

ORIGINAL ARTICLE

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: Maceration 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 maceration 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^۲

محمد اقبالی^۳

محمد علی ابراهیم زاده^۴

دکتر عمران حبیبی^۵

احمد رمضانی^۶

امین بارانی^۷

چکیده

سابقه و هدف: نقش رادیکال‌های آزاد در ایجاد بیماری‌ها به خوبی اثبات شده است. این ذرات توانایی تخریب بیومولکول‌ها را دارند. آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند منع از اثرات زیان آور شوند. نظر به این که گیاهان منع 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 فعل اکسیژن می‌گردد، پس آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان آنتی‌هیپوکسی مطرح می‌باشند. بادرنجبویه (*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 تقویت‌کننده حافظه مورد استفاده می‌گردد. این مطالعه به منظور بررسی تأثیر روش استخراج بر محتوای تام فنلی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه طراحی شده است. فعالیت آنتی‌هیپوکسی تمامی عصاره‌ها در سه مدل در موش بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، اندام هوایی خشک شده بادرنجبویه به سه روش ماسیراسیون، با کمک سوکله و با کمک امواج التراسوئیک با حلال متانول عصاره گیری شدند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی تمامی عصاره‌ها با روش بدام اندازی رادیکال آزاد DPPH و تست احیا کنندگی ارزیابی شد. محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی تعیین گردید. اثر حافظتی عصاره‌ها در دورهای 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 اندازه گیری شد. کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران نیز پروتکل آزمایشی را تایید کرد. در تست هیپوکسی خفگی، فنی توثیق (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 مشیت 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 نرمافزار گراف پد پریزم ۸ به منظور تعیین اختلاف بین میانگین‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: برای استخراج ترکیبات پلی فنلی، روش خیساندن و عصاره گیری به روش التراسوئیک (P<۰/۰۰۰۱) و در تست بدام اندازی رادیکال آزاد DPPH عصاره‌های حاصل از روش سوکله و خیساندن موثر از روش دیگر بودند. در تست قدرت احیا کنندگی، تمامی عصاره فعالیت بالایی از خود نشان دادند (P<۰/۰۵). در مدل خونی، هیچ یک از عصاره‌ها اثری از خود نشان ندادند. حتی عصاره حاصل از روش سوکله در دوز ۶۲/۵ mg/kg ایجاد کنندگی (P<۰/۰۵). در مدل گردش خونی، هیچ یک از عصاره‌ها در پایین ترین 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 اثری از خود نشان ندادند. حتی عصاره حاصل از روش سوکله در دوز ۲۵۰ mg/kg ایجاد کنندگی (P<۰/۰۵). در مدل خونی، هیچ یک از عصاره‌ها اثری 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 سوکله و روش التراسوئیک در دوز ۷/۸۱ mg/kg اثری مشابه فنی توثیق از خود نشان داد (P<۰/۰۵).

استنتاج: با توجه به نتایج این مطالعه مشخص شد که روش استخراج تأثیر زیادی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی دارد. روش استخراج با کمک التراسوئیک و روش خیساندن به ترتیب مناسب ترین 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: بادرنجبویه، روش استخراج، آنتی‌اکسیدان، آنتی‌هیپوکسی، هیپوکسی خفگی، هیپوکسی گردش خونی، هیپوکسی خونی

مولو مسئول: محمدعلی ابراهیم زاده-ساری، کلیومن ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پایمر اعظم، مرکز تحقیقات علوم دارویی دانشجوی داروسازی، کمیته تحقیقات دانشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۱. دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. دکتر داروسازی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دستاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. دانشیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۵. دانشیار شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، 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

۸. تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۱۰/۱۳ تاریخ تصویب: ۱۴۰۲/۱۰/۱۲

مقدمه

دسته ترکیبات موجود در گیاه، آلالوئیدها، تانن‌ها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها و ترکیبات فنلی هستند(۸-۱۰). تنوع این مولکول‌های زیست فعال آن‌ها را به یک نامزد امیدوار کننده برای توسعه مواد غذای و آرایشی تبدیل می‌کند(۹). رزمارینیک اسید، اسید اورسو لیک و اسید اولثانولیک از اندام‌های هوایی بادرنجبویه جدا شده است(۱۱). اسید کافینیک، 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 کافینیک، اسید رزمارینیک، اسید الاظیک، روتین، ایزوکورسیترین، کوئرستین و کامفرون 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 کم ترین قیمت به دست آید(۲).

