Research Paper

The Effect of Hydroethanolic Extract of Pomegranate Peels and High-intense Interval Training on C-reactive Protein, Catalase and Superoxide Dismutase in Rats

*Farah Nameni[1], Roya Aliakbar Alavi[1]

1. Department of Sports Physiology, Varamin Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Nameni F, Aliakbar Alavi R. [The Effect of Hydroethanolic Extract of Pomegranate Peels and High-intense Interval Training on C-reactive Protein, Catalase and Superoxide Dismutase in Rats (Persian)]. Quarterly of "The Horizon of Medical Sciences". 2021; 27(2):182-197. https://doi.org/10.32598/hms.27.2.1303.2

https://doi.org/10.32598/hms.27.2.1303.2

CC BY NC

Received: 10 Jul 2020
Accepted: 16 Nov 2020
Available Online: 01 Apr 2021

Keywords:
Interval training, Inflammation, Antioxidant enzyme, Pomegranate supplementation

ABSTRACT

Aims Heavy exercise can damage the immune system by oxidative stress. The role of herbal supplements during and after strenuous exercise is unknown. Therefore, the present study aimed to determine hydroethanolic extract of pomegranate peels and a period of high-intensity interval training on the C-reactive protein and antioxidant enzyme activity in rats.

Methods & Materials This research was an experimental study. The statistical population was rats, of which 36 Wistar rats were randomly selected and were divided into 4 groups (control, hydroethanolic extract of pomegranate peels, high-intensity interval training, and hydroethanolic extract of pomegranate peels + high-intensity interval training). After 8 weeks of interval training and supplementation, blood samples were taken from the rats. Then, the C-reactive protein and the activity of the antioxidant enzymes of superoxide dismutase and catalase were assessed by 1-way analysis of variance.

Findings The results showed that in the group of hydroethanolic extract of pomegranate peels + high-intensity interval training, the superoxide dismutase (P=0.000) and catalase (P=0.003) significantly increased, and the C-reactive protein (P=0.002) decreased. Tukey's test confirmed the significance of these changes in the hydroethanolic extract of pomegranate peels+high-intensity interval training compared to the control group.

Conclusion The combination of high-intensity interval training and hydroethanolic extract of pomegranate peels could strengthen the immune system, potentially enhances athletic performance, and accelerates recovery after exercises. The hydroethanolic extract of pomegranate peels and high-interval training synergistically boost the immune system and increase physical endurance.

English Version

1. Introduction

High-Intensity exercise, with high oxygen consumption, causes excessive free radicals production inside the cell [1]. These radicals may affect the musculoskeletal and heart system elements, inflammatory factors, and antioxidants [2]. The antioxidant defense is part of the body's immune system to fight free radicals and oxidative stress [3].

Evidence suggests that heavy physical activity increases the production of free radicals in skeletal muscle and active tissues. Therefore, the effect of interval exercise on cytokine levels and immune system indices is considered [3]. It is unclear how intense and when these sports activities can be

* *Corresponding Author:*
Farah Nameni, PhD.
Address: Department of Sports Physiology, Varamin Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.
Tel: +98 (912) 5354053
E-mail: f.nameni@yahoo.co.uk

effective [4]. Studies show that a combination of physical activity and the use of dietary supplements containing antioxidants can control inflammatory cytokines [5].

Herbal medicine as a complementary treatment method can effectively improve the antioxidant conditions and cleansing the body of free radicals, and controlling inflammatory cytokines. In this regard, the pomegranate pill supplement has been considered because of its compounds such as alkaloids, flavonoids, organic acids, and various vitamins [6]. Because of its unique polyphenolic compounds, pomegranate protects against damage to macromolecules, including membrane proteins and DNA, and inflammatory and muscle damage by reducing the oxidative stress process in athletes. Besides, pomegranate pill supplement may increase exercise performance and reduce undesirable blood lipids [7].

Some other medical and clinical effects of bioactive compounds in pomegranate inhibit uncontrolled cell growth and planned death of cancer cells [8]. Pomegranate is also a source of secondary metabolic compounds (lignin, sterols, and terpenoids) [9] and can be referred to as the alkaloids in the skin and leaves and triglyceride fatty acids in pomegranate seed oil [9]. The compounds of coumarin, tannins, flavonoids, anthocyanins, ester derivatives, or glycosidic derivatives soluble in pomegranate juice have also added to the medicinal value of this supplement [10]. The effect of this supplement on antioxidant indices and inflammatory and blood factors pomegranate and immune responses in interval exercise can be a practical step to understand better the relationship between the immune system and supplement consumption in athletes.

Cytokines have anti-inflammatory and immune-regulating properties that limit inflammatory responses caused by tissue damage in athletes and, in addition to immune function, have metabolic function [10]. A major mediator of inflammatory reactions that increase in sports injuries is C-Reactive Protein (CRP). This mediator can bind to nuclear antigens, specific pathogens, and damaged tissues [11].

The effect of pomegranate pill supplement on immune cytokines and biochemical markers of inflammation can provide helpful information about the anti-inflammatory effects of pomegranate in preventing oxidative damage in athletes. It also provides a good perspective on the design and use of antioxidant supplements and their protective effects during intermittent exercises. Also, the use of pomegranate pill supplements in improving the performance of different parts of the body and counteracting the effects of exercise and sports activity may have beneficial effects. This study aimed to evaluate the effect of hydroethanolic extract of pomegranate peels and a period of intense interval training on CRP, Catalase (CAT), and Superoxide Dismutase (SOD) in rats.

2. Materials and Methods

This research was carried out by experimental or interventional laboratory study, post-test design with a control group. It is an applied study in terms of purpose. Also, this study has an ethical code approved by the Faculty of Medical Sciences of the Islamic Azad University, Varamin Pishva Branch, Tehran, Iran. In all stages of maintenance, sports activities, and supplementation, the ethical principles of working with animals have been observed following the Helsinki Declaration regulations. The study's statistical population comprised male Wistar rats, and the sample consisted of 36 adult male Wistar rats weighing 260±32 g and 8 weeks old, prepared from the center of Pasteur Institute of Iran and transferred to the laboratory of Islamic Azad University, Varamin Branch. The rats were exposed to an appropriate temperature and living conditions.

In each cage, 4 mice were kept in a natural light cycle (12 hours of light and 12 hours of darkness). The rats were transferred to the laboratory to get familiar with the new environment and work on the treadmill. Two weeks later, they were randomly divided into four groups: control group (daily intake of 1 mL of freshwater by gavage), the second group (Daily intake of 1 mL of pomegranate peel hydroethanolic extract by gavage), group 3 (daily intake of 1 mL of pomegranate peel hydroethanolic extract by gavage and a period of intense intermittent exercise) and group 4 (intake of 1 mL of freshwater with gavage and a period of intense intermittent exercise).

The inclusion criteria included proper weight, age, sex, without previous drug use or supplement, and exclusion criteria included disease and physiological heterogeneity and lack of rats' similar race. The test period took 8 weeks. Because the rats' transfer caused stress in them, the rats were kept for one week after transfer to adapt to the environment. Then, to get acquainted with the treadmill, they performed increasing interval exercises with low intensity for one week. The introductory program with intense intermittent training included 4 training sessions per week, consisted of walking and running on an electronic treadmill for rodents (made by IranPishro AndisheSanat, Iran) (Table 1).

