است. دما، حلال، زمان عصاره گیری، قدرت استخراج و روش استخراج تاثیر بارزی در محتویات عصاره خواهد گذاشت. تکنیک های پیشرفته استخراج مانند عصاره گیری به کمک اولتراسوند از طریق افزایش کارایی و انتخابیت، موجب غلبه بر مشکلات روش های قدیمی شده است (۲۱). در مطالعه ای به منظور عصاره گیری از گیاه *Mesembryanthemum edule*، از روش استخراج اولتراسونیک استفاده شد. نتایج نشان داد که نوع حلال تاثیر زیادی بر محتوای فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی دارد. عصاره متانولی حاوی مقدار قابل توجهی ترکیبات پلی فنولی نسبت به عصاره اتانولی بود (۲۲). نتایج یک پژوهش بر روی گل آذین زولنگ نشان داد که مواد فنولی بیش تری در عصاره حاصل از روش سوکسله نسبت به روش های التراسونیک و خیساندن وجود

دارد (۲۳). گزارشات متعددی از به کارگیری روش استخراج با کمک التراسونیک در استخراج مواد مختلف از قبیل ایزوفلاون‌ها از ریشه *Radix puerariae*، هسپریدین از پوست *Citrus reticulata*، پلی ساکاریدها از پوست میوه *longan* و ترکیبات فنولی از غلات وجود دارد (۲۴). در یک مقاله، فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه *Agrimonia pilosa* با کمک روش استخراج با کمک التراسونیک و روش سوکسله با یکدیگر مقایسه شد و نشان داد که هر دو روش در استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی گیاه موثر و کارآمد بوده و به خوبی قابل استفاده در صنایع غذایی هستند (۲۵).

در مطالعه‌ای، اثرات دو روش عصاره‌گیری بر روی محتوای تام فنولی و فلاونویدی گیاه سیاه ولیک مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آنتی اکسیدانی فراکسیون پلی فنولی و اولتراسونیک با چهار تست آنتی اکسیدانی مختلف به صورت برون تری ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که عصاره حاصل از روش اولتراسونیک در تست‌های DPPH، به دام اندازی هیدروژن پراکسید و شلات کردن Fe^{2+} بهتر از عصاره پلی فنل بود (۱۵). مطالعه‌ای دیگر با هدف بررسی تاثیر روش‌های مختلف استخراج در فعالیت آنتی اکسیدانی، بر روی اندام‌های هوایی گیاه زعفران خزری *Crocus caspius* انجام شد. روش‌های استخراج شامل اولتراسونیک، پرکولاسیون و فراکسیون پلی فنولی بود. عصاره اولتراسونیک دارای بیشترین میزان فنول و فلاونوید بود، در تست DPPH و به دام اندازی H_2O_2 هم قوی‌ترین عصاره بود. عصاره تهیه شده به روش خیساندن در تست قدرت احیاکنندگی قوی‌ترین عصاره بود (۲۶). در یک مطالعه گل آذین گیاه زولنگ با سه روش عصاره شده و سپس فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها با چهار روش با یکدیگر مقایسه شده است. در عمده تست‌ها عصاره حاصل از روش سوکسله قوی‌ترین فعالیت را از خود نشان داد. اگر چه اختلاف زیادی بین این عصاره و عصاره حاصل از روش التراسونیک وجود نداشت. این تحقیق هم چنین نشان داد

که روش‌های سوکسله و اولتراسوند در استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوید موثرتر از روش کلاسیک خیساندن عمل می‌کنند. بنابراین روش ارجح در استخراج این ترکیبات فعال بیولوژیک در این گیاه می‌باشند. میزان فلاونوید تام در این مقاله، ۱۱/۹ تا ۱۸/۶۵ میلی گرم فلاونوید معادل کوئرستین در گرم عصاره به دست آمد. کمترین مقدار مربوط به روش خیساندن بود. بر این اساس، روش‌های سوکسله و اولتراسوند در این گیاه در استخراج ترکیبات فلاونوید موثر از روش کلاسیک خیساندن عمل می‌کنند (۲۳).

