مقاله تحقیقی

اثر عصاره هیدروالکلی گل انار (*Punica granatum* L.) بر تعداد سلول‌های بتای فعال پانکراس در موش‌های صحرایی دیابتی‌شده توسط استرپتوزوتوسین

حمیدرضا انوشیروانی [۱]، مریم عیدی [*۲]، اکرم عیدی [۳]، علیرضا صادقی‌پور [۴]، پونه شاه‌محمدی [۵]، مصطفی حمیدی نعمانی [۱]، افشین خرمی [۱]، فاطمه ترابی [۶]، زهرا اسکندری پری [۶]

۱. کارشناس زیست‌شناسی سلولی مولکولی (ژنتیک)، عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا
۲. دانشیار فیزیولوژی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشکده علوم زیستی، ورامین، ایران
۳. دانشیار فیزیولوژی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران
۴. دانشیار پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز تحقیقات انکولوژی، بخش پاتولوژی، تهران، ایران
۵. کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست‌شناسی، ورامین، ایران
۶. کارشناس زیست عمومی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی، ورامین، ایران

* **مسؤول مکاتبات:** دکتر مریم عیدی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین – پیشوا، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست‌شناسی، ورامین، ایران، آدرس الکترونیکی: eidi@iauvaramin.ac.ir

محل انجام تحقیق: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین – پیشوا، دانشکده علوم زیستی

تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۳۰ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۳۰

چکیده

در مطالعه حاضر، تاثیر عصاره هیدروالکلی گل انار بر تعداد سلول‌های فعال بتای پانکراس در رت‌های دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تعیین تعداد سلول‌های فعال بتای پانکراس، بعد از تیمار عصاره، حیوانات توسط دی‌اتیل‌اتر، بیهوش و پانکراس آن‌ها خارج شد و پس از فیکس‌شدن در فرمالدئید ۴ درصد، با استفاده از پارافین برای برش‌گیری آماده شدند. از نمونه‌های پانکراس، برش‌های ۳ میکرونی تهیه شد و تعداد سلول‌های بتای فعال، با استفاده از کیت ایمونوسیتوشیمی بررسی گردید. نتایج نشان داد که تیمار عصاره هیدروالکلی در غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، موجب افزایش تعداد سلول‌های بتا با فعالیت ترشحی انسولین، در مقایسه با رت‌های دیابتی کنترل می‌شود. گل انار به طور موثری فعالیت سلول‌های بتا را در مقایسه با رت‌های دیابتی کنترل افزایش می‌دهد. بنابراین، گل انار با افزایش آزادسازی انسولین، موجب کاهش گلوکز سرم در حیوانات دیابتی می‌شود. در نتیجه، عصاره هیدروالکلی گل انار، دارای اثر هیپوگلیسمیک در رت‌های دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین با آزادسازی انسولین از سلول‌های بتای پانکراس شده و احتمالا کاربرد سنتی آن تایید می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: انار، گل، ایمونوسیتوشیمی، سلول بتا، هیپوگلیسمیا، دیابت، رت

مقدمه

بیماری دیابت در حال حاضر عامل مهمی در ناتوانی و بستری شدن بیماران بوده و فشار مالی قابل‌توجهی را به جامعه تحمیل می‌کند، به‌طوری‌که در هند سالانه حدود ۹۲ میلیون دلار صرف هزینهٔ درمان افراد مبتلا به دیابت می‌شود (۳). تخمین زده‌شده که در سال ۲۰۱۰ میلادی، تعداد کل بیماران دیابتی در سراسر دنیا به ۲۳۹ میلیون نفر برسد. آسیا و آفریقا بالاترین پتانسیل را برای ابتلا به بیماری

دیابت دارند، به‌طوری‌که نسبت دیابت در این مناطق به دو تا سه برابر سایر نواحی می‌رسد (۴). روش‌هایی که در حال حاضر برای درمان دیابت غیر وابسته به انسولین استفاده می‌شوند، مانند تغییر رژیم غذایی و عوامل هیپوگلیسمیک خوراکی، محدودیت‌های خاص خود را دارند. کاربرد گیاهان برای درمان دیابت قندی به‌طور وسیعی به‌ویژه در کشورهای آسیای میانه رایج است. سازمان بهداشت جهانی نیز در مورد استفاده از این گیاهان در این کشورها توصیه‌هایی را ارائه نموده است (۵). بسیاری از گونه های گیاهی، در طب سنتی ملل مختلف به‌واسطه خواص هیپوگلیسمیک‌شان برای درمان دیابت قندی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۶).

انار با نام علمی *Punica granatum* L. متعلق به خانواده *Puniaceae* است که به آن Pomegrenate نیز می‌گویند، بومی ایران است و در تمام استان‌های کشور، به استثنای استان همدان، ارقام متفاوتی از آن به صورت اهلی، وحشی و یا زینتی، آبی یا دیم، به شکل انبوه یا پراکنده، دیده می‌شود. انار، درخت یا درختچه‌ای بزرگ و پرشاخ و برگ با پاجوش‌های زیاد از شاخه پیدازادان، رده نهان‌دانگان، دولپه‌ای و متعلق به کوچک‌ترین خانواده گیاهی، یعنی Punicaceae است. تمام ارقام انار، اعم از معمولی یا خوراکی و زینتی، جزو گونه گراناتوم هستند. گل انار درشت، کامل، بدون بو و معمولاً به رنگ گلی تا قرمز پررنگ است. گل‌ها دارای ۵ کاسبرگ است. کاسه گل که در امتداد نهنج قرار دارد، لوله‌ای، گوشتی و ضخیم است. گلبرگ‌ها به دیواره داخلی نهنج چسبیده و تعداد آن‌ها مساوی کاسبرگ‌ها است. گلبرگ‌ها بعد از گرده‌افشانی، می‌ریزند، در حالی‌که کاسبرگ‌ها عضو دائمی در گل و میوه هستند. تعداد پرچم‌های هر گل بر حسب رقم، متفاوت و در هر گل ۴۰۰-۲۰۰ عدد پرچم وجود دارد. بساک‌ها در انتهای میله پرچم، واقع و مادگی با یک خامه منفرد و کلاله گسترده در میان پرچم‌ها قرار دارد. درخت انار در طول فصل رشد، ۴-۳ مرتبه و در هر نوبت دو نوع گل تولید می‌کند. گل‌هایی که به میوه تبدیل می‌شوند، به گل ثمری یا گل مثمر معروفند و گل‌هایی که می‌ریزند، علفی یا غیرمثمر نام دارند. گل‌های مثمر، کشیده و قطرشان در محل اتصال به اسپور (میخچه) بیشتر از قطرشان در گلوی گل است. گل‌های غیرمثمر نسبت به گل‌های مثمر، کوتاه‌تر و قطرشان در محل اتصال به اسپور کمتر از قطرشان در گلوی گل است. همچنین، در گل‌های ثمری خامه طویل‌تر و سطح کلاله بالاتر از پرچم است. درحالی‌که در گل‌های غیرمثمر، خامه کوتاه‌تر بوده و سطح کلاله پایین‌تر از سطح پرچم‌هاست. گاهی در انار گل‌هایی با مشخصات بینابین نیز دیده می‌شود (۱).

تمام قسمت‌های درخت انار در طب گیاهی مورد استفاده دارد. عصاره پوست درخت، خاصیت ضدکرم دارد و به‌خصوص برای کرم‌های تیپ ورم و هایمنولپی دوزیس موثر است. خاصیت ضدکرم آن به‌دلیل ماده ایزوپله‌تیه‌رین و سایر آلکالوئیدهای مختلف آن به‌ویژه پله‌تیرین است. در پوست درخت، علاوه بر تانن، اسید پونیکوتانیک، بتولیک اسید و اورسولیک اسید نیز وجود دارد. در پوست ریشه و پوست اندام‌های هوایی گیاه، آلکالوئیدهای متیل پله‌تیه‌رین، ایزوپله‌تیه‌رین، پله‌تیه‌رین و پزودوپله‌تیه‌رین گزارش شده است (۲).

بسیاری از گونه‌های گیاهی هستند که در طب سنتی ملل مختلف به‌واسطهٔ خواص هیپوگلیسمیک‌شان برای درمان دیابت قندی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۶).

هدف از پژوهش حاضر تعیین اثر عصاره گل انار بر تعداد سلول های بتا پانکراس در موش های صحرایی دیابتی است.

مواد و روش‌ها

مادهٔ گیاهی

گل گیاه انار (*Punica granatum* L.) در بهار ۱۳۸۹ از پارک پلیس واقع در شرق تهران جمع‌آوری شد. پس از تمیز کردن، گیاه در سایه و در حرارت ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد خشک شد. سپس گل‌های خشک شده با آسیاب مکانیکی پودر شد و پودر خشک‌شده در یک کیسهٔ نایلونی در فریزر تا زمان انجام آزمایش نگهداری گردید.

تهیه عصارهٔ اتانلی گیاه

گل‌های خشک و پودر شده (حدود ۶۰ گرم) با ۳۰۰ میلی‌لیتر اتانل (۸۰ درصد) در دستگاه سوکسله

به‌مدت ۷۲ ساعت قرار گرفت. سپس عصاره، صاف شد و توسط دستگاه روتاری، خشک گردید.

حیوانات

موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار، از انستیتو پاستور کرج در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم، خریداری و در قفس‌های تمیز با درجهٔ حرارت ۲۴–۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد و سیکل نوری ۱۲ ساعت نور، ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۶۰ – ۴۰ درصد در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین نگهداری شدند. حیوانات، دسترسی کافی به آب و غذا داشتند.

آماده‌سازی حیوانات دیابتی

استرپتوزوتوسین، بلافاصله پیش از انجام آزمایش، در سرم فیزیولوژیک استریل حل شد و به‌روش درون‌صفاقی (100 mg/kg, i.p.) به موش‌های صحرایی تزریق گردید. ۵ روز پس از تزریق، حیوانات برای انجام ادامه آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

نحوهٔ تیمار

عصارهٔ گیاهی در غلظت‌های۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و سالین به صورت تزریق درون‌صفاقی به مدت ۱۸ روز تیمار گردید. حجم مادهٔ تیمار شده در تمامی گروه‌ها ۰/۵ میلی‌لیتر بود. تعداد حیوانات در هر گروه ۸ سر بود.

گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌های مورد مطالعه شامل موارد زیر بودند:

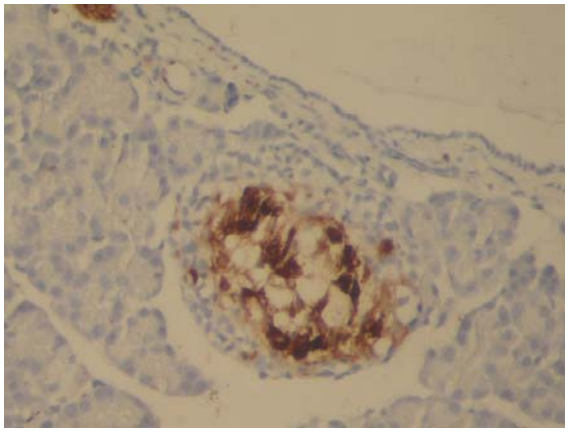
۱- گروه کنترل سالم که به‌روش درون‌صفاقی با سالین تیمار شدند.

۲- گروه کنترل دیابتی که به‌روش درون‌صفاقی با سالین تیمار شدند.

۳، ۴، ۵ و ۶ - گروه‌های دیابتی تجربی که عصارهٔ گیاهی را با غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌روش درون‌صفاقی دریافت نمودند.

تعیین تعداد سلول‌های بتای فعال پانکراس

به‌منظور تعیین تعداد سلول بتای فعال پانکراس، پس از ۱۸ روز و خاتمه دوره آزمایش، حیوانات توسط دی‌اتیل‌اتر، بیهوش شدند. پانکراس حیوانات خارج شد و در بافر فرمالدئید ۴ درصد به‌مدت ۲۴ ساعت فیکس شد و به‌منظور برش‌گیری، در پارافین قرار گرفت. برش‌های ۳ میکرومتری برای تعیین تعداد سلول‌های بتای پانکراس با استفاده از کیت ایمونوسیتوشیمی (DAKO, Germany) آماده شدند. نمونه‌ها پس از آماده‌سازی نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ۱۰۰×، مطالعه گردید و تعداد جزایر لانگرهانس (که بر اساس وجود انسولین در آن‌ها رنگ‌آمیزی شده‌اند) در ۳۰ میدان دید میکروسکوپیک با ابژکتیف ۴ شمارش شدند (تصویر ۱). سپس نتایج به‌دست آمده از نمونه‌های تجربی با نتایج کنترل دیابتی و کنترل سالم، مقایسهٔ آماری گردید.



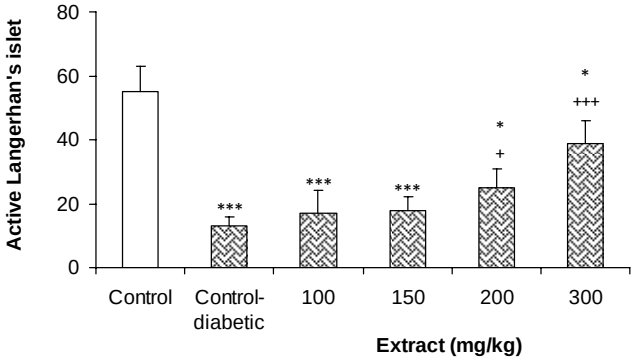
تصویر ۱ -تصویر میکروسکوپ نوری از جزایر لانگرهانس موش‌های صحرایی با رنگ‌آمیزی ایمونوپراکسیداز (بزرگنمایