

Antihypoxic Activities of Hibiscus rosa sinensis in Mice

Mohammad Hossein Hosseinzadeh¹,

Mohammad Ali Ebrahimzadeh²

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

² Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received February 2, 2020 ; Accepted May 27, 2020)

Abstract

Background and purpose: Imbalance between low oxygen supply and oxygen demand determines organ hypoxia. It occurs especially in heart diseases and ischemia and causes death. Compounds with antioxidant activity could exhibit antihypoxic properties. *Hibiscus rosa sinensis* has good antioxidant activity, but there is no information about the antihypoxic activities of this plant. This study was designed to evaluate antihypoxic activities of *H. rosa* extract.

Materials and methods: Protective effects of the methanolic extract of *H. rosa* against hypoxia-induced lethality in mice were evaluated by experimental models of hypoxia i.e. asphyctic, haemic, and circulatory models. This experimental study was carried out in 15 groups of male mice (n= 6 per group). Data analysis was done applying Analysis of variance and Tukey's multiple comparisons test.

Results: Findings showed significant protective activities in all three models. Antihypoxic activity was considerably high in asphyctic and haemic models. In asphyctic model, the extract at 125 mg/kg showed similar activity to positive control, phenytoin (P>0.05), but at 250 mg/kg it was stronger than phenytoin (P<0.05). In haemic model, the extract demonstrated similar activity to propranolol at 125 mg/kg (P>0.05) and greater protective activity at 250 mg/kg (P<0.001). In circulatory model, the *H. rosa* extract was found to be effective at 62.5 mg/kg (P<0.05). At 125 mg/kg it significantly prolonged survival time to 14.04 ± 1.36 vs 11.37 ± 1.53 min in control group (P<0.01). The extract at 250 mg/kg showed the same activity as propranolol (P>0.05).

Conclusion: *H. rosa* extract showed strong protective effects against hypoxia in all three tested models. Compared to the control group, the extract significantly prolonged survival time in a dose dependent manner.

Keywords: asphyctic hypoxia, haemic hypoxia, circulatory hypoxia, antioxidant activity, *Hibiscus rosa*

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (186): 133-140 (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 گل ختمی زرد در موش سوری

محمد حسین حسین زاده¹محمد علی ابراهیم زاده²

چکیده

سابقه و هدف: عدم تعادل بین عرضه کم و مصرف زیاد اکسیژن به هیپوکسی منجر می شود. آنتی اکسیدان ها می توانند فعالیت آنتی هیپوکسی نشان دهند. علی رغم فعالیت آنتی اکسیدانی خوب گل ختمی چیزی در خصوص فعالیت آنتی هیپوکسی آن یافت نشده است. این مطالعه بمنظور بررسی فعالیت آنتی هیپوکسی عصاره گیاه انجام شده است.

مواد و روش ها: اثر محافظتی عصاره متانلی گل ختمی زرد در مقابل مرگ و میر ناشی از هیپوکسی در موش سوری با سه مدل هیپوکسی خفگی، خونی و جریان خونی بررسی شد. مطالعه به شکل تجربی بر روی موش سوری نر انجام شد. آنالیز واریانس یک سویه و پست تست توکی به منظور تعیین اختلاف بین میانگین ها استفاده شد.

یافته ها: اثرات محافظتی بالایی در تمامی مدل ها به اثبات رسید. اثرات به خصوص در خفگی و خونی بسیار بالا بود. در خفگی، عصاره در دوز 125 mg/kg اثری معادل فنی توئین از خود نشان داد. در دوز 250 mg/kg قوی تر از فنی توئین بود ($P < 0/05$). در هیپوکسی خونی در دوز 125 mg/kg اثری معادل پروپرانولول از خود نشان داد ($P > 0/05$). در مدل جریان خونی، عصاره در دوز 62/5 mg/kg موثر بود ($P < 0/05$). در دوز 125 mg/kg زمان زنده ماندن را از 14/04 ± 1/36 در مقابل 11/37 ± 1/53 دقیقه برای گروه کنترل افزایش داد ($P < 0/01$). عصاره در دوز 250 mg/kg اثری همانند پروپرانولول داشت ($P > 0/05$).