در این تحقیق عمل استخراج با روش کلاسیک (ماسیراسیون)، استفاده از حمام الترا سوند 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 روش ها

نمونه گیاهی

در این مطالعه تجربی، اندام هوایی گیاه بادرنجبویه

نقش رادیکال‌های آزاد در ایجاد بسیاری از بیماری‌ها به خوبی اثبات شده است. برخی واکنش‌های بیوشیمیابی 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 بدین‌وسیله 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(۲، ۱). 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 سکته 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). اخیرا 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. مهم‌ترین

عصاره تهیه شد. ۰/۵ میلی لیتر از هر عصاره با ۲/۵ میلی لیتر واکنشگر ۰/۲ نرمال فولین سیو کالیو 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 نمونه‌ها پس از ۲ ساعت در دمای اتاق توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر ماوراء بنتش در ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری 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 ۱/۰ میلی لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد به آن اضافه شد، سپس ۰/۱ میلی لیتر از محلول پتاسیم استات ۱ مولار و در نهایت ۳۰ ۰/۸ میلی لیتر آب مقطر هم به آن اضافه شد. به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و سپس جذب محلوت حاصل در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مرئی - ماوراء بنتش اندازه‌گیری شد. کوئرستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید به صورت میلی گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره گزارش گردید. آزمایشات ۳ بار تکرار شد و میانگین آن‌ها گزارش شد.^(۱۶)

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

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 روش‌های، 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.^(۲۱)

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 حلal 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 متند فولین سیو کالیو صورت پذیرفت. غلظت ۱ mg/ml از هر

سوری با وزن ۲۱-۲۵ گرم قرار داده شد، در قفسه‌های مجزا تحت وضعیت کنترل شده درجه حرارت (بین ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) و روشنایی (دوره‌ای 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 دستورالعمل‌های موسسه ملی بهداشت (NIH) درخصوص 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 عصاره‌های حاصل از روش‌های خسیاندن، سوکسله والتراسونیک 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 شیشه‌ای دربسته و مهر و مومن شده توسط پارافیلم (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 دربسته کوچک، نقشی در مرگ موش‌ها نداشته باشد. موش‌ها بر اثر هیپوکسی تشنج گرفته و مردند. اثر ضد‌هیپوکسی ترکیب به صورت زمان زنده‌بودن موش بیان گردید. نرمال سالین به عنوان کنترل منفی و فنی تئوین (۵۰ mg/kg به صورت تزریق داخل صفاقی) به عنوان کنترل مثبت به کار رفت (۶،۵).

هیپوکسی خونی
از نیتریت سدیم به عنوان عامل ایجاد کننده هیپوکسی استفاده شد. دوزهای ۲۵۰، ۱۲۵ و ۶۲/۵ mg/kg از عصاره‌های حاصل از روش‌های خسیاندن، سوکسله والتراسونیک به کار رفت. ۳۰ دقیقه بعد از تزریق داخل

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 داماندازی رادیکال DPPH طبق فرمول زیر محاسبه شد:

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

= جذب بلانک، A_B

= جذب نمونه یا استاندارد (۱۷)

تعیین قدرت احیاء کنندگی
میزان قدرت احیاء کنندگی عصاره‌ها از طریق متندگارش شده قبلی ارزیابی شد. غلظت‌های مختلف از هر عصاره تهیه شد و با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفاته ۰/۲ مولار با ۶/۵ pH و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد پتابسیم فری سیانید [K₃Fe(CN)₆] مخلوط شد. در دمای ۵۰ درجه به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد، سپس ۲/۵ میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر از قسمت بالای محلول با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد فریکلراید به آن اضافه شد. سپس جذب محلول در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. در این آزمایش آسکوربیک اسید با غلظت‌های 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 موش‌های سوری نر با سن حدود ۹ تا ۱۰ هفته‌ای که از بخش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تهیه شده بود، استفاده گردید. گروه‌های مورد مطالعه که در هر گروه ۵ سر موش

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

جدول شماره ۱: محتوای تام فنولی و تام فلاونوئیدی موجود در عصاره‌های بادرنجبویه به روش‌های مختلف استخراج با حلال متابول

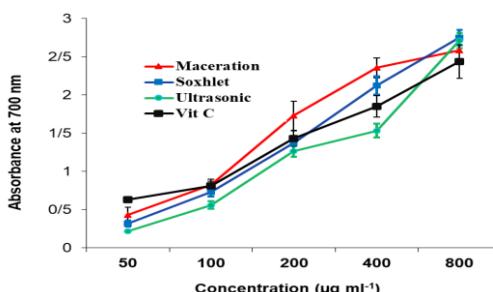
محبوبی فلاونوئیدی ^b	محبوبی فنلی ^a	روش استخراج
۷۱/۰۲ ± ۳/۱۳	۴۷۵/۳۲ ± ۱۰/۰۹	روش سوکسله
**** ۱۰۰/۳۹ ± ۳/۰۴	**** ۵۸۷/۰۵ ± ۸/۶۷	روش اولتراسونیک
**** ۱۱۴/۳۸ ± ۱/۵۷	**** ۵۶۴/۳۳ ± ۶/۹۸	روش ماسیراسیون