مدل به دام اندازی رادیکال DPPH به طور گسترده برای ارزیابی توانایی به دام اندازی رادیکال آزاد در نمونه‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۰). در تحقیق حاضر، تغییر روش استخراج تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر این تست داشت. عصاره‌گیری روش سوکسله و ماسیراسیون مناسب‌تر از روش دیگر بودند. در خصوص گیاه زولنگ، میزان IC_{50} حاصل از سه روش سوکسله، ماسیراسیون و اولتراسوند برای به دام اندازی رادیکال DPPH به ترتیب برابر برابر ۸۳/۱، ۱۷۷/۳ و ۱۸۸/۷ میکروگرم در میلی لیتر بود. بر این اساس استخراج با روش سوکسله مهارکننده قوی‌تری از دو روش دیگر بود. در این مطالعه نیز ارتباط خوبی بین فعالیت آنتی اکسیدانی و فنول تام به دست آمد. عصاره‌ها با میزان بیش تر فنولی (به ترتیب سوکسله، خیساندن و التراسونیک)، فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری از خود نشان دادند (۲۳). قدرت احیاکنندگی به عنوان شاخصی در تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاهان دارویی به کار می‌رود (۲۰). در این روش، حضور عوامل احیا کننده فعالیت خود را از طریق اهدا الکترون اعمال می‌کنند و موجب احیا آهن III به آهن II می‌گردند. میزان تشکیل آبی پروس در طول موج ۷۰۰ نانومتر قابل اندازه گیری است. افزایش جذب در این طول موج نشان از افزایش توانایی احیا کنندگی می‌باشد. در تحقیق حاضر، روش استخراج تاثیری بر فعالیت احیا کنندگی عصاره‌ها نداشت. تمامی

عصاره و ویتامین ث تقریباً در تمامی غلظت‌های تست شده، اثر مشابهی داشتند ($P > 0.05$). هدف از یک مطالعه تعیین پلی فنل‌ها و فلاونوئیدهای بادرنجبویه بود. بدین منظور عصاره متانولی از اندام هوایی گیاه تهیه شد و محتوای تام فنلی و محتوای تام فلاونوئید به روش رنگ‌سنجی ارزیابی شد. فعالیت آنتی اکسیدانی نیز توسط فعالیت مهار رادیکال DPPH برآورد شد. محتوای فنول تام و فلاونوئیدهای تام عصاره اتیل استات به ترتیب ۱۴۳/۵۰ میلی گرم GAE/g (dw) و ۱۲۴/۹۶ میلی گرم QE/g DW بود (۲۷). نقش و اهمیت هیپوکسی به عنوان یک عامل مهم در پاتوژنز برخی بیماری‌ها مانند پلی سیتی، اختلالات قلبی ریوی و کووید-۱۹ اثبات شده است (۲۹، ۲۸). هیپوکسی در رشد سلول‌ها و تومور سرطانی، افزایش قدرت تهاجمی آن‌ها و هم‌چنین متاستاز نقش داشته و از طرفی باعث افزایش مقاومت سلول‌های به پرتو درمانی و شیمی درمانی می‌شود. هیپوکسی به عنوان یک ریسک فاکتور در تشخیص برخی سرطان‌ها از قبیل سر و گردن شناخته می‌شود (۳۰). بر این اساس ترکیبات آنتی هیپوکسیک را می‌توان به عنوان داروی ضد سرطان یا حداقل داروی کمکی در درمان آن در نظر گرفت (۳۱). ترکیبات طبیعی گیاهی و برخی داروها فعالیت آنتی هیپوکسی خوبی دارند و بنابراین پتانسیل استفاده در درمان محدوده وسیعی از بیماری‌ها را دارند (۳۲). تاثیر دگزامتازون در درمان کووید-۱۹ تایید شده است. این دارو مرگ بیماران کووید-۱۹ بستری و نیازمند اکسیژن (بدون ونتیلاتور) و تحت ونتیلاسیون را کاهش داد، اما در بیماران بدون نیاز به حمایت اکسیژن موثر نبود. لذا استراتژی جدیدی در درمان کووید-۱۹ پیشنهاد شد. این استراتژی مبتنی عملکرد دگزامتازون به عنوان یک آنتی هیپوکسی، و پیشنهاد استفاده از آنتی هیپوکسی‌ها در درمان کووید-۱۹ بود. با این رویکرد، فعالیت بالای آنتی هیپوکسی دگزامتازون به عنوان یکی از مکانیسم‌های احتمالی عملکرد این دارو در درمان کووید-۱۹ گزارش شد (۳۳).