استنتاج: عصاره فعالیت محافظتی بسیار خوبی در تمامی مدل های هیپوکسی در موش از خود نشان داد. عصاره از نظر آماری به طور قابل ملاحظه ای و به صورت وابسته به دوز، زمان زنده ماندن را نسبت به گروه کنترل در موش ها افزایش داد.

واژه های کلیدی: هیپوکسی خفگی، هیپوکسی خونی، هیپوکسی جریان خون، آنتی اکسیدانی، گل ختمی

مقدمه

و در نتیجه ایسکمی، خونریزی، سکت، تولد زودرس، مسمومیت با سیانید و برخی از بیماری های قلبی عروقی ایجاد شود (1). مغز با مصرف 15 تا 20 درصد اکسیژن مورد نیاز بدن، بیشترین وابستگی را به میزان اکسیژن دارد، اولین بخشی که در هیپوکسی به کمبود اکسیژن دچار

هیپوکسی حالتی است که در آن بدن یا بخشی از بدن در سطح بافتی از دریافت میزان کافی اکسیژن محروم شود. این حالت می تواند در شرایط طبیعی فیزیولوژیکی و صرفاً در نتیجه کاهش تهویه ریوی، ورزش بدنی سنگین و صعود به ارتفاعات و یا در شرایط پاتولوژیک

مؤلف مسئول: محمد علی ابراهیم زاده - ساری: کیلومتر 17 جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی E-mail: zadeh20@yahoo.com

1. دانشجوی داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران.

2. استاد شیمی دارویی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ دریافت: 1398/11/13 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1398/11/14 تاریخ تصویب: 1399/3/7

مواد و روش ها

این مطالعه به شکل تجربی (*experimental*) انجام شد. گل ختمی توسط دکترای سیستماتیک گیاهی (دکتر بهمن اسلامی) از حوالی ساری جمع آوری و تایید شد. نمونه هرباریومی در هر بار یوم دانشگاه بیولوژی دانشگاه آزاد قائم شهر به شماره 1249 نگهداری می شود. گل گیاه در سایه خشک شده، به قطعات ریز تبدیل شده و سپس عصاره گیری با روش خیساندن با متانول انجام شد. 25 گرم از گل خشک گیاه با 100 میلی لیتر متانول مخلوط شد. مجموعه به مدت 24 ساعت رها گردید. روز بعد فاز آلی جدا و مجدداً حلال جدید اضافه شد. این عمل برای سه بار تکرار شد. در روز آخر، مجموعه حلال آلی توسط دستگاه روتاری (تبخیر کننده چرخان) حذف گردید و بدین ترتیب عصاره مربوطه تهیه شد (16). محلول‌هایی با غلظت 62/5، 125 و 250 mg/kg در نرمال سالین تهیه شد. اساس انتخاب دوز اولیه، تجارب در کارهای قبلی بود (8-10). در هر تست دوز 125 میلی گرم بر کیلو گرم مورد استفاده قرار گرفت و سپس حسب میزان پاسخ، دوز بعدی افزایش یا کاهش یافت. در هر تست، سه دوز به کار رفت.

حیوان مورد مطالعه

از موش های سوری نر با سن 8-10 هفته ای که از بخش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تهیه شده بود، استفاده گردید. گروه های مورد مطالعه (در هر گروه 6 سر موش سوری با وزن 20-25 گرم) بودند که در قفس های مجزا تحت وضعیت کنترل شده درجه حرارت (بین 20 تا 25 درجه سانتی گراد) و روشنایی (دوره ای 12 ساعت روشن، 12 ساعت تاریکی) نگهداری شدند. پودر غذا و آب جهت تغذیه آزادانه در دسترس آنها قرار گرفت.