^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 عصاره‌گیری 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 عصاره‌های مختلف از بادرنجبویه به صورت مقادیر IC₅₀ بیان شده است. بر این اساس، میزان IC₅₀ برای روش سوکسله ۳۸/۱۶±۲/۰۵، برای روش اولتراسونیک ۴۴/۴۵±۱/۸۷ و برای روش ماسیراسیون ۳۸/۳۴±۱/۳۶ میکرو گرم بر میلی لیتر به دست آمد. در سنجش فعالیت به دام اندازی رادیکال ازاد DPPH، از BHA به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. مقدار IC₅₀ برای BHA ۵۳/۹ میکرو گرم بر میلی لیتر محاسبه شد. تأثیر روش استخراج بر قدرت احیا کنندگی توسط عصاره‌های مختلف بادرنجبویه در غلظت‌های مختلف در نمودار شماره ۱ رسم شده است.



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

صفاقی دوزهای مورد نظر از هر عصاره به موش، NaNO₂ با دوز ۳۶۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی تزریق شد. اثر ضد هیپوکسی به صورت زمان زنده ماندن در مقایسه با گروه کنترل منفی (نرمال سالین) بیان گردید. در این تست پروپرانولول (۲۰ 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 ۲۵۰، ۲۵۰ و ۶۲/۵ mg/kg از عصاره‌های حاصل از روش‌های خیساندن، سوکسله والتراسونیک به کار رفت. ۳۰ دقیقه بعد از تزریق داخل صفاقی دوزهای مورد نظر از هر عصاره به هر موش، NaF با دوز ۱۵۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی 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 ۲۰ و ۳۰ mg/kg به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۶،۵).

آنالیز آماری

کلیه اطلاعات به صورت Mean ± SD گزارش شد. آنالیز واریانس یک سویه (ANOVA) و متعاقب آن Newman-Keuls multiple comparisons test مقایسه میانگین‌ها به کار رفت. نتایج با احتمال P<0.05 معنی دار در نظر گرفته شد. برای انجام برنامه‌های آماری از برنامه گراف پد پریزم ۸ (GraphPad Prism 8) استفاده شد. مقادیر IC₅₀ از روی رگرسیون خطی بین درصد مهار و غلظت‌های مربوطه به دست آمد.

یافته‌ها

بازده عصاره‌ها

راندمان عصاره‌گیری به روش اولتراسونیک، ۷/۵، عصاره‌گیری به روش خیساندن ۱۲ و عصاره‌گیری به روش سوکسله ۱۹/۴ درصد به دست آمد. جدول شماره ۱

برای گروه کنترل به $16/48 \pm 1/98$ دقیقه افزایش داد ($P < 0.001$). هر سه عصاره در بالاترین دوز و پایین ترین دوز تست شده خود، اثر یکسانی از خود نشان دادند و هیچ اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد ($P > 0.05$).

بررسی اثرات آنتی‌هیپوکسی وابسته به گردش خون نتایج حاصل از تزریق سدیم فلوراید به میزان ۱۵، ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به دریافت کنندگان عصاره‌های حاصل از روش‌های خسیاندن، سوکسله والتراسونیک 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 آنتی‌هیپوکسی عصاره‌های حاصل از روش‌های خسیاندن، سوکسله والتراسونیک در مدل وابسته به گردش خون در

موش سوری نر		انحراف معیار \pm میانگین (دقیقه)		ترکیب/روش استخراج	دوز mg/kg	نرمال سالیں
$9/22 \pm 0/91$		۰/۵ ml		خسیاندن	۶۲/۵	$9/46 \pm 1/39$ ns
$9/14 \pm 1/39$ ns		۶۲/۵		خسیاندن	۱۲۵	$17/82 \pm 2/76$ ****
$19/59 \pm 0/81$ ***		۲۵۰		خسیاندن	۲۵۰	$9/29 \pm 1/36$ ns
$10/12 \pm 0/46$ ns		۶۲/۵		سوکسله	۶۲/۵	$10/17 \pm 1/41$ ***
$9/68 \pm 0/81$ ns		۶۲/۵		سوکسله	۱۲۵	$9/86 \pm 2/30$ ns
$18/64 \pm 0/46$ ***		۱۲۵		التراسونیک	۱۲۵	$12/76 \pm 0/18$ **
$15/91 \pm 1/77$ ***		۷۵		التراسونیک	۲۰	$16/48 \pm 1/98$ ***
		۳۰		پروپرانولول	۲۰	

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

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

ns: not significant

هیچ‌یک از عصاره‌ها در پایین ترین دوز تست شده اثری در مدل هیپوکسی گردش خونی از خود نشان نداد اما تمامی عصاره‌ها در دوزهای بالاتر اثر بسیار قوی در این مدل هیپوکسی از خود نشان دادند. اگرچه عصاره حاصل از روش خسیاندن در پایین ترین دوز تست شده، kg/62/5 mg، تاثیری بر افزایش بقاء