The rats had increased training in the first 5 weeks and then decreased training load in the last two weeks. The main activity time was 30 minutes and 5 minutes for warming up and 5 minutes for cooling down. To stimulate the rats to run, a gentle electric shock was installed in the back

Table 1. Subjects' 8-week interval training program

Week	Getting to Know	First	Second	Third	Fourth	Fifth	Sixth	Seventh	Eighth
Exercise speed*	10-25	25-35	25-35	25-35	30-45	45-55	50-65	60-70	60-70
Training duration	1 minute								
Rest between repetitions	2 minutes								
The number of sets	8	8	8	8	8	8	8	7	7
Number of sessions per week	4	5	5	5	6	6	6	5	5

*m/min.

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

of the device. However, to prevent the possible effects of electric shock on the test results, in the familiarization phase with the activity on the treadmill, the animals were taught with sound conditioning to prevent approaching and resting at the end of the device. Pomegranate tablets (from Amy Vital) were prepared, and after powdering, 400 g of it was soaked with 2200 mL of 80% ethanol for 72 hours. A rotary apparatus then separated the smooth and solvent solution. The solution was stored at -20°C until further use. The dose of gavage was determined to be 200 mg/kg body weight, and during the research period, the rats were fed daily by the animal technician in divided doses by gavage [13].

The rats were anesthetized with ether 48 hours after the last training session, and then 5 mL of blood were sampled from the rats' hearts. The blood samples were immediately poured into laboratory tubes and kept at 4°C for 30 min. The serum of blood samples was then centrifuged at 200×g (Pars Azmoun-Iran) for 10 minutes and kept at -20°C until further steps. Serum CRP was measured by the ELISA method with the help of a kit (Biosystem-31079C3-Spain) made in Spain. Hydrogen peroxide decomposition at 240 nm was used to measure the CAT enzyme. To measure SOD, we used the Ransel kit (Randox, UK) according to the manufacturer's instructions. The concentration was determined by the Bradford method at 595 nm. Enzyme activities were reported in IU/mg.

All measurements were performed by a Hitachi 912 biochemical autoanalyzer (made in Japan) with a variety of conventional biochemical methods and 12 wavelengths from 340 to 750 nm plus a silicon photodiode detector. The detector had "Within Run Precision" and "between Run Precision control" and, with a valid control serum, determined the device repeatability through ten times testing of a specific sample and reported the average, standard deviation, and its percentage (Mean, SD, CV%).

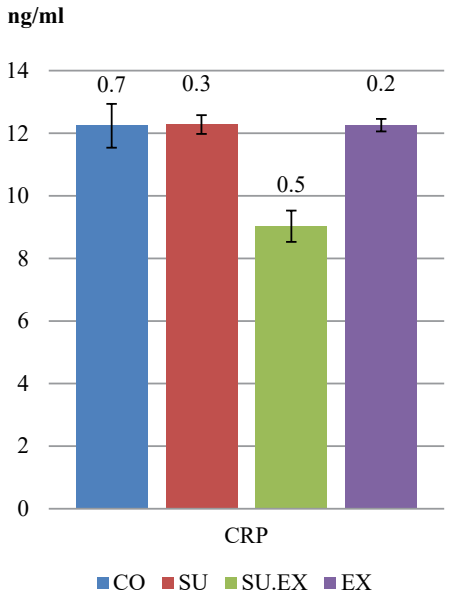
The results were reported as the mean and standard deviation. After collecting the raw data of the experiment, the

Table 2. Results of 1-way analysis of variance test of research variables in four groups

Variable	Sources of Variance	Sum of Squares	Average of Squares	F	P
C-reactive protein	Between groups	14	46	6.8	0.002*
	Intergroup	100	4.66		
	Total	114			
Catalase	Between groups	16	44	4.4	0.003*
	Intergroup	98	10.2		
	Total	114			
Superoxide dismutase	Intragroup	12	64	6.4	0.000*
	Intergroup	100	12.4		
	Total	112			

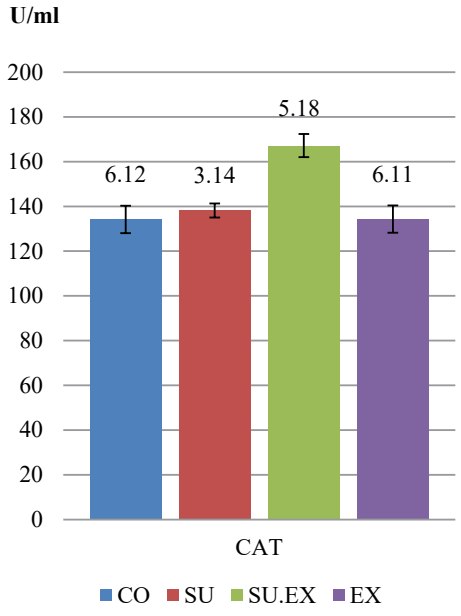
*P<0.05.

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences



Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

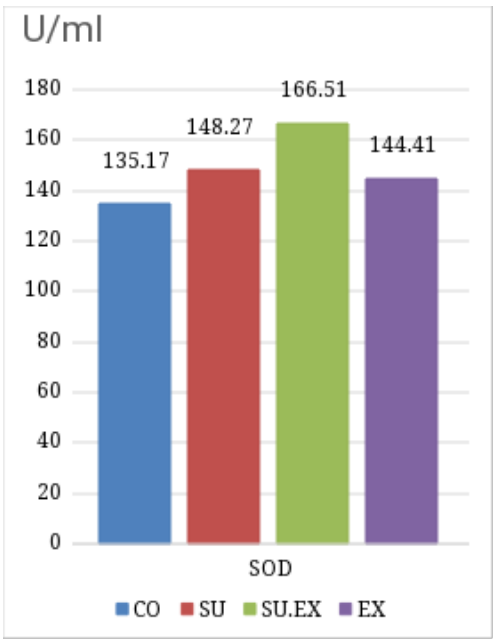
Figure 1. Comparison of mean and standard deviation changes of C-reactive protein (ng/mL) between four research groups



Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Figure 2. Comparison of mean and standard deviation changes of Catalase (U/mL) between four research groups

Shapiro-Wilk test was used to ensure the normal distribution of data, and Levene's test to check the homogeneity of variance. A 1-way Analysis of Variance (ANOVA) test was used to evaluate the differences between research variables among the experimental groups. Tukey's post hoc test assessed the significance of the results. Statistical analysis was performed by SPSS version 24.



Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Figure 3. Comparison of mean and standard deviation changes of superoxide dismutase (U/mL) between four research groups

3. Results

The descriptive results of the research were presented in the form of tables and graphs. Rats at the beginning of the study protocol had a Mean±SD weight of 260±32 g and a Mean±SD age of 72±3 months. The results of comparing the inflammatory variable of CRP in rats are shown in Figure 1. The results of comparing the antioxidant enzyme CAT of rats can be seen in Figure 2. The results of comparing the antioxidant enzyme SOD in rats can be seen in Figure 3.

According to the results, the assumption of homogeneity of variance and data distribution in the experimental groups was normal. The results of the 1-way ANOVA test of research variables are shown in Table 2.

Based on the results of 1-way ANOVA, the difference between the means of the CRP variable was significant only between the control group and the group of hydroethanolic extract of pomegranate peels + intense interval exercise. Tukey's test confirmed CRP results between the control group and the hydroethanolic extract group of pomegranate peel + intense interval exercise and the group that had intense interval exercise ($P<0.05$). Based on the results of 1-way ANOVA, the difference between the control group and the other three groups on the mean of SOD was sig-

nificant. Tukey's test confirmed the significance of results for SOD between the control group and the other three groups ($P<0.05$). Based on the results of 1-way ANOVA, the difference between the control group and the other three groups on the means of CAT was significant. The Tukey's test confirmed the significance of CAT results only between the control group and the hydroethanolic extract group of pomegranate peels + intense interval exercise ($P<0.05$).

4. Discussion

This study showed that the amount of CRP decreased after a period of intense interval exercise and consumption of hydroethanolic extract of pomegranate peels. However, pomegranate supplement alone could not change the level of this cytokine factor. In rats with pomegranate supplement and intense intermittent exercise, the CRP plasma level decreased compared to the control group. In the study of Farhadi et al., the amount of CRP was reduced after taking pomegranate supplements and exercise [14].

It seems that the use of pomegranate pill supplement along with exercise causes homeostasis by activating anti-inflammatory factors that reduce CRP, and several mechanisms do this reduction. The decrease in cytokine production resulted from the improvement of endothelial function due to exercise and the possible antioxidant effects of pomegranate supplementation [15]. Also, the compounds of pomegranate ellagic polyphenols inhibited the expression of CRP genes [16]. Like the present study results, Ammar et al. observed that pomegranate supplementation in runners significantly reduced CRP levels. They believed that the polyphenols in pomegranate reduce CRP levels by suppressing the activity of the cyclooxygenase-2 enzyme and interference with regulating some pro-inflammatory indicators such as tumor necrosis factor [17].

Contrary to the results of the present study, Trambold et al. observed that daily consumption of 500 mL of pomegranate juice in the first 5 days of exercise, although not reducing pro-inflammatory factors such as CPR, over time, the alginate in pomegranate juice significantly reduced CRP in athletes [18]. Another study showed that the anti-inflammatory effect of pomegranate on the body of athletes after exercise depends on the dose and duration of its use [19]. Therefore, the lack of CRP reduction in the group that used only the hydroethanolic extract of pomegranate peels may be attributed to the low supplement dose and short test time. The synergistic effect of using the hydroethanolic extract of pomegranate peels and intermittent exercise, which is shown in reducing inflammatory protein CRP, is due to the successful control of inflammation by this synergy.

Regarding the levels of the SOD enzyme, the results showed that after training and supplementation, this enzyme level increased significantly in all experimental groups. Consumption of hydroethanolic extract of pomegranate peels and intense interval training increased the levels of this antioxidant enzyme. In the case of CAT, a significant increase in the plasma level of the enzyme was reported only in the group that used the hydroethanolic extract of pomegranate peels simultaneously with intermittent exercise. Moder et al. also reported that short- and medium-term increasingly intense aerobic exercise without supplementation did not significantly alter SOD and CAT levels in rats [20].

The disproportionate balance between changes in these enzymes has also been reported after exercise [21]. This imbalance between the serum levels of these two enzymes can be attributed to the effect of pro-inflammatory factors, which can be seen in the increased expression of SOD mRNA molecules [22]. Some studies have also shown an increase in serum SOD levels and no increase in serum CAT levels in trained rats. Some researchers believe that high-intensity, prolonged physical activity is associated with an increase in free radicals. Excessive oxygen supply to tissues is one of the most important causes of increased oxidative stress, and this increase is the result of intense aerobic exercise [23]. In this regard, Trambold et al. showed that consumption of pomegranate extract increases antioxidant levels [24].

One of the main constituents of pomegranate fruit is phenolic compounds which, due to their hydroxyl groups, can directly neutralize free radicals and enhance the function and synthesis of endogenous antioxidant enzymes in the body [25]. Similar results were observed in dogs after taking pomegranate pills and a period of exercise [26, 27]. In this regard, it has been reported that the use of pomegranate supplementation has increased the levels of SOD in young male athletes [28]. The ingredients of pomegranate tablets are essential because of their biological role in health and strengthening the immune system [29]. Also, several elements and organic acids, and abundant alkaloids have directly or indirectly strengthened the immune system and affected research variables [30].

5. Conclusion

The present study results showed that a period of intense intermittent exercise with hydroethanolic extract of pomegranate peels reduced C-reactive protein (one of the proteins of the acute phase of inflammation). The novelty of the research is that taking pomegranate pill supplements and intense intermittent exercise with similar benefits will synergistically

reduce inflammation. Therefore, adding pomegranate pills to athletes' diet can help their health, better quality of sports, and physical performance, without side effects.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Ethics Committee of the Medical Sciences of Islamic Azad University, Varamin Pishva Branch (Code: IR.IAU.VARAMIN.REC.1398.011).

Funding

This study was extracted from MA. thesis of the second author at the Department of Sports Physiology, Varamin Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin.

Authors' contributions

Conceptualization, methodology, investigation, funding acquisition, resources: All author; Writing – original draft, writing – review & editing, supervision: Farah Nameni.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

We appreciate all the staff, officials, and technicians of the laboratory Islamic Azad University, Varamin-Pishva Branch who helped us in this research.

This Page Intentionally Left Blank

افق دانش
فصلنامه دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی گناباد

مقاله پژوهشی

تأثیر مصرف عصاره هیدرواتانولی پوست میوه انار و تمرین تناوبی شدید بر پروتئین واکنشی C، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در موش صحرایی

*فرح نامنی[۱]، رؤیا علی‌اکبر علوی[۱]

۱. گروه تربیت بدنی، واحد ورامین ـ پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.

تاریخ دریافت: ۲۰ تیرماه ۱۳۹۹
تاریخ پذیرش: ۲۶ آبان ماه ۱۳۹۹
تاریخ انتشار: ۱۲ فروردین ۱۴۰۰

چکیده

اهداف فعالیت ورزشی سنگین ممکن است موجب آسیب اکسیداتیو به سیستم دفاعی شود. نقش مکمل‌های گیاهی در حین و بعد از تمرینات ورزشی ناشناخته است؛ بنابراین مطالعه حاضر با هدف تعیین تأثیر عصاره هیدرواتانولی پوست میوه انار و یک دوره تمرین تناوبی شدید بر پروتئین واکنشی C و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در موش صحرایی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها این پژوهش از نوع تجربی بود. جامعه آماری موش‌های صحرایی بودند. برای انجام پژوهش، ۳۶ موش صحرایی نژاد ویستار به عنوان نمونه انتخاب و به شکل تصادفی ساده در چهار گروه (کنترل، عصاره هیدرواتانولی پوست میوه انار، تمرین تناوبی شدید و عصاره هیدرواتانولی پوست میوه انار+تمرین تناوبی شدید) قرار گرفتند. پس از هشت هفته مکمل یاری و تمرین، از موش‌ها نمونه‌های خونی اخذ و پروتئین واکنشی C و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز توسط تحلیل واریانس یک‌طرفه بررسی شد.

یافته‌ها نتایج نشان داد در گروه عصاره هیدرواتانولی پوست میوه انار+تمرین تناوبی شدید، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (P=۰/۰۰۰) و کاتالاز (P=۰/۰۰۳) افزایش معنادار و پروتئین واکنشی C (P=۰/۰۰۲)کاهش داشته است. معناداری تغییرات توسط آزمون توکی در گروه کنترل نسبت به گروه عصاره هیدرواتانولی پوست میوه انار+تمرین تناوبی شدید تأیید شد.

نتیجه‌گیری ترکیبی از تمرین تناوبی شدید و عصاره هیدرواتانولی پوست میوه انار می‌تواند موجب تقویت سیستم ایمنی، توسعه بالقوه عملکرد ورزشی و تسریع بازیافت بعد از تمرینات ورزشی شود. استفاده از تمرین تناوبی شدید و عصاره هیدرواتانولی پوست میوه انار موجب هم‌افزایی آثار تقویت سیستم ایمنی و افزایش مقاومت جسمانی می‌شود.

کلیدواژه‌ها:
تمرین اینتروال، التهاب، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، مکمل قرص انار

مقدمه

تمرینات ورزشی شدید با مصرف اکسیژن زیاد موجب تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد در داخل سلول می‌شوند [۱]. این رادیکال‌ها ممکن است بر عناصر سیستم عضلانی و قلبی، عوامل التهابی و آنتی‌اکسیدان‌ها تأثیر بگذارند [۲].

دفاع آنتی‌اکسیدانی بخشی از دستگاه ایمنی بدن برای مقابله با رادیکال‌های آزاد و روند استرس اکسیداتیو است [۳]. شواهد به‌دست‌آمده نشان می‌دهند که فعالیت بدنی سنگین منجر به افزایش تولید رادیکال آزاد در عضله اسکلتی و بافت‌های فعال می‌شود؛ بنابراین تأثیر فعالیت‌های ورزشی تناوبی بر سطوح سایتوکاین‌ها و شاخص‌های سیستم دفاعی مورد توجه است [۳].

به روشنی مشخص نیست که چه شدتی و چه زمانی از این فعالیت‌های ورزشی می‌توانند مؤثر باشند [۴]. پژوهش‌ها نشان می‌دهند که ترکیبی از فعالیت‌های بدنی و استفاده همزمان از مکمل‌های غذایی حاوی آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند در کنترل سایتوکاین‌های التهابی نقش داشته باشد [۵].

استفاده از طب گیاهی به عنوان نوعی روش درمانی و تکمیلی، در بهبود شرایط ضد اکسایشی و پاک‌سازی بدن از رادیکال‌های آزاد و کنترل فعالیت سایتوکاین‌های التهابی می‌تواند مؤثر باشد. مکمل قرص انار به دلیل دارا بودن ترکیباتی نظیر آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، اسیدهای آلی و انواع ویتامین‌ها مورد توجه قرار گرفته است [۶].

انار به دلیل داشتن ترکیبات منحصر به فرد پلی‌فنولی با کاهش روند فشار اکسایشی در بدن ورزشکاران از آسیب به ماکرومولکول‌ها از جمله پروتئین‌های غشا، DNA، آسیب‌های

* نویسنده مسئول:
دکتر فرح نامنی
نشانی: ورامین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین ـ پیشوا، گروه تربیت بدنی.
تلفن: ۵۳۵۴۰۵۳ (۹۱۲) ۹۸+
پست الکترونیکی: f.nameni@yahoo.co.uk

التهابی و عضلانی محافظت می‌کند. به علاوه، مکمل قرص انار در افزایش عملکردهای ورزشی و همچنین کاهش چربی‌های نامطلوب خون ممکن است نقش داشته باشد [۷].

برخی اثرات دیگر پزشکی و بالینی ترکیبات زیست فعال موجود در انار، مانع رشد کنترل‌نشده سلول‌ها و مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول‌های سرطانی می‌شود [۸]. همچنین انار منبعی برای ترکیبات متابولیتی ثانویه (لیگنین، استرول و ترپنوئیدها) است [۹] و می‌توان به آلکالوئیدهای موجود در پوست و برگ و اسیدهای چرب تری‌گلیسرید در روغن دانه انار نیز اشاره کرد [۹].

ترکیبات کومارین، تانن، فلاونوئید، آنتوسیانین‌ها، مشتقات استری یا مشتقات گلیکوزیدی محلول در آب انار هم بر ارزش دارویی این مکمل افزوده است [۱۰]. تأثیر این مکمل بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و عوامل التهابی و خونی و بررسی رابطه متقابل مصرف مکمل انار و پاسخ‌های ایمنی در تمرینات تناوبی می‌تواند گامی مؤثر برای شناخت هر چه بهتر ارتباط سیستم ایمنی و مصرف مکمل در ورزشکاران باشد.

سایتوکاین‌های دارای خواص ضدالتهابی و تنظیم‌کننده سیستم ایمنی هستند که پاسخ‌های التهابی ناشی از آسیب‌های بافتی را در ورزشکاران محدود می‌کند و علاوه بر عملکرد ایمنی عملکرد متابولیکی نیز دارند [۱۰].

یک میانجی اصلی واکنش‌های التهابی که در آسیب‌دیدگی‌های ورزشی افزایش می‌یابد، پروتئین واکنشی C[1] است. این میانجی می‌تواند به آنتی ژن‌های هسته‌ای، پاتوژن‌های ویژه، و بافت‌های آسیب‌دیده متصل شود [۱۱، ۱۲].

تأثیر مکمل قرص انار بر سایتوکاین‌های ایمنی و همچنین نشانگرهای بیوشیمیایی التهاب می‌تواند اطلاعات مفیدی را در مورد اثرات ضدالتهابی مکمل قرص انار در جلوگیری از بروز صدمات اکسیدانی در ورزشکاران فراهم کند. همچنین دیدگاه مناسبی را برای طراحی و استفاده از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی و اثرات محافظتی آنها هنگام انجام تمرینات تناوبی فراهم کند.

همچنین استفاده از مکمل قرص انار در بهبود کارایی بخش‌های مختلف بدن و مقابله با اثرات ناشی از تمرین و فعالیت ورزشی ممکن است اثرات مطلوبی داشته باشد؛ بنابراین هدف از این پژوهش تأثیر مصرف عصاره هیدرواتانولی پوست میوه انار و یک دوره تمرین تناوبی شدید بر پروتئین واکنشی C، کاتالاز[2]، و سوپراکسید دیسموتاز[3] در موش صحرایی بود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به روش تجربی یا آزمایشگاهی مداخله‌گر با طرح پس‌آزمون با گروه کنترل انجام شد و از نظر هدف کاربردی است. همچنین این پژوهش دارای کد اخلاق مصوب از دانشکده علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین ـ پیشوا است و در همه مراحل نگهداری، فعالیت ورزشی و مکمل یاری، اصول اخلاقی کار با حیوانات طبق مصوبات بین‌المللی هلسینکی رعایت شده است.

جامعه آماری تحقیق شامل موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار بودند و نمونه تحقیق شامل ۳۶ موش صحرایی نر نژاد ویستار بالغ با دامنه وزنی ۳۲±۲۶۰ گرم و دامنه سنی هشت هفته‌ای بود که از مرکز انستیتو پاستور ایران تهیه و به آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین ـ پیشوا منتقل شدند. موش‌های صحرایی در دما و شرایط زیستی مناسب قرار گرفتند.

در هر قفس چهار موش با رعایت چرخه نوری طبیعی (دوازده ساعت روشنایی و دوازده ساعت تاریکی) نگهداری می‌شدند. پس از دو هفته از انتقال موش‌های صحرایی به محیط آزمایشگاه، آشنایی با محیط جدید و نحوه فعالیت روی نوار گردان، آنها به شکل تصادفی ساده به چهار گروه: گروه کنترل (دریافت روزانه یک میلی‌لیتر آب شیرین به صورت گاواژ)؛ گروه دوم (دریافت روزانه یک میلی‌لیتر عصاره هیدرواتانولی پوست میوه انار به صورت گاواژ)؛ گروه سوم (دریافت روزانه یک میلی‌لیتر عصاره هیدرواتانولی پوست میوه انار به صورت گاواژ و یک دوره تمرین تناوبی شدید)؛ و گروه چهارم (دریافت یک میلی‌لیتر آب شیرین با گاواژ و یک دوره تمرین تناوبی شدید) تقسیم شدند.

بنابراین معیارهای ورود شامل وزن، سن، جنس، عدم استفاده از دارو، و مکمل‌های قبلی بود و معیارهای خروج شامل بیماری، عدم همنژادی، و همگنی فیزیولوژیکی موش‌های صحرایی می‌شد. کل دوره آزمایش هشت هفته بود. به دلیل اینکه نقل‌وانتقال موش‌های صحرایی سبب ایجاد استرس در آنها می‌شود، موش‌های صحرایی به مدت یک هفته پس از انتقال برای سازگاری با محیط نگهداری شدند.

سپس برای آشنایی با تردمیل به مدت یک هفته نیز تمرینات تناوبی فزاینده با شدت کم را اجرا کردند. برنامه آشنایی با تمرین شدید تناوبی چهار جلسه تمرین در هفته، متشکل از راه رفتن و دویدن روی تردمیل الکترونیکی جوندگان (ساخت صنعت پیشرو اندیشه صنعت ایران) بود (جدول شماره ۱).

در پنج هفته اول تمرین فزاینده و در دو هفته آخر کاهش بار تمرین داشتند. زمان اصلی فعالیت سی دقیقه، گرم کردن پنج دقیقه، و سرد کردن پنج دقیقه در نظر گرفته شد. برای تحریک به دویدن موش‌های صحرایی شوک الکتریکی ملایمی در عقب دستگاه تعبیه شد. البته به منظور ممانعت از اثرات احتمالی

1. C-Reactive Protein
2. Catalase
3. Superoxide dismutase

شوک الکتریکی بر نتایج آزمایش، در مرحله آشناسازی با فعالیت روی تردمیل از روش شرطی سازی با صدا به حیوانات آموزش داده شد تا از نزدیک شدن و استراحت در بخش انتهایی دستگاه جلوگیری شود.

قرص انار (از شرکت امی ویتال) تهیه و پس از پودر کردن، ۴۰۰ گرم از آن با ۲۲۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد به مدت ۷۲ ساعت خیسانده شد. سپس محلول صاف و حلال توسط دستگاه روتاری جدا شد. محلول در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد زیر صفر تا زمان مصرف نگهداری شد.

میزان مصرف گاواژ ۲۰۰ میلی‌گرم / کیلوگرم وزن بدن تعیین و در طی دوره پژوهش، توسط تکنسین کار با حیوانات، هر روز در دوزهای منقسم به شکل گاواژ خورانیده شد [۱۳]. موش‌های صحرایی ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی با اتر بی‌هوش شدند و سپس نمونه‌گیری پنج سی‌سی خون از قلب موش‌ها صورت گرفت.

نمونه‌های خون بلافاصله به داخل لوله‌های آزمایشگاهی ریخته شد و به مدت سی دقیقه در دمای چهار درجه نگهداری شدند. سپس سرم نمونه‌های خون به مدت ده دقیقه با دور g ۲۰۰ سانتریفیوژ (پارس آزمون ـ ایران) شده و تا انجام مراحل بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

سنجش سطح سرمی CRP نیز به کمک روش ELISA و با کمک کیت (Biosystem-31079C3-Spain) ساخت کشور اسپانیا استفاده شد.

برای سنجش آنزیم کاتالاز از روش تجزیه پراکسید هیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر استفاده شد. برای سنجش سوپراکسید دیسموتاز از کیت رانسل شرکت راندوکس انگلستان بر اساس روش دفترچه راهنمای شرکت سازنده استفاده شد. تعیین غلظت با روش برادفورد در طول موج ۵۹۵ نانومتر صورت گرفت. فعالیت آنزیم‌ها بر حسب واحد بین‌الملل در میلی‌گرم گزارش شد.

همه سنجش‌ها با دستگاه اتوآنالایزر بیوشیمی هیتاچی ۹۱۲ ساخت ژاپن با انواع روش‌های متداول بیوشیمی با دوازده طول موج از ۳۴۰ تا ۷۵۰ نانومتر و دتکتور از نوع سیلیکون فوتودیود انجام شد که شامل کنترل بوده و با یک سرم کنترل معتبر تکرارپذیری دستگاه با اندازه‌گیری یک تست را ده بار روی یک نمونه مشخص اجرا، میانگین، انحراف معیار و درصد آن را (Mean, SD, CV٪) تعیین می‌کند. نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار گزارش شد. پس از جمع‌آوری داده‌های خام آزمایش برای اطمینان از نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو ویلک و برای بررسی همگنی واریانس‌ها از آزمون لون استفاده شد. برای بررسی تفاوت متغیرهای پژوهش بین گروه‌های آزمایشی از آزمون ANOVA یک‌طرفه استفاده شد. معناداری نتایج با آزمون تعقیبی توکی بررسی شد. تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ انجام شد.

یافته‌ها

با استفاده از آمار توصیفی نتایج توصیفی پژوهش در قالب جدول‌ها و تصاویر ارائه شد. موش‌های صحرایی در ابتدای پروتکل پژوهش میانگین وزنی ۳۲±۲۶۰ گرم و میانگین سنی ۳±۷۲ ماه داشتند. نتایج حاصل ازمقایسه متغیر التهابی پروتئین واکنشیC موش‌های صحرایی در تصویر شماره ۱ مشاهده می‌شود.

نتایج حاصل از مقایسه متغیر آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز موش‌های صحرایی در تصویر شماره ۲ مشاهده می‌شود. نتایج حاصل از مقایسه آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز موش‌های صحرایی در تصویر شماره ۳ مشاهده می‌شود.

بر اساس نتایج مفروضه همگنی واریانس‌ها و توزیع داده‌ها در گروه‌های آزمایشی به صورت نرمال و طبیعی بود. نتایج آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه متغیرهای پژوهش در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود.

بر اساس نتایج تجزیه‌وتحلیل واریانس یک‌طرفه تفاوت میانگین‌های متغیر پروتئین واکنشی C، تنها بین گروه کنترل با گروه عصاره هیدرواتانولی پوست میوه انار+تمرین تناوبی شدید معنادار بوده است.

آزمون توکی معناداری نتایج را در مورد پروتئین واکنشی C بین

جدول ۱. برنامه تمرینی هشت هفته‌ای اینتروال آزمودنی‌ها

هفته	آشنایی	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	هشتم
*سرعت تمرین	۱۰–۲۵	۲۵–۳۵	۲۵–۳۵	۲۵–۳۵	۳۰–۴۵	۴۵–۵۵	۵۰–۶۵	۶۰–۷۰	۶۰–۷۰
مدت تمرین					یک دقیقه				
استراحت بین تکرار					دو دقیقه				
تعداد ست	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۷	۷
تعداد جلسه در هفته	۴	۵	۵	۵	۶	۶	۶	۵	۵

* متر در دقیقه.

افق دانش

جدول ۲. نتایج تجزیه‌وتحلیل واریانس یک‌طرفه متغیرهای پژوهش در چهار گروه

متغیر	منابع واریانس	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	P*
CPR	بین‌گروهی	۱۴	۴۶	۶/۸	۰/۰۰۲
	درون‌گروهی	۱۰۰	۴/۶۶		
	کل	۱۱۴			
CAT	بین‌گروهی	۱۶	۴۴	۴/۴	۰/۰۰۳
	درون‌گروهی	۹۸	۲/۱۰		
	کل	۱۱۴			
SOD	بین‌گروهی	۱۲	۶۴	۶/۴	۰/۰۰۰
	درون‌گروهی	۱۰۰	۴/۱۲		
	کل	۱۱۲			

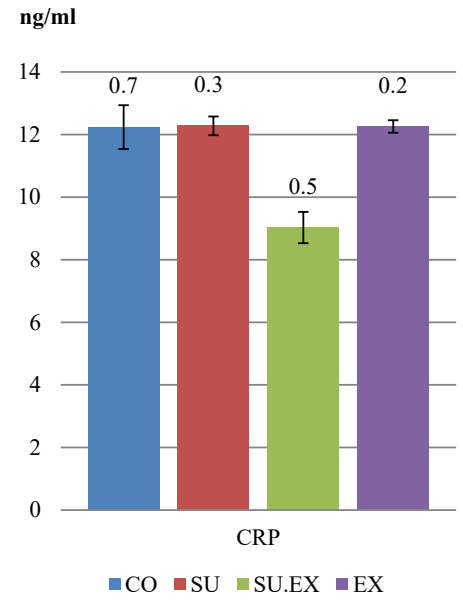
*P<۰/۰۵.

افق دانش

گروه کنترل با گروه عصاره هیدرواتانولی پوست میوه انار+تمرین تناوبی شدید و گروهی که تمرین تناوبی شدید داشتند تأیید کرد (P<۰/۰۵).

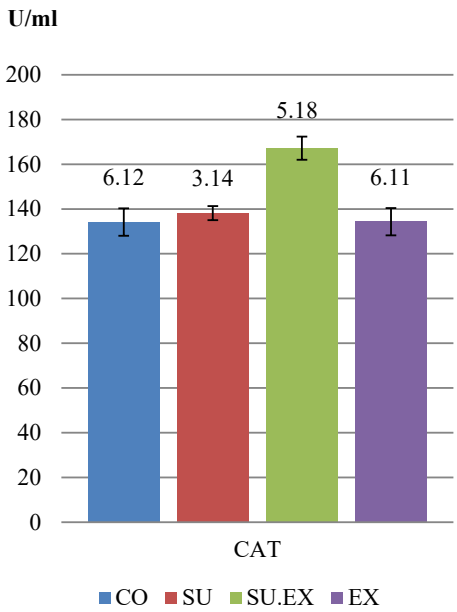
بر اساس نتایج تجزیه‌وتحلیل واریانس یک‌طرفه تفاوت میانگین‌های متغیر سوپراکسید دیسموتاز بین گروه کنترل با سه گروه دیگر معنادار بوده است. آزمون توکی معناداری نتایج را در مورد سوپراکسید دیسموتاز بین گروه کنترل با سه گروه دیگر تأیید کرد (P<۰/۰۵).

بر اساس نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه تفاوت میانگین‌های متغیر کاتالاز بین گروه کنترل با سه گروه دیگر معنادار بوده است. آزمون توکی معناداری نتایج را در مورد کاتالاز فقط بین گروه کنترل با گروه عصاره هیدرواتانولی پوست میوه انار+تمرین تناوبی شدید تأیید کرد (P<۰/۰۵).



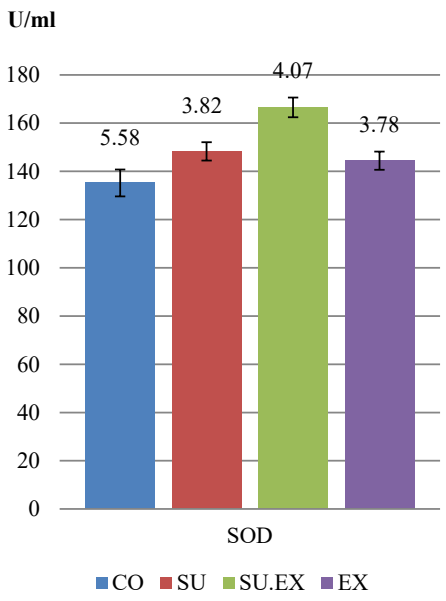
افق دانش

تصویر ۱. مقایسه تغییرات میانگین و انحراف معیار پروتئین واکنشی C (نانوگرم در هر میلی لیتر) بین چهار گروه پژوهش



افق دانش

تصویر ۲. مقایسه تغییرات میانگین و انحراف معیار CAT (واحد بر میلی‌لیتر) بین چهار گروه پژوهش



تصویر ۳. مقایسه تغییرات میانگین و انحراف معیار SOD (واحد بر میلی‌لیتر) بین چهار گروه پژوهش

بحث

نتایج پژوهش نشان داد میزان پروتئین واکنشی C پس از یک دوره تمرین تناوبی شدید و مصرف عصاره هیدرواتانولی پوست میوه انار کاهش یافت، در حالی که مکمل انار به تنهایی نتوانست تغییری در سطح این عامل سایتوکاینی ایجاد کند. در موش‌های صحرایی که مکمل انار و تمرین تناوبی شدید داشتند، میزان پلاسمایی پروتئین واکنشی C نسبت به گروه کنترل کاهش یافت.

در مطالعه فرهادی و همکارانش نیز میزان پروتئین واکنشی C پس از مصرف مکمل انار و تمرینات ورزشی کاهش نشان داده بود [۱۴]. به نظر می‌رسد استفاده از مکمل قرص انار به همراه تمرینات ورزشی سبب ایجاد هومئوستاز از طریق فعال‌سازی عوامل ضدالتهابی شده که موجب کاهش CPR می‌شود و این کاهش به کمک چندین سازوکار صورت می‌گیرد.

کاهش تولید سایتوکاین‌ها حاصل بهبود عملکرد اندوتلیالی در اثر فعالیت ورزشی و اثرات آنتی‌اکسیدانی احتمالی مکمل انار بوده است [۱۵]. همچنین ترکیبات پلی‌فنول‌های الاژیک انار مانع بیان ژن‌های CPR شده است [۱۶].

مطابق نتایج پژوهش حاضر، در مطالعه امار[4] و همکارانش مشاهده شد که مصرف مکمل انار در ورزشکاران دونده سبب کاهش معنادار سطوح CPR می‌شود. به نظر آنها پلی‌فنول‌های موجود در انار با توقف فعالیت آنزیم COX-2 و دخالت در تنظیم برخی شاخص‌های پیش‌التهابی نظیر فاکتور نکروز توموری سبب کاهش سطوح CPR شده است [۱۷].

برخلاف نتایج مطالعه حاضر، ترامبولد[5] و همکارانش مشاهده کردند که مصرف روزانه ۵۰۰ میلی‌لیتر آب انار در پنج روز نخست شروع تمرینات ورزشی اگرچه سبب کاهش فاکتورهای پیش‌التهابی نظیر CPR نشد، اما به تدریج با گذشت زمان، آلژینات موجود در آب انار موجب کاهش معنادار CPR در ورزشکاران شد [۱۸].

تحقیق دیگری نشان داده بود که اثر ضدالتهابی انار بر بدن ورزشکاران پس از تمرینات ورزشی، وابسته به دوز مصرفی و طول مدت مصرف است [۱۹]؛ بنابراین عدم مشاهده کاهش CPR در گروهی که تنها از عصاره هیدرواتانولی پوست میوه انار استفاده کرده بودند را شاید بتوان به دوز کم مکمل و کوتاهی زمان آزمایش نسبت داد؛ زیرا اثر هم‌افزایی استفاده از عصاره هیدرواتانولی پوست میوه انار و ورزش تناوبی که به صورت کاهش در پروتئین التهابی CPR ظاهر شد، ناشی از کنترل موفق التهاب با این هم‌افزایی است.

در رابطه با سطوح آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، نتایج نشان داد که پس از انجام پروتکل تمرینی و مکمل یاری، سطوح آنزیم در همه گروه‌های آزمایشی افزایش معناداری داشت.

در واقع مصرف عصاره هیدرواتانولی پوست میوه انار و دوره تمرین تناوبی شدید موجب افزایش سطوح این آنزیم آنتی‌اکسیدانی شد، در حالی که در مورد آنزیم کاتالاز (CAT)، تنها در گروهی که همزمان با تمرین تناوبی، عصاره هیدرواتانولی پوست میوه انار استفاده شده بود، افزایش معنادار در سطوح پلاسمایی آنزیم معنادار گزارش شد.

مدیر و همکاران نیز گزارش کردند که تمرینات هوازی شدید فزاینده کوتاه و میان‌مدت بدون استفاده از مکمل تغییر معناداری در سطوح آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در موش‌های صحرایی ایجاد نکرد [۲۰].

عدم تناسب و تعادل بین تغییرات این آنزیم‌ها پس از تمرینات ورزشی هم گزارش شده است [۲۱]. این عدم تعادل بین سطح سرمی این دو آنزیم را می‌توان به اثر عوامل پیش‌التهابی نسبت داد که در افزایش بیان مولکول‌های آنزیم mRNA آنزیم سوپراکسید دیسموتاز قابل مشاهده است [۲۲].

در برخی از تحقیقات نیز افزایش سطح سرمی سوپراکسید دیسموتاز و عدم افزایش سطح سرمی کاتالاز در موش‌های صحرایی تمرین داده شده، مشاهده شده است.

برخی از محققان معتقدند که فعالیت‌های بدنی با شدت بالا و طولانی مدت با افزایش رادیکال‌های آزاد همراه هستند. اکسیژن رسانی زیاد به بافت‌ها از مهم‌ترین علل افزایش استرس اکسیداتیو

4. Ammar

5. Trombold

است و این افزایش حاصل تمرینات ورزشی هوازی شدید است [۲۳]. در همین راستا ترامبولد و همکاران نشان دادند که مصرف عصاره انار سبب افزایش سطوح آنتی‌اکسیدانی می‌شود [۲۴].

از ترکیبات اصلی میوه انار ترکیبات فنولیک است که به دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل قادرند به صورت مستقیم سبب خنثی کردن رادیکال‌های آزادشده و عملکرد و سنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی درون‌زای بدن را تقویت کنند [۲۵]. مشابه همین نتایج، پس از مصرف قرص انار و یک دوره تمرین ورزشی در سگ مشاهده شد [۲۶، ۲۷]. در همین راستا گزارش شده که استفاده از مکمل انار سبب افزایش سطوح آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در مردان جوان ورزشکار شده است [۲۸]. ترکیبات قرص انار به دلیل نقش بیولوژیک در سلامت و تقویت سیستم ایمنی حائز اهمیت هستند [۲۹]. همچنین چندین عناصر و اسیدهای آلی و مواد آلکالوئیدی فراوان موجب تقویت مستقیم یا غیرمستقیم دستگاه ایمنی و تأثیر بر متغیرهای پژوهش شده‌اند [۳۰].

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که یک دوره تمرین تناوبی شدید به همراه عصاره هیدرواتانولی پوست میوه انار سبب کاهش پروتئین واکنشی C (از پروتئین‌های فاز حاد التهاب) شده است. نوآوری تحقیق در این است که مصرف مکمل قرص انار و تمرین تناوبی شدید با فواید مشابه، موجب هم‌افزایی کاهش التهاب خواهند شد. از این رو، گنجاندن قرص انار در برنامه تغذیه‌ای ورزشکاران می‌تواند به سلامت و کیفیت بهتر عملکرد ورزشی و جسمی آنها، بدون عوارض جانبی کمک شایانی کند.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این پژوهش مورد تایید کمیته اخلاق دانشکده علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین ـ پیشوا قرار گرفت (کد: IR.IAU.VARAMIN.REC.1398.011).

حامی مالی

این مقاله مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم رویا علی اکبر علوی است که در گروه تربیت بدنی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا بدون حمایت مالی تنظیم و اجرا شده است.

مشارکت نویسندگان

مفهوم سازی، روش‌شناسی، اعتبار سنجی، تحلیل، تحقیق و بررسی، تامین مالی و منابع: هر دو نویسنده ؛ ویراستاری و نهایی سازی، بصری‌سازی، نظارت، مدیریت پروژه، و نگارش : فرح نامنی.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مسئولین و تکنسین‌های آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین ـ پیشوا تشکر می کنند.

References

[1] Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine. 5th ed. United Kingdom: Oxford University Press; 2015. [DOI:10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001]

[2] MacRae HSH, Mefferd KM. Dietary antioxidant supplementation combined with quercetin improves cycling time trial performance. International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism. 2006; 16(4):405-19. [DOI:10.1123/ijsnem.16.4.405] [PMID]

[3] Beavers KM, Brinkley TE, Nicklas BJ. Effect of exercise training on chronic inflammation. Clinica Chimica Acta. 2010; 411(11-12):785-93. [DOI:10.1016/j.cca.2010.02.069] [PMID] [PMCID]

[4] Basu A, Penugonda K. Pomegranate juice: A heart-healthy fruit juice. Nutrition Reviews. 2009; 67(1):49-56. [DOI:10.1111/j.1753-4887.2008.00133.x] [PMID]

[5] Davison G,Gleeson M. Influence of acute vitamin C and/or carbohydrate ingestion on hormonal, cytokine, and immune responses to prolonged exercise. International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism. 2005; 15(5):465-79. [DOI:10.1123/ijsnem.15.5.465] [PMID]

[6] Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: Studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. The American Journal of Clinical Nutrition. 2000; 71(5):1062-76. [DOI:10.1093/ajcn/71.5.1062] [PMID]

[7] Akhtar S, Ismail T, Layla A. Pomegranate bioactive molecules and health benefits. In: Mérillon JM, Ramawat K, editors. Bioactive molecules in Food. Reference series in phytochemistry. Switzerland: Springer, Cham; 2019. [DOI:10.1007/978-3-319-78030-6_78]

[8] Mphahlele RR, Fawole OA, Stander MA, Opara UL. Preharvest and postharvest factors influencing bioactive compounds in pomegranate (Punica granatum L.)-A review. Scientia Horticulturae. 2014; 178:114-23. [DOI:10.1016/j.scienta.2014.08.010]

[9] Viswanath M, Sridevi P, Venkataramudu K, Naik SR, Kumar KR. Pomegranate (Punica granatum L.) processing, value addition and their Medicinal Properties related to human Health: A review. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2019; 8(1):1722-30. [DOI:10.20546/ijcmas.2019.801.183]

[10] Carol A, Witkamp RF, Wichers HJ, Mensink M. Bovine colostrum supplementation's lack of effect on immune variables during short-term intense exercise in well-trained athletes. International journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism. 2011; 21(2):135-45. [DOI:10.1123/ijsnem.21.2.135] [PMID]

[11] Kasapis C,Thompson PD. The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: A systematic review. Journal of the American College of Cardiology. 2005; 45(10):1563-9. [DOI:10.1016/j.jacc.2004.12.077] [PMID]

[12] De Almeida AA, da Silva SG, Fernandes J, Peixinho-Pena LF, Scorza FA, Cavalheiro EA, et al. Differential effects of exercise intensities in hippocampal BDNF, inflammatory cytokines and cell proliferation in rats during the postnatal brain development. Neuroscience Letters. 2013; 553:1-6. [DOI:10.1016/j.neulet.2013.08.015] [PMID]

[13] Nazari M, Sadeghipour A, Eidi M. [Effect of hydroethanolic extract of aflatoxin-induced liver injury on anarbus fruit in adult male rats (Persian)]. Developmental Biology . 1395; 8(4):23-32. https://www.sid.ir/fa/journal/ViewPaper.aspx?id=347392

[14] Farhadi H, Rahimi F, Baqaei S. [The effect of eight weeks of pomegranate supplementation on inflammatory markers and muscle injury in non-athlete overweight men under different VO_2max intensities (Persian)]. Applied Biosciences in Sport. 1396; 5(9):31-41. https://www.sid.ir/fa/journal/ViewPaper.aspx?id=306422

[15] Dong S, Tong X, Liu H, Gao Q. Protective effects of pomegranate polyphenols on cardiac function in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury Nan fang yi ke da xue xue bao. Journal of Southern Medical University. 2012; 32(7):924-7. [PMID]

[16] Sun YL, Zhou FM, Wang HR. Mechanism of pomegranate ellagic polyphenols reducing insulin resistance on gestational diabetes mellitus rats. American Journal of Translational Research. 2019; 11(9):5487-500. [PMCID]

[17] Ammar A, Turki M, Chtourou H, Hammouda O, Trabelsi K, Kallel C, et al. Pomegranate supplementation accelerates recovery of muscle damage and soreness and inflammatory markers after a weightlifting training session. PLOS one. 2016; 11(10):e0160305. [DOI:10.1371/journal.pone.0160305] [PMID] [PMCID]

[18] Trombold JR, Barnes JN, Critchley L, Coyle EF. Ellagitannin consumption improves strength recovery 2-3 d after eccentric exercise. Medicine and Science in Sports and Exercise. 2010; 42(3):493-8. [DOI:10.1249/MSS.0b013e3181b64edd] [PMID]

[19] Machin DR, Christmas KM, Chou TH, Hill SC, Van Pelt DW, Trombold JR, et al. Effects of differing dosages of pomegranate juice supplementation after eccentric exercise. Physiology Journal. 2014:271959 . [DOI:10.1155/2014/271959]

[20] Moder M, Drianoush F, Firouzmand H, Jafari H, Khanzadeh M. [The effect of increasing and medium term exercise on serum levels of superoxide dismutase and catalase in rats (Persian)]. Journal of Gorgan University of Medical Sciences.1395; 16(3):24-30. http://goums.ac.ir/journal/article-1-2113-fa.html

[21] Burneiko RC, Diniz YS, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GMX, Faine LE, et al. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. Food and Chemical Toxicology. 2006; 44(7):1167-72. [DOI:10.1016/j.fct.2006.01.004] [PMID]

[22] Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multi gene family: A comparison of the CuZn-SOD(SOD1), Mn-SOD(SOD2)and EC-SOD(SOD3) gene structures, evolution and expression. Free Radical Biology and Medicine. 2002; 33(3):337-49. [DOI:10.1016/S0891-5849(02)00905-X]

[23] Yavari A, Javadi M, Mirmiran P, Bahadoran Z. Exercise-induced oxidative stress and dietary antioxidants. Asian Journal of Sports Medicine. 2015; 6(1):e24898 [DOI:10.5812/asjsm.24898] [PMID] [PMCID]

[24] Trombold JR, Reinfeld AS, Casler JR, Coyle EF. The effect of pomegranate juice supplementation on strength and soreness after eccentric exercise. The Journal of Strength & Conditioning Research. 2011; 25(7):1782-8. [DOI:10.1519/JSC.0b013e318220d992] [PMID]

[25] Ghavipour M, Sotoudeh G, Tavakoli E, Mowla K, Hasanzadeh J, Mazloom Z. Pomegranate extract alleviates disease activity and some blood biomarkers of inflammation and oxidative stress in Rheumatoid Arthritis patients. European Journal of Clinical Nutrition. 2017; 71(1):92-6. [DOI:10.1038/ejcn.2016.151] [PMID]

[26] Newman ED. Effects of pomegranate polyphenol supplementation on biomarkers of oxidative stress and inflammation in adults with type 2 diabetes versus healthy controls [MSc. Thesis]. United States: Oklahoma State University; 2010. https://shareok.org/handle/11244/9253

[27] Jose T, Pattanaik AK, Jadhav SE, Dutta N, Sharma S. Nutrient digestibility, hindgut metabolites and antioxidant status of dogs supplemented with pomegranate peel extract. Journal of Nutritional Science. 2017; 6:e36. [DOI:10.1017/jns.2017.34] [PMID] [PMCID]

[28] Shaygannia E, Bahmani M, Zamanzad B, Rafieian-Kopaei M. A review study on *Punica granatum L*. Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine. 2016; 21(3):221-7. https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/2156587215598039

[29] Kushwaha SC. Study on extraction of pomegranate ellagitannin storage stability and its application [PhD. dissertation]. India: Sant Longowal Institute of Engineering and Technology; 2016. https://shodhganga.inflibnet.ac.in/handle/10603/75331

[30] Sood A, Gupta M. Extraction process optimization for bioactive compounds in pomegranate peel. Food Bioscience. 2015; 12:100-6. [DOI:10.1016/j.fbio.2015.09.004]

This Page Intentionally Left Blank