آسیب مغزی ایسکمیک اغلب باعث آسیب عصبی غیر قابل برگشت می‌شود. آبخار حوادثی که منجر به آسیب عصبی و مرگ در ایسکمی می‌شود شامل التهاب، ادم، آپوپتوز و نکروز است (۳۴). ایسکمی مغزی چندین روند متابولیکی را آغاز می‌کند که نهایتاً منجر به مرگ نورون‌ها می‌شود. این روندها بخش زیادی از آسیب‌های ناشی از ایسکمی مغزی را میانجی‌گری می‌کنند. بادرنجبویه به عنوان یک گیاه مفید در پیشگیری از بیماری‌های عصبی مختلف مانند آلزایمر که با استرس اکسیداتیو مرتبط است، در نظر گرفته می‌شود (۱۹).

در مطالعه حاضر فعالیت آنتی هیپوکسی این گیاه به عنوان مکانیسم احتمالی فعالیت آن در ایسکمی مغزی مورد ارزیابی قرار گرفت.

در مدل هایپوکسی خفگی، تمامی عصاره‌ها اثرات بسیار خوبی از خود نشان دادند. عصاره حاصل از روش خیساندن در دوز ۱/۹۰ mg/kg، تاثیر زیادی بر افزایش بقاء موش‌های سوری داشت و به طور معنی‌داری زمان مرگ را افزایش داد ($P < 0.001$). در دوز ۳/۹۰ mg/kg، اثر بهتری مشاهده شد. عصاره حاصل از روش سوکسله در دوز ۷/۸۱ mg/kg، به طور معنی‌داری زمان مرگ را افزایش داد ($P < 0.0001$). عصاره حاصل از روش التراسونیک در دوز ۳/۹۰ mg/kg، موثر بود ($P < 0.001$). در این مدل، فنی توئین ۵۰ mg/kg به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. فنی توئین میزان مصرف اکسیژن، فعالیت سلولی و مصرف ATP را کم‌تر و مقاومت سلولی را در برابر ایجاد هیپوکسی بیش‌تر می‌کند (۳۵). عصاره حاصل از روش خیساندن در دوز ۱/۹۵ و عصاره‌های حاصل از روش سوکسله و التراسونیک در دوز ۷/۸۱ mg/kg اثری مشابه فنی توئین از خود نشان دادند ($P > 0.05$) (جدول شماره ۴). در گزارش‌های پیشین، عصاره برگ‌مورد و عصاره گل سیر در دوز ۱۲۵ mg/kg نیز توانسته بودند، زمان زنده ماندن موش‌ها را در حد فنی توئین افزایش دهند (۳۶، ۳۷). اما اثرات قابل توجهی در این مدل از برخی گیاهان مانند سیاه ولیک و