تمامی عصاره و ویتامین ث تقریبا در تمامی غلظت‌های تست شده، اثر مشابه‌ای داشتند ($P > 0.05$) تنها در دوز ۴۰۰ µg/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 آنتی‌هیپوکسی خونی نتایج حاصل از تزریق نیتریت سدیم NaNO₂ به میزان ۳۶۰ 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 آنتی‌هیپوکسی عصاره‌های حاصل از روش‌های خسیاندن، سوکسله والتراسونیک در مدل هیپوکسی خونی در موش سوری نر

ترکیب/روش استخراج	دوز mg/kg	انحراف معیار \pm میانگین (دقیقه)	نرمال سالیں
خسیاندن	۶۲/۵	$9/66 \pm 0/86$	نرمال سالیں
خسیاندن	۱۲۵	$9/46 \pm 0/30$ ns	خسیاندن
خسیاندن	۲۵۰	$9/43 \pm 0/65$ ns	خسیاندن
سوکسله	۶۲/۵	$9/80 \pm 0/27$ ns	خسیاندن
سوکسله	۱۲۵	$9/58 \pm 1/49$ ns	سوکسله
سوکسله	۲۵۰	$10/10 \pm 0/58$ ns	سوکسله
سوکسله	۶۲/۵	$10/59 \pm 1/99$ ns	سوکسله
التراسونیک	۱۲۵	$9/88 \pm 1/16$ ns	التراسونیک
التراسونیک	۲۵۰	$9/96 \pm 1/98$ ns	التراسونیک
التراسونیک	۲۰	$10/21 \pm 1/19$ ns	التراسونیک
پروپرانولول	۲۰	$16/48 \pm 1/98$ ***	پروپرانولول

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

****: $P < 0.0001$

ns: not significant

هیچ‌یک از عصاره‌ها در این تست اثری از خود نشان نداد. حتی عصاره حاصل از روش سوکسله که در بالاترین دوز تست شده خود، یعنی kg/250 mg، 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 kg/20 mg، به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. در این دوز، پروپرانولول به طور معنی‌داری زمان مرگ را از $9/66 \pm 0/86$ دقیقه

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

ترکیب میانگین (دقیقه)	انحراف معیار ± میانگین	دوز mg/kg	دوز ml	روش استخراج
۲۰/۱۱ ± ۲/۶	۰/۵	نرمال سالین		
۲۰/۵۱ ± ۱/۷ ^{ns}	۰/۹۸	خسیناندن		
۲۶/۷۵ ± ۲/۱۵****	۱/۹۵	خسیناندن		
۲۷/۶۹ ± ۲/۴۲****	۳/۹۰	خسیناندن		
۲۸/۳۱ ± ۱/۹۸****	۷/۸۱	خسیناندن		
۲۸/۵۳ ± ۲/۰۵****	۱۵/۶۲	خسیناندن		
۳۱/۳۷ ± ۲/۰۷****	۳۱/۲۵	خسیناندن		
۳۱/۱۲ ± ۱/۹۸ ^{ns}	۳/۹۰	سوکسله		
۲۹/۵۴ ± ۲/۱۸****	۷/۸۱	سوکسله		
۳۰/۳۰ ± ۲/۲۴****	۱۵/۶۲	سوکسله		
۳۱/۶۰ ± ۲/۳۷****	۳۱/۱۵	سوکسله		
۲۱/۱۰ ± ۲/۳۱ ^{ns}	۱/۹۵	التراسونیک		
۲۵/۴۴ ± ۲/۱۸****	۳/۹۰	التراسونیک		
۲۷/۵۶ ± ۱/۵۵****	۷/۸۱	التراسونیک		
۲۸/۷۷ ± ۲/۱۴****	۱۵/۶۲	التراسونیک		
۳۲/۱۰ ± ۱/۹۵****	۳۱/۲۵	التراسونیک		
۲۹/۶۰ ± ۱/۳۴****	۵۰	فنا توین		

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

: P<0/05, *: P<0/01, ****: P<0/001

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 خسیناندن در دوز mg/kg ۱/۹۰، تاثیری زیادی بر افزایش بقاء موش‌های سوری داشت و به طور معنی‌داری زمان مرگ را از ۲۰/۱۱±۲/۲۶ دقیقه برای گروه کنترل به ۲۶/۷۵±۲/۲۵ دقیقه افزایش داد (P<0/001). در دوز mg/kg ۳/۹۰ زمان بقا ۲۷/۶۹±۲/۴۲ دقیقه بود (P<0/0001). عصاره حاصل از روش سوکسله در دوز mg/kg ۷/۸۱ به طور معنی‌داری زمان مرگ را به ۲۹/۵۴±۲/۱۸ دقیقه افزایش داد (P<0/0001). با افزایش دوز به ۳۱/۲۵ mg/kg زمان زنده ماندن ۲ دقیقه بیشتر شد و به ۳۱/۶۰±۳/۴۳ دقیقه رسید (P<0/0001). عصاره حاصل از روش التراسونیک در دوز mg/kg ۳/۹۰ به طور معنی‌داری زمان مرگ را به ۲۵/۴۴±۲/۴۸ دقیقه افزایش داد (P<0/0001). با هر افزایش دوز به دو برابر، زمان بقاء در موش‌های سوری نر تقریباً ۲ دقیقه افزایش یافت. در دوز mg/kg ۳۱/۲۵ زمان زنده ماندن به ۳۲/۱۰±۱/۹۶