هیپوکسی خفگی

30 دقیقه بعد از تزریق داخل صفاقی دوزهای

می شود مغز است و می تواند منجر به بروز غش، تشنج، افت هوشیاری، کما و مرگ مغزی شود (2). کمبود اکسیژن در قلب در مراحل ابتدایی می تواند سبب ایجاد آریتمی، حملات قلبی و ایسکمی های قلبی شود (3). هیپوکسی باعث ایجاد تغییرات گسترده ای در آنزیم های بدن می شود که در نتیجه آن تولید ذرات فعال اکسیژن به شدت افزایش پیدا می کند (1). بنابراین آنتی اکسیدان ها به عنوان آنتی هیپوکسی مطرح خواهند شد. از گزنه (4)، زولنگ (5)، پلم (6) و قارچ زرد کیجا (7) اثرات آنتی اکسیدانی خوبی گزارش شده و در همین راستا فعالیت آنتی هیپوکسی خوبی نیز از همین گیاهان چاپ شده است (8-10).

ختمی *Hibiscus rosa-sinensis* گیاهی گلدار و وحشی است که در آسیا رشد می کند. در طب سنتی از گل آن جهت درمان بیماری های کبدی، درد معده و بیماری چشمی استفاده می کنند. خواص محافظت نوروئی، محافظت قلبی - عروقی و آنتی اکسیدانی بسیار خوبی از آن گزارش شده است (11، 12). آنالیز فیتوشیمیایی اولیه در خصوص این گیاه نشان داد که عصاره آن حاوی تانن، آنتراکینون، کینین، فنل ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، تریپنوئیدها، ساپونین ها، گلیکوزیدهای قلبی، پروتئین، اسیدهای آمینه، کربوهیدرات ها، قندهای احیا شده، موسیلاژ، اسانس و استروئیدها است (13). عصاره گل ختمی زرد حاوی فنل، آلکالوئید و تانن است (14). گل ها حاوی چهار نوع فلاونوئید، روتین، کوئرستین، کامفرول و میریستین است (15). علاوه بر این، گل ها حاوی مقادیر قابل توجهی پرواتوسیانیدین ها، آنتوسیانین ها، آلکالوئیدهای سیکلوپیتید و ویتامین های تیامین، ریبوفلاوین، نیاسین و اسید اسکوربیک هستند (13). نظر به اثرات اثبات شده قلبی عروقی و اثرات خوب آنتی اکسیدانی گل ختمی، در این مطالعه به بررسی فعالیت آنتی هیپوکسی عصاره متانولی گل ختمی زرد پرداخته شده است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر محافظتی عصاره متانولی گل ختمی در مقابل مرگ و میر ناشی از هیپوکسی در موش سوری با سه مدل هیپوکسی خفگی، خونی و جریان خونی بود.

آنالیز آماری

تمامی اندازه‌گیری‌ها 3 بار تکرار شده و کلیه اطلاعات به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ گزارش شد. آنالیز واریانس یک سویه (ANOVA) و متعاقب آن Tukey's multiple comparisons test برای مقایسه میانگین‌ها بکار رفت. نتایج با احتمال $P < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار GraphPad prism 8 استفاده شد.

یافته‌ها و بحث

در مسمومیت خونی که از سدیم نیتريت برای القای این مسمومیت استفاده می‌شود فاکتورهای حمل‌کننده یعنی هموگلوبین‌ها، از نظر ساختاری و زنجیره‌های تولید انرژی در میتوکندری‌ها دچار اختلال نیستند و تنها مشکل این است که این ماده با تمایل بیش‌تر و پیوند مستحکم‌تری به هموگلوبین متصل شده و بدینوسیله از اتصال اکسیژن در گردش به هموگلوبین جلوگیری کرده و در نتیجه اکسیژن‌رسانی را دچار مشکل می‌کند. در مسمومیت شیمیایی با تزریق سدیم نیتريت، ظرفیت حمل اکسیژن از طریق تبدیل هموگلوبین به مت هموگلوبین کاهش یافته و در نتیجه با ایجاد هیپوکسی در سلول‌های بافت‌ها موجب مرگ جاندار می‌گردد (10). نتایج حاصل از تزریق نیتريت سدیم در نمودار شماره 1 آمده است. عصاره با دوز 125 mg/kg در هیپوکسی خونی نسبت به کنترل فعالیت قابل توجهی از خود نشان داد ($15/02 \pm 1/69$) در مقابل $11/32 \pm 1/55$ دقیقه برای گروه کنترل، ($P < 0/0001$). در این دوز تأثیری معادل پروپرانولول 20 mg/kg که به‌عنوان کنترل مثبت بکار رفت از خود نشان داد ($P > 0/05$). عصاره در دوز 250 بسیار قوی‌تر از پروپرانولول بود ($P < 0/001$). عصاره گل‌گردو در مقادیر $125-31/25 \text{ mg/kg}$ زمان مرگ را در مدل خونی از 9 دقیقه به 12 دقیقه افزایش داد ($p < 0/01$) (19). اثرات آنتی‌هیپوکسیک *Delphinium Elbursense* قوی و وابسته به دوز