سرخ ولیک حتی تا دوزهای ۴۰۰ mg/kg مشاهده نشده است (۳۸). در مدل هایپوکسی خونی، هیچ یک از عصاره‌ها اثری از خود نشان ندادند. حتی عصاره حاصل از روش سوکسله که در بالاترین دوز تست شده خود، یعنی ۲۵۰ mg/kg، علی‌رغم این که زمان مرگ را حدود یک دقیقه افزایش داد، نتوانست تغییر معنی‌داری ایجاد کند ($P > 0.05$) (جدول شماره ۳). در این تست پروپرانولول در دوز ۲۰ mg/kg به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. در این مدل، سدیم نیتريت نسبت به اکسیژن با تمایل بیش‌تری به هموگلوبین متصل شده و ظرفیت حمل اکسیژن از طریق تبدیل هموگلوبین به متهموگلوبین کاهش پیدا می‌کند. در نتیجه اکسیژن‌رسانی به بافت‌ها دچار اختلال شده و این فرایند سبب مرگ جاندار می‌گردد (۳). پروپرانولول به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در پستانداران، کاتکول آمین‌ها بر گیرنده‌های شیمیایی کاروتید که به اکسیژن حساس هستند، اثر می‌گذارند. این گیرنده‌های شیمیایی مسئول تنفس سریع و زیاد در پاسخ به نور اپی‌نفرین هستند. پروپرانولول پاسخ به نور اپی‌نفرین و هم‌چنین هیپوکسی را مهار می‌کند (۳۹). فعالیت تنفسی میتوکندریایی (اتم اکسیژن مصرفی بر مبنای گرم پروتئین میتوکندریایی) بهتر شده و تجمع یون کلسیم در میتوکندری با سرعت نسبتاً آهسته‌تری انجام می‌شود. پروپرانولول از عضله قلب در برابر اثرات هیپوکسی و ایسکمی محافظت می‌کند (۴۰). در این مدل، عصاره اتانولی اندام هوایی *Delphinium elbursense* عصاره متانولی بامیه در دوز ۱۰۰۰ mg/kg توانستند زمان زنده ماندن را افزایش دهند (۴۱، ۴۲). عصاره متانولی گل آذین زولنگ در دوز ۶۰۰ ($P < 0.001$)، عصاره متانولی گل گردو و گل سیر در دوز ۱۲۵ و عصاره آبی اندام هوایی *Hypericum scabrum* در دوز ۳۱/۲۵ mg/kg ($P < 0.001$) فعالیت آنتی هیپوکسی از خود نشان دادند (۲۳، ۳۷، ۴۳، ۴۴).

در مدل هایپوکسی وابسته به گردش خون هیچ یک از عصاره‌ها در پایین‌ترین دوز تست شده اثری از خود