موش‌های سوری نداشت در دوز mg/kg ۱۲۵، به طور معنی‌داری زمان مرگ را از ۹/۲۲±۰/۹۱ دقیقه برای گروه کنترل به ۱۷/۸۲±۲/۷۶ دقیقه افزایش داد (P<0/0001). در دوز بالاتر، اثر بهتری مشاهده شد. در این دوز زمان بقا ۱۹/۵۹±۰/۸۱ دقیقه بود (P<0/0001). عصاره‌های حاصل از روش‌های سوکسله و التراسونیک در دوز mg/kg ۲۵۰، به طور معنی‌داری زمان مرگ را به ۲۳/۱۷±۱/۹۱ دقیقه افزایش دادند (P<0/0001). در این تست پروپرانولول در دوزهای ۲۰ و ۳۰ mg/kg به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. پروپرانولول در دوز ۲۰، موجب افزایش زمان مرگ در موش‌ها شد (۱۲/۷۶±۰/۸۸ دقیقه). این افزایش از نظر آماری نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود (P<0/01). پروپرانولول در دوز ۳۰ mg/kg زنده ماندن موش‌ها را به ۱۵/۹۱±۱/۷۷ دقیقه افزایش داد (P<0/0001). عصاره حاصل از روش خسیناندن در دوز mg/kg ۱۲۵ اثری مشابه پروپرانولول (P>0/05). تمامی عصاره‌ها در دوز خود نشان داد (P>0/05). تمامی عصاره‌ها در دوز ۲۵۰ اثری به مراتب قوی‌تر از پروپرانولول ۳۰ mg/kg از خود نشان دادند. هر سه عصاره در پایین ترین 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، عصاره حاصل از روش سوکسله به مراتب قوی‌تر از عصاره‌های حاصل از روش‌های خسیناندن و التراسونیک بود (P<0/001).

بررسی اثرات آنتی هیپوکسی خنگی نتایج حاصل از شرایط کمبود اکسیژن برای تست خنگی در خصوص عصاره‌های حاصل از روش‌های خسیناندن، 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 تشننج و سپس مرگ می‌شود را نمایش می‌دهد.

بسیار واکنش‌پذیر هستند که از اکسیژن مشتق شده و توسط برخی فرآیندهای متابولیک طبیعی تولید می‌شوند^(۱۸). آنتیاکسیدان‌های طبیعی موجود در گیاهان برای محافظت از انسان در برابر رادیکال‌های آزاد و پیشگیری از بروخی بیمارها به خوبی شناخته شده هستند. بادرنجبویه به طور سنتی برای اثرات آن بر سیستم عصبی استفاده می‌شود^(۱۹). در این تحقیق سه عصاره با سه روش مختلف تهیه شد. عصاره با کمک سوکسله با ۱۹/۴ درصد بالاترین راندمان استخراج را داشت. نظر به چرخش حلال تازه در این روش و استفاده همزمان از دما، بیشتر بودن راندمان استخراج منطقی است. عصاره با کمک التراسونیک بالاترین مقدار ترکیبات پلیفنولی را داشت. عصاره حاصل از روش خیساندن بالاترین مقدار فلاونوئید تام را دارا بود. فعالیت آنتیاکسیدانی گیاهان را می‌توان عمدتاً به حضور ترکیبات فنولی در آن نسبت داد. فعالیت‌های بیولوژیکی زیادی از جمله، فعالیت ضدقارچی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد التهاب، ضد آرلرژی و گشادکننده عروق از این ترکیبات گزارش شده است^(۲۰). روند استخراج یک عامل مهم در تعیین خصوصیات آنتیاکسیدانی عصاره است. دما، حلال، زمان عصاره‌گیری، قدرت استخراج و روش استخراج تاثیر بارزی در محتویات عصاره خواهد گذاشت. تکنیک‌های پیشرفته استخراج مانند عصاره‌گیری به کمک اولتراسوند از طریق افزایش کارایی و انتخابیت، موجب غلبه بر مشکلات روش‌های قدیمی شده است^(۲۱). در مطالعه‌ای به منظور عصاره‌گیری از گیاه *Mesembryanthemum edule*، از روش استخراج اولتراسونیک استفاده شد. نتایج نشان داد که نوع حلال تاثیر زیادی بر محتوای فنولی و فعالیت آنتیاکسیدانی دارد. عصاره متابولی حاوی مقدار قابل توجهی ترکیبات پلیفنولی نسبت به عصاره اتانولی بود^(۲۲). نتایج یک پژوهش بر روی گل آذین زولنگ نشان داد که مواد فنولی بیشتری در عصاره حاصل از روش سوکسله نسبت به روش‌های التراسونیک و خیساندن وجود