62/5، 125 و 250 mg/kg از عصاره، حیوان در یک محفظه شیشه‌ای دربسته و مهر و موم شده توسط پارافیلیم، به حجم 300 میلی‌لیتر قرار گرفت. از مقداری آهک در پارچه توری به‌عنوان جاذب CO_2 استفاده شد. موش‌ها بر اثر کمبود اکسیژن محیط (هیپوکسی) تشنج گرفته و مردند. اثر ضد هیپوکسی عصاره به صورت زمان زنده بودن موش (به دقیقه) بیان گردید. از نرمال سالین به‌عنوان کنترل منفی و از فنی‌توئین (50 mg/kg i.p) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد (17، 18). در این تست از هر گروه 6 موش استفاده گردید.

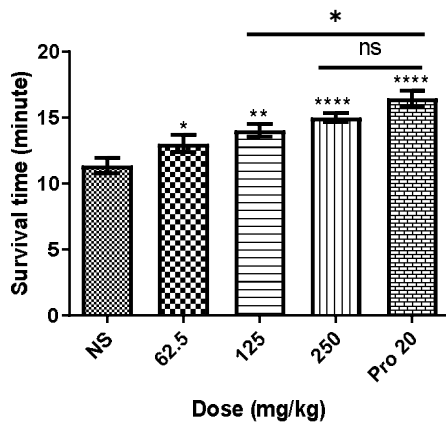
هیپوکسی خونی

در این روش از نیتريت سدیم (NaNO_2) به‌عنوان عامل ایجادکننده هیپوکسی خونی استفاده شد. دوزهای 62/5، 125 و 250 mg/kg از عصاره تهیه شد. 30 دقیقه بعد از تزریق داخل صفاقی دوزهای مورد نظر از عصاره به موش، 360 mg/kg NaNO_2 به صورت داخل صفاقی تزریق شد. اثر ضد هیپوکسی به صورت زمان زنده ماندن در مقایسه با گروه کنترل نرمال سالین بیان گردید (17، 18). در این تست در هر گروه 6 موش استفاده شد. از پروپرانولول 20 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

هیپوکسی وابسته به گردش خون

در این روش از سدیم فلورید (NaF) به‌عنوان عامل ایجادکننده هیپوکسی وابسته به گردش خون، استفاده شد و دوزهای 62/5، 125 و 250 mg/kg از عصاره تهیه شد. 30 دقیقه بعد از تزریق داخل صفاقی دوزهای مورد نظر از عصاره به هر موش، NaF با دوز 150 mg/kg به صورت داخل صفاقی تزریق گردید و درصد فعالیت در مقابل کنترل به صورت زمان زنده ماندن در مقایسه با نرمال سالین سنجیده شد. در این تست در هر گروه 6 موش استفاده گردید (17، 18). از پروپرانولول 20 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