نشان ندادند، اما تمامی عصاره‌ها در دوزهای بالاتر اثر بسیار قوی داشتند. عصاره حاصل از روش خیساندن در دوز ۱۲۵ mg/kg به طور معنی‌داری زمان مرگ را افزایش داد ($P < 0.001$). در دوز بالاتر، اثر بهتری مشاهده شد. عصاره‌های حاصل از روش‌های سوکسله و التراسونیک در دوز ۲۵۰ mg/kg، به طور معنی‌داری زمان مرگ را افزایش دادند ($P < 0.001$). در این تست پروپرانولول در دوزهای ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. پروپرانولول در دوز ۲۰، موجب افزایش زمان مرگ در موش‌ها شد ($P < 0.01$) و در دوز ۳۰ mg/kg، زمان زنده ماندن موش‌ها را بیش‌تر افزایش داد ($P < 0.001$). عصاره حاصل از روش خیساندن در دوز ۱۲۵ mg/kg اثری مشابه پروپرانولول ۳۰ mg/kg داشت ($P > 0.05$). تمامی عصاره‌ها در دوز ۲۵۰ mg/kg به مراتب قوی‌تر از پروپرانولول ۳۰ mg/kg بودند (جدول شماره ۲). سدیم فلوراید در هایپوکسی وابسته به گردش خون باعث لیز شدن هموگلوبین و در نتیجه کاهش ظرفیت حمل اکسیژن می‌گردد. در نتیجه با وجود سالم بودن سیستم‌های آنزیمی و عملکردی، سلول‌ها به دلیل عدم دریافت اکسیژن کافی از خون، دچار هایپوکسی و مرگ می‌گردند. در این مدل ترکیباتی که بتوانند اکسیژن‌رسانی به سلول‌ها و بافت‌ها و یا میزان مقاومت بافت‌ها در برابر هیپوکسی را افزایش دهند، مفید واقع می‌گردند. در مطالعات پیشین، فراکسیون پلی‌فنول میوه سیاه ولیک و سرخ ولیک در دوز ۱۰۰ mg/kg توانستند زمان زنده ماندن موش‌های آزمایشگاهی را از $9/29 \pm 0/95$ دقیقه در گروه کنترل به $38/67 \pm 9/81$ و $26/44 \pm 8/32$ دقیقه افزایش دهند که بسیار قابل توجه بود ($P < 0.001$) (۳۸). هم‌چنین فراکسیون پلی‌فنولی گل آذین زولنگ در دوز ۴۰۰ ($P < 0.001$) و عصاره متانولی اندام هوایی گیاه گزنه در دوز ۳۰۰ mg/kg ($P < 0.001$) و عصاره متانولی برگ گیاه پلم در دوز ۶۲/۵ mg/kg ($P < 0.001$) اثرات قابل توجهی از خود نشان دادند (۲۳، ۳۶).

گرفت. تأثیر روش استخراج بر فعالیت آنتی اکسیدانی آن بررسی شد. بالاترین راندمان استخراج مربوط سوکسله بود. روش های التراسونیک و خیساندن به ترتیب مناسب ترین روش ها برای استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی از این گیاه بود. عصاره با کمک سوکسله و خیساندن بالاترین فعالیت را در به دام اندازی رادیکال DPPH از خود نشان دادند. در تست احیا کنندگی، تمامی عصاره ها اثرات خوب آنتی اکسیدانی بالایی نشان داده و اثر آن ها مشابه بود. عصاره ها اثرات محافظتی بسیار خوبی در افزایش زمان زنده ماندن موش های سوری در تست خفگی از خود نشان دادند. عدم تعیین مقدار یک یا چند فاکتورهای اصلی نشان دهنده هایپوکسی مانند مقدار اشباع اکسیژن یا بیان فاکتور القا شده با هایپوکسی به عنوان یکی از محدودیت های کار حاضر اعلام می گردد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه های دانشجویی دکترای داروسازی به شماره (کد طرح ۴۹۷۵) می باشد که بدین وسیله از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تشکر می گردد.

References

1. Mozdastan S, Ebrahimzadeh MA, Khalili M. Comparing the impact of different extraction methods on antioxidant activities of Myrtle (*Myrtus communis* L.). J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(127): 10-24 (Persian).
2. Majidaee E, Hosseini Talei SR, Gholamnezhad S, Ebrahimzadeh MA. Comparing the effect of different extraction methods and the role of solvent polarity on total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activities of *Ferula persica*. J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30(188): 26-39 (Persian).
3. Ataee R, Hasani H, Mohammadyan M, Ebrahimzadeh MA. Antihypoxic activities of aerial parts and roots of *Ferula persica* in Mice. J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30(189): 126-32 (Persian).
4. Armstrong D. Advanced Protocols in Oxidative Stress II. In: Methods in Molecular Biology. İstanbul: Humana Press; 2010. p. 28.
5. Khalili M, Dehdar T, Hamed F, Ebrahimzadeh MA, Karami M. Antihypoxic Activities of the Golden Chanterelle Mushroom, *Cantharellus cibarius* (Higher Basidiomycetes). Int J Med Mushrooms 2014; 16(4): 339-344.