دقیقه رسید^(P<0.0001). در این مدل، فنی‌توئین ۵۰ mg/kg به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. زنده ماندن ۲۹/۶۰±۱/۳۴ دقیقه بود که تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل داشت^(P<0.0001). عصاره حاصل از روش خیساندن در دوز ۱/۹۵ mg/kg اثربخشی مشابه فنی‌توئین از خود نشان داد^(P>0.05). در دوز ۳۱/۲۵ mg/kg اگرچه زمان زنده ماندن موس‌ها را ۲ دقیقه بیشتر از فنی‌توئین افزایش داد، اما از نظر آماری تفاوتی بین آن‌ها مشاهده نشد^(P>0.05). عصاره حاصل از روش سوکسله در دوز ۷/۸۱ mg/kg اثربخشی مشابه فنی‌توئین از خود نشان داد^(P>0.05). اگرچه این عصاره هم در دوز ۳۱/۲۵ mg/kg زمان زنده ماندن موس‌ها را ۲ دقیقه بیشتر از فنی‌توئین افزایش داد، اما از نظر آماری تفاوتی بین آن‌ها نیز مشاهده نشد^(P>0.05). عصاره حاصل از روش التراسونیک در دوز ۷/۸۱ mg/kg اثربخشی مشابه فنی‌توئین از خود نشان داد^(P>0.05). اگرچه این عصاره هم در دوز ۳۱/۲۵ mg/kg زمان زنده ماندن موس‌ها را ۲/۵ دقیقه بیشتر از فنی‌توئین افزایش داد، اما از نظر آماری تفاوتی بین آن‌ها نیز مشاهده نشد^(P>0.05). عصاره حاصل از روش خیساندن حتی در دوز ۱/۹۵ mg/kg اثربخشی نداشتند. در پایین‌ترین دوز مشترک، ۳/۹۰ mg/kg اثربخشی نداشتند. در این دوز سایر عصاره‌ها، اگرچه عصاره حاصل از روش خیساندن ۲ دقیقه زمان مرگ را نسبت به عصاره حاصل از روش التراسونیک، بیشتر افزایش داد، اما اختلاف معنی‌داری بین این دوز در این عصاره مشاهده نشد^(P>0.05). اما هر دو عصاره به طور معنی‌داری از عصاره حاصل از روش سوکسله قوی‌تر بودند. در بالاترین دوز مشترک، ۳۱/۲۵ mg/kg هر سه عصاره اثربخشی از خود نشان دادند و هیچ اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد^(P>0.05).

بحث

ذرات اکسیژن فعال (ROS) دسته‌ای از مولکول‌های

که روش‌های سوکسله و اولتراسوند در استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئید موثرتر از روش کلاسیک خیساندن عمل می‌کنند. بنابراین روش ارجح در استخراج این ترکیبات فعال بیولوژیک در این گیاه می‌باشدند. میزان فلاونوئید تام در این مقاله، ۱۱/۹ تا ۱۸/۶۵ میلی‌گرم فلاونوئید 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 فلاونوئید 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 IC₅₀ حاصل از سه روش سوکسله، ماسیراسیون و اولتراسوند برای به دام اندازی رادیکال DPPH به ترتیب برابر برابر ۸۳/۱ و ۱۷۷/۳ و ۱۸۸/۷ میکرو‌گرم در میلی‌لیتر 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 بیش‌تر فنولی (به ترتیب سوکسله، خیساندن و التراسونیک)، فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری از خود نشان دادند^(۲۳). قدرت احیاکنندگی به عنوان ساختاری 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 اندازه‌گیری است. افزایش جذب در این طول موج نشان از افزایش توانایی احیاکنندگی می‌باشد. در تحقیق حاضر، روش استخراج تاثیری بر فعالیت احیاکنندگی عصاره‌ها نداشت. تمامی

دارد^(۲۳). گزارشات متعددی از به کار گیری روش استخراج با کمک التراسونیک در استخراج مواد مختلف از قبیل ایزوفلافون‌ها از ریشه *Radix puerariae*, هسپریدین از پوست *Citrus reticulata*, پلی‌ساقاریدها 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 فلاونوئیدی گیاه سیاه ولیک مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آنتی اکسیدانی فراکسیون پلی‌فنولی و اولتراسونیک با چهار تست آنتی اکسیدانی مختلف به صورت برونتی ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که عصاره حاصل از روش اولتراسونیک در تست‌های DPPH، به دام اندازی هیدروژن پراکسید و شلات کردن Fe²⁺ 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 زغفران خزری *Crocus caspius* انجام شد. روش‌های استخراج شامل اولتراسونیک، پرکولاسیون و فراکسیون پلی‌فنولی بود. عصاره اولتراسونیک دارای بیش‌ترین میزان فنول و فلاونوئید بود، در تست DPPH و به دام اندازی H₂O₂ 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 عملده 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 هم‌چنین نشان داد