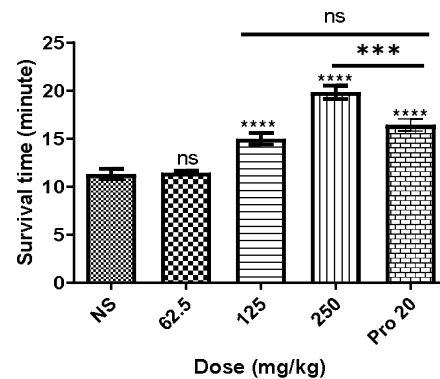
توان مقاومت سلول در برابر هیپوکسی ذکر نمود (10). نتایج حاصل از تزریق سدیم فلوراید در نمودار شماره 2 آمده است. عصاره در دوز 62/5 mg/kg موثر بود ($P < 0/05$) و زمان بقا را نسبت به گروه کنترل افزایش داد. در دوز 125 mg/kg زمان زنده ماندن را از $14/04 \pm 1/36$ در مقابل $11/37 \pm 1/53$ دقیقه برای گروه کنترل افزایش داد ($P < 0/01$). این اثر کمی ضعیف تر از پروپرانولول 20 mg/kg بود که بعنوان کنترل مثبت بکار رفت ($P < 0/05$). عصاره در دوز 250 اثری همانند پروپرانولول داشت ($P > 0/05$).



نمودار شماره 2: فعالیت آنتی هایپوکسی عصاره گل ختمی در مدل جریان خونی در موش سوری

عصاره گل گردو در غلظت‌های 125 mg/kg-31/25 زمان مرگ در مدل جریان خونی از 9 دقیقه به 15 دقیقه افزایش داده است ($P < 0/001$) (19). عصاره گیاه *Delphinium elbursense* در مدل جریان خونی زمان زنده ماندن موش‌ها را از 9 به 17 دقیقه افزایش داده است ($P < 0/001$) (20). عصاره گیاه تره با دوز 250mg/kg در این مدل، زمان مرگ را نسبت به گروه کنترل به تأخیر انداخت اما این اثر از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0/05$) (21). در خصوص به لیمو، فعالیت آنتی‌هیپوکسی بخصوص در مدل گردش خونی بالا بود، تا جایی که در دوز 62/5 mg/kg زمان مرگ را نسبت

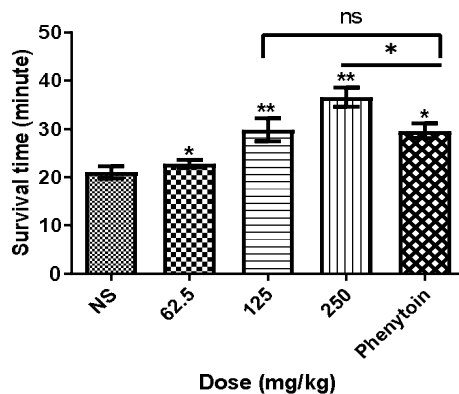
گزارش شده است. عصاره این گیاه در دوزهای 31/25-125 mg/kg زمان مرگ را در موش در مدل خونی از 11 به 19 دقیقه افزایش داد ($P < 0/001$) (20). عصاره به لیمو در مدل خونی، در دوز 250 mg/kg به‌طور معنی‌داری زمان بقا موش‌ها را افزایش داد ($P < 0/05$). در این دوز اثری معادل پروپرانولول از خود نشان داد ($P > 0/05$) (17). عصاره سرخ ولیک در دوز 400 mg/kg حدود یک دقیقه زمان بقا را در موش افزایش داد. این افزایش از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$). اما عصاره سیاه ولیک در این دوز تأثیری بر زمان زنده ماندن در این نوع هیپوکسی نداشت (22).



نمودار شماره 1: فعالیت آنتی هایپوکسی عصاره گل ختمی در مدل خونی در موش سوری

در مسمومیت گردش خونی، سدیم فلوراید سبب لیز شدن هموگلوبین شده در نتیجه ظرفیت حمل اکسیژن کاهش یافته و سلول با وجود سالم بودن سیستم‌های آنزیمی و عملکردی دچار هیپوکسی و مرگ می‌گردد. در غلظت‌های بالا سدیم فلوراید موجب مسمومیت حاد و موجب لیز شدن هموگلوبین شده و در نتیجه سبب وارد شدن ترکیبات موجود در ساختار آن به داخل خون می‌شود. در تست هیپوکسی گردش خونی، چنانچه اثر مثبتی در افزایش زمان زنده ماندن موش‌ها حاصل شد، دلیل این افزایش را می‌توان در اکسیژن‌رسانی بهتر به دلیل کاهش لیز شدن هموگلوبین در خون یا افزایش