6. Shakeri A, Sahebkar A, Javadi B. *Melissa officinalis* L.–A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol* 2016; 188: 204-228.
7. Verma PS, Singh A, Rahaman L, Bahl JR. Lemon balm (*Melissa officinalis* L.) an herbal medicinal plant with broad therapeutic uses and cultivation practices: a review. *Int J Recent Adv Multidisciplinary Res* 2015; 2(11): 928-933.
8. Abdel-Naime WA, Fahim JR, Fouad MA, Kamel MS. Antibacterial, antifungal, and GC-MS studies of *Melissa officinalis*, *South Afr J Bot* 2019; 124(7): 228-234.
9. Luta EA, Ghica M, Costea T, Elena C. Phytosociological study and its influence on the biosynthesis of active compounds of two medicinal plants *Mentha piperita* L. and *Melissa officinalis* L. *Farmácia* 2020; 68(5): 919-924.
10. Awad R, Muhammad A, Durst T, Trudeau VL, Arnason JT. Bioassay-guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) using an in vitro measure of GABA transaminase activity. *Phytother Res* 2009; 23(8): 1075-1081.
11. Astani A, Reichling J, Schnitzler P. *Melissa officinalis* extract inhibits attachment of herpes simplex virus in vitro. *Chemotherapy* 2012; 58(1): 70-77.
12. Kamdem JP, Adeniran A, Boligon AA. Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection. *Indust Crops Prod* 2013; 51: 26-34.
13. Aubert P, Guinobert I, Blondeau C. Basal and spasmolytic effects of a hydroethanolic leaf extract of *Melissa officinalis* L. on intestinal motility: An ex vivo study. *J Med Food* 2019; 22(7): 653-662.
14. Rabiei Kh, Bekhradnia S, Nabavi SM, Nabavi SF, Ebrahimzadeh M.A. Antioxidant activity of polyphenol and ultrasonic extracts from fruits of *Crataegus pentagyna* subsp. *elburensis*. *Nat Pro Res* 2012; 26(24): 2353-2357.
15. Nabavi SM, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Bahramian F. In vitro antioxidant activity of *Phytolacca americana* berries. *Pharmacologyonline* 2009; 1(2009): 81-88.
16. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B. Free radical scavenging ability of methanolic extract of *Hyoscyamus squarrosus* leaves. *Pharmacologyonline* 2009; 2: 796-802.
17. Lopez V, Martin S, Gomez-Serranillos MP, Carretero ME, Jager AK, Calvo MI: Neuroprotective and neurological properties of *Melissa officinalis*. *Neurochem Res* 2009; 34(11): 1955-1961.
18. Bayat M, Azami Tameh A, Hossein Ghahremani M, Akbari M, Mehr SE, Khanavi M, Hassanzadeh G. Neuroprotective properties of *Melissa officinalis* after hypoxic-ischemic injury both in vitro and in vivo. *DARU* 2012; 20(1): 42.
19. Khalili M, Ebrahimzadeh MA. A review on antioxidants and some of their common evaluation methods. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2015; 24(120): 188-208 (Persian).
20. Vilkh K, Mawson R, Simon L, Bates D. Application and opportunities for ultrasound assisted extraction in food industry; A review. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2008; 9: 161-169.
21. Falleh H. Ultrasound-assisted extraction: effect of extraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of *Mesembryanthemum edule* L. *Aizoaceae* shoots. *Tro J Pharm Res* 2012; 11(2): 243-249.