آسیب مغزی ایسکمیک اغلب باعث آسیب عصبی غیر قابل برگشت می‌شود. آبشار حوادثی که منجر به آسیب عصبی و مرگ در ایسکمی می‌شود شامل التهاب، ادم، آپوپتوz 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 میانجی گری می‌کنند. بادرنجبویه به عنوان یک گیاه گیاهی مفید در پیشگیری از بیماری‌های عصبی مختلف مانند آلزایمر که با استرس اکسیداتیو مرتبط است، در نظر گرفته می‌شود (۱۹).

در مطالعه حاضر فعالیت آنتی‌هیپوکسی 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 $1/۹۰$ mg/kg، تاثیری زیادی بر افزایش بقاء موش‌های سوری داشت و به طور معنی‌داری زمان مرگ را افزایش داد ($P<0.001$). در دوز $3/۹۰$ mg/kg، اثر بهتری مشاهده شد. عصاره حاصل از روش سوکسله در دوز $7/۸۱$ mg/kg، به طور معنی‌داری زمان مرگ را افزایش داد ($P<0.001$). عصاره حاصل از روش التراسونیک در دوز $3/۹۰$ mg/kg، موثر بود ($P<0.001$). در این مدل، فنی تؤین 50 mg/kg به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. فنی تؤین میزان مصرف اکسیژن، فعالیت سلولی و مصرف ATP را کم و مقاومت سلولی را در برابر ایجاد هایپوکسی بیشتر می‌کند (۳۵).

عصاره حاصل از روش سوکسله و التراسونیک در دوز $7/۸۱$ mg/kg اثری مشابه فنی تؤین از خود نشان دادند ($P>0.05$) (جدول شماره ۴). در گزارش‌های پیشین، عصاره برگ مورد و عصاره گل سیر در دوز 125 mg/kg نیز توانسته بودند، زمان زنده ماندن موش‌ها را در حد فنی تؤین افزایش دهند (۳۷،۳۶). اما اثرات قابل توجهی در این مدل از برخی گیاهان مانند سیاه ولیک و

عصاره و ویتامین ث تقریباً در تمامی غلظت‌های تست شده، اشر مشابه‌ای داشتند ($P>0.05$). هدف از یک مطالعه تعیین پلیفنل‌ها و فلاونوئیدهای بادرنجبویه بود. بدین منظور عصاره متابولی از اندام هوایی گیاه تهیه شد و محتوای تام فنلی و محتوای تام فلاونوئید به روش رنگ‌سنگی ارزیابی شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز توسط فعالیت مهار رادیکال DPPH برآورد شد. محتوای فنول تام و فلاونوئیدهای تام عصاره اتیل استات به ترتیب $142/50$ میلی گرم (dw) GAE/g و $124/96$ میلی گرم DW QE/g بود (۲۷). نقش و اهمیت هایپوکسی به عنوان یک عامل مهم در پاتوتیزی برخی بیماری‌ها مانند پلی‌سیتیمی، اختلالات قلبی ریوی و کووید-۱۹ اثبات شده است (۲۹،۲۸). هایپوکسی 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. هایپوکسی به عنوان یک ریسک فاکتور در تشخیص برخی سرطان‌ها از قبیل سر و گردن شناخته می‌شود (۳۰). بر این اساس ترکیبات آنتی‌هایپوکسیک 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 آنتی‌هایپوکسی خوبی دارند و بنابراین پتانسیل استفاده در درمان محدوده وسیعی از بیماری‌ها را دارند (۳۲). تاثیر دگراماتازون 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 دگراماتازون به عنوان یک آنتی‌هایپوکسی، و پیشنهاد استفاده از آنتی‌هایپوکسی‌ها در درمان کووید-۱۹ بود. با این رویکرد، فعالیت بالای آنتی‌هایپوکسی دگراماتازون به عنوان یکی از مکانیسم‌های احتمالی عملکرد این دارو در درمان کووید-۱۹ گزارش شد (۳۳).

نشان ندادند، اما تمامی عصاره‌ها در دوزهای بالاتر اثر بسیار قوی داشتند. عصاره حاصل از روش خیساندن در دوز 125 mg/kg ، به طور معنی داری زمان مرگ را افزایش داد ($P<0.0001$). در دوز بالاتر، اثر بهتری مشاهده شد. عصاره‌های حاصل از روش‌های سوکسله و التراسونیک در دوز 250 mg/kg ، به طور معنی داری زمان مرگ را افزایش دادند ($P<0.0001$). در این تست پروپرانولول به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. در دوز 20 mg/kg به عنوان کنترل مثبت به اکسیژن با تمایل پیش‌تر از طریق تبدیل هموگلوبین به متهموگلوبین اکسیژن از گردد ($P<0.05$). 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 ($P<0.05$). 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 ($P<0.001$). در این مدل، عصاره اتانولی اندام هوایی *Delphinium elbursense* و عصاره متانولی بامیه در دوز 1000 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 ($P<0.001$). همچنین فراکسیون پلی‌فنولی گل آذین زولنگ در دوز 400 mg/kg و عصاره متانولی اندام هوایی گیاه گزنه در دوز 300 mg/kg و عصاره متانولی برگ گیاه پلم در دوز $62/5\text{ mg/kg}$ ($P<0.001$) اثرات قابل توجهی از خود نشان دادند ($P<0.001$).

سرخ ولیک حتی تا دوزهای 400 mg/kg مشاهده نشده است ($P<0.001$). 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 250 mg/kg ، علی‌رغم این که زمان مرگ را حدود یک دقیقه افزایش داد، نتوانست تغییر معنی داری ایجاد کند ($P>0.05$). در این تست پروپرانولول در دوز 20 mg/kg به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. در این مدل، سدیم نیتریت نسبت به اکسیژن با تمایل پیش‌تری به هموگلوبین متصل شده و ظرفیت حمل اکسیژن از طریق تبدیل هموگلوبین به متهموگلوبین کاهش پیدا می‌کند. در نتیجه اکسیژن رسانی به بافت‌ها چهار اختلال شده و این فرایند سبب مرگ جاندار می‌گردد ($P<0.05$). 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 ($P<0.05$). 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 ($P<0.001$). در این مدل، عصاره اتانولی اندام هوایی *Hypericum scabrum* در دوز $31/25\text{ mg/kg}$ فعالیت آنتی هیپوکسی از خود نشان دادند ($P<0.001$).

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

گرفت. تأثیر روش استخراج بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن بررسی شد. بالاترین راندمان استخراج مربوط سوکسله بود. روش‌های التراسونیک و خیساندن به ترتیب مناسب‌ترین روش‌ها 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 عصاره‌ها اثرات خوب آنتی‌اکسیدانی بالای نشان داده و اثر آن‌ها مشابه بود. عصاره‌ها اثرات محافظتی بسیار خوبی در افزایش زمان زندگانی موش‌های سوری در تست خفگی از خود نشان دادند. عدم تعیین مقدار یک یا چند فاکتورهای اصلی نشان‌دهنده هایپوکسی مانند مقدار اشباع اکسیژن یا بیان فاکتور القا شده با هایپوکسی به عنوان یکی از محدودیت‌های کار حاضر اعلام می‌گردد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌های دانشجویی دکترای داروسازی به شماره (کد طرح ۴۹۷۵) می‌باشد که بدین‌وسیله از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تشکر می‌گردد.

References

- 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).
- Majidaee E, Hosseyni 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).
- Ataei 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).
- Armstrong D. Advanced Protocols in Oxidative Stress II. In: Methods in Molecular Biology. İstanbul: Humana Press; 2010. p. 28.
- 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.

مطالعه‌ای به منظور بررسی اثر محافظتی بادرنجبویه در مدل برون تنی هیپوکسی و همچنین توانایی محافظتی تجویز قبل و بعد از ایسکمی و سپس خون رسانی مجدد در نورون‌های هیپوکامپ به عنوان یک مدل درون تنی انجام شد. در این مطالعه سنجش سمیت سلولی، محافظت قابل توجهی از دوز $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ بادرنجبویه در برابر هیپوکسی در نورون‌های کشت شده نشان داد که با رنگ‌آمیزی معمولی تأیید شد. تیمار با انسانس گیاه فعالیت کاسپار ۳ را به طور معنی‌داری کاهش داد. این انسانس همچنین سطح مالون دی آلدید را مهار کرده و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در هیپوکامپ را بهبود داد. سطوح mRNA سیتوکین‌های التهابی α , β , TNF- α , IL-1 β و HIF-1 α پس از ایسکمی به شدت افزایش یافت و مواجهه با بادرنجبویه به طور قابل توجهی بیان ژن HIF-1 α را سرکوب کرد. نتایج این تحقیق نشان داد که بادرنجبویه می‌تواند به عنوان یک عامل محافظ در بیماری‌های عصبی مختلف مرتبط با آسیب ایسکمیک مغزی در نظر گرفته شود(۱۹). در این تحقیق فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره حاصل از روش خیساندن، عصاره به کمک التراسونیک و عصاره با کمک سوکسله اندام هوایی گیاه بادرنجبویه با حلal مтанول مورد ارزیابی قرار

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. *Cancer 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. Vilkha 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, Yepez 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.