در مدل خفگی، عصاره به لیمو در دوز 250 زمان مرگ را معادل فنی توئین افزایش داد ($P > 0/05$) (17). عصاره گل سیر به خصوص در مدل خفگی دوز 125 mg/kg اثری معادل فنی توئین ($P > 0/05$) و در دوز 250 mg/kg اثری به مراتب قوی راز فنی توئین ایجاد نمود ($P < 0/001$) (23). عصاره متانلی اندام هوایی ویسه آکراکا در دوز mg/kg 100 به طور معنی داری زمان زنده ماندن موش ها را در این مدل افزایش داد ($P < 0/05$) (24).



نمودار شماره 3: فعالیت آنتی هیپوکسی عصاره گل ختمی در مدل خفگی در موش سوری

سپاسگزاری

این مقاله، حاصل طرح دانشجویی مصوب به شماره (کد طرح 6375) می باشد که بدین وسیله از حمایت مالی حوزه معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه تشکر می گردد. کد اخلاق این مقاله نیز (IR.MAZUMS.REC.1398.1149) است.

References

- Kiang JG, Tsen K-T. Biology of hypoxia. Chinese Journal of Physiology 2006; 49(5): 223-233.
- Biagas K. Hypoxic-ischemic brain injury: advancements in the understanding of mechanisms and potential avenues for therapy. Curr Opin Pediatr 1999; 11(3): 223-228.
- Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. J Clin Invest 2005; 115(3): 500-508.
- Ebrahimzadeh MA, Gharekhani M, Ghorbani M, Dargany P. Effect of extract of aerial parts of Urtica (Urticaceae) on the stability of soybean oil. Trop J Pharm Res 2015; 14(1):

به گروه کنترل به طور معنی داری افزایش داد ($P < 0/01$). اثرات وابسته به دوز بود و در دوز 250 mg/kg اثری معادل پروپرانولول (20 mg/kg) از خود نشان داد ($P > 0/01$) (17). عصاره گل سیر در دوز 62/5 mg/kg تأثیری نداشت ($P > 0/05$) اما در دوز 125 mg/kg زمان زنده ماندن را افزایش داد ($P < 0/05$) (23).

مدل هیپوکسی خفگی یکی از مدل هایی است که شرایط کمبود اکسیژن را در سلول شبیه سازی می کند. در این تست فنی توئین به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. این دارو میزان فعالیت سلولی و مصرف اکسیژن و ATP را کم تر و مقاومت در برابر هیپوکسی را بیش تر می نماید (10). نتایج حاصل از مدل هیپوکسی خفگی در نمودار شماره 3 آمده است. عصاره حتی در دوز 62/5 mg/kg موثر بود و زمان مرگ را نسبت به گروه کنترل منفی افزایش داد ($P < 0/05$). عصاره در دوز 125 mg/kg اثری معادل فنی توئین که بعنوان کنترل مثبت به کار رفت از خود نشان داد ($29/82 \pm 2/37$ دقیقه در مقابل $29/60 \pm 1/51$ دقیقه برای گروه فنی توئین، ($P > 0/05$). در دوز 250 mg/kg عصاره قوی تر از فنی توئین بود ($P < 0/05$). فعالیت آنتی هیپوکسیک بسیار خوبی در مدل خفگی از *Hypericum scabrum* گزارش شده است. عصاره این گیاه در دوز 7/75 mg/kg زمان مرگ را در مدل خفگی از 26 دقیقه برای گروه کنترل به 33 دقیقه افزایش داد ($P < 0/001$) (18). عصاره گیاه تره در دوز 250 mg/kg به طور قابل ملاحظه ای نسبت به گروه کنترل زمان مرگ را به تعویق انداخت ($P < 0/001$) (21).

- 125-131 (Persian).
5. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM. Antioxidant activity of leaves and inflorescence of *Eryngium caucasicum* Trautv at flowering stage. *Pharmacog Res* 2009; 1(6): 435-439 (Persian).
 6. Ebrahimzadeh MA, Ehsanifar S, Eslami B. *Sambucus ebulus elburensis* fruits: A good source for antioxidants. *Pharmacognosy Magazine* 2009; 5(19): 213-218.
 7. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami Sh. Antioxidant and free radical scavenging activities of culinary-medicinal mushrooms, golden chanterelle *Cantharellus cibarius* and angel's wings *Pleurotus porrigens*. *Int J Med Mushrooms* 2010; 12(3): 265-272.
 8. 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.
 9. Khalili M, Ebrahimzadeh MA, Omrani F, Karami M. Antihypoxic activities of the golden chanterelle mushroom, *Cantharellus cibarius* (Higher Basidiomycetes). *Int J Med Mushrooms* 2014; 16(4): 339-344 (Persian).
 10. Khalili M, Dehdar T, Hamedi F, Ebrahimzadeh MA, Karami M. Antihypoxic activities of *Eryngium caucasicum* and *Urtica dioica*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015; 19(17): 3282-3285 (Persian).
 11. Khan ZA, Naqvi SAR, Mukhtar A, Hussain Z, Shahzad SA, Mansha A, et al. Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus Rosa-sinensis* Linn flower extracts. *Pak J Pharm Sci* 2014; 27(3): 469-474.
 12. Sheth F, De S. Evaluation of comparative antioxidant potential of four cultivars of *Hibiscus rosa-sinensis* L. by HPLC-DPPH method. *Free Radicals and Antioxidants* 2012; 2(4): 73-78.
 13. Al-Snafi AE. Chemical constituents, pharmacological effects and therapeutic importance of *Hibiscus rosa-sinensis*-A review. *Journal of Pharmacy* 2018; 8(7): 101-119.
 14. Agarwal S, Prakash R, Srivastava A, Mathur RM. Quantitative and qualitative analysis of phytochemicals, present in flower extract of *Hibiscus rosa sinensis*. *Int J Scientific Res* 2016; 5(7): 78-79.
 15. Purushothaman A, Meenatchi P, Saravanan S, Sundaram R, Saravanan N. Quantification of total phenolic content, HPLC analysis of flavonoids and assessment of antioxidant and anti-haemolytic activities of *Hibiscus rosa-sinensis* L. flowers in vitro. *Int J Pharma Res Health Sci* 2016; 4(5): 1342-1350.
 16. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B, Ehsanifar S. Antioxidant activity of *Hyoscyamus squarrosus* fruits. *Pharmacologyonline* 2009; 2: 644-650 (Persian).
 17. Hosseinzadeh MH, Ebrahimzadeh MA. Protective effects of ethanolic extract of Lemon Beebrush (*Aloysia citrodora*) leaf against hypoxia-induced lethality in mice. *Tabari Biomed Stu Res J* 2019; 1(4): 1-7 (Persian).
 18. Eslami B, Nabavi SF, Nabavi SM, Ebrahimzadeh MA, Mahmoudi M. Pharmacological activities of *hypericum scabrum* L. *Eur Rev Med Pharm Sci* 2011; 15(5): 532-537 (Persian).
 19. Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Mahmoudi M, Keyvani Rad S. Biological activities of *Juglans regia* flowers. *Braz J Pharmacog* 2011; 21(3): 465-470 (Persian).
 20. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM, Mahmoudi M, Eslami B, Dehpour AA. Biological and pharmacological effects of

- Delphinium elbursense. Afr J Biotechnol 2010; 9(34): 5548-5555.
21. 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).
 22. 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 (Persian).
 23. Shahbazee M, Mohammadyan M, Ebrahimzadeh MA. Antihypoxic Activities of Allium sativum Flower in Mice. J Mazandaran Uni Med Sci 2019; 29(175): 145-149.
 24. Shahnazi R, Ebrahimzadeh MA. Protective effects of methanolic extract of Vicia cracca against hypoxia-induced lethality in mice. Pharm Biomed Res 2017; 3(4): 14-17.