22. Riekandeh SM, Mazandarani M, Ebrahimzadeh MA, Zargari M. Antioxidant activities of *Eryngium caucasicum* inflorescence. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016; 20(5): 946-949.
23. Shahverdi A-R, Iranshahi M, Mirjani R, Jamalifar H, Amin G, Shafiee A. Bioassay-guided isolation and identification of an antibacterial compound from *Ferula persica* var. *persica* roots. *DARU J Pharm Sci* 2005; 13: 17-19 (Persian).
24. He Ch, Ji X, Pan Y, Wang H, Wang KM, Liang M, Yang L. Antioxidant activity of alcoholic extract of *Agrimonia pilosa* Ledeb. *Med Chem Res* 2010; 19: 448-461.
25. Khalili M, Fathi H, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity of bulbs and aerial parts of *Crocus caspius*, impact of extraction methods. *Pak J Pharm Sci* 2016; 29(3): 773-777.
26. Hassan RA, Abotaleb ST, Hamed HB, Eldeen MS. Antioxidant and antimicrobial activities of *Melissa officinalis* L.(lemon balm) extracts. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology* 2019; 10(9): 183-187 (Persian).
27. Aimee YY, Shimoda LA, Iyer NV, Huso DL, Sun X, McWilliams R, et al. Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 α . *J Clin Invest* 1999; 103(5): 691-696.
28. Cavezzi A, Troiani E, Corrao S. COVID-19: hemoglobin, iron, and hypoxia beyond inflammation. A narrative review. *Clin Pract* 2020; 10(2): 24-30.
29. Bredell MG, Ernst J, El-Kochairi I, Dahlem Y, Ikenberg K, Schumann DM. Current relevance of hypoxia in head and neck cancer. *Oncotarget* 2016; 7(31): 50781-50804.
30. Bennewith KL, Dedhar S. Targeting hypoxic tumour cells to overcome metastasis. *BMC Cancer* 2011; 11: 504.
31. Mohsenpour H, Pesce M, Patruno A, Bahrami A, Pour PM, Farzaei MH. A review of plant extracts and plant-derived natural compounds in the prevention/treatment of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Int J Mol Sci* 2021; 22(2): 833.
32. 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* 2020; 75(6): e13943.
33. Kuroda S, Siesjo BK: Reperfusion damage following focal ischemia: pathophysiology and therapeutic windows. *Clin Neurosci* 1997; 4(4): 199-212.
34. Imaizumi S, Suzuki J, Kinouchi H, Yoshimoto T. Superior protective effects of phenytoin against hypoxia in a pharmacological screening test. *Neurolog Res* 1988; 10(1): 18-24.
35. Kaveh K, Mohamadyan M, Ebrahimzadeh MA. Antihypoxic activities of *sambucus* *ebulus* leaf and fruit and *Myrtus communis* leaf in mice. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2019; 29(176): 61-73 (Persian).
36. Shahbazee M, Mohammadyan M, Ali Ebrahimzadeh M. Antihypoxic activities of *Allium sativum* flower in mice. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2019; 29(175): 145-149 (Persian).
37. 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 Pharm Sci* 2018; 54(2): e17363.
38. Burleson ML, Milsom WK. Propranolol inhibits O₂-sensitive chemoreceptor activity in trout gills. *Am J Physiol* 1990; 258(4): R1089-1091.
39. Nayler WG, Fassold E, Yopez C. Pharmacological protection of mitochondrial

- function in hypoxic heart muscle: Effect of verapamil, propranolol, and methylprednisolone. *Cardiovasc Res* 1978; 12(3): 152-161.
40. Ebrahimzadeh M, Nabavi S, Nabavi S, Mahmoudi M, Eslami B, Dehpour A. Biological and pharmacological effects of *Delphinium elbursense*. *Afr J Biotechnol* 2010; 9(34): 5542-5549.
 41. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM, Eslami B. Antihypoxic and antioxidant activity of *Hibiscus esculentus* seeds. *Grasas Aceites* 2010; 61(1): 30-36.
 42. Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Mahmoudi M, Rad SK. Biological activities of *Juglans regia* flowers. *Rev Bras Farmacogn* 2011; 21(3): 465-470.
 43. Eslami B, Nabavi S, Nabavi S, Ebrahimzadeh M, Mahmoudi M. Pharmacological activities of *Hypericum scabrum* L. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011; 15(5): 532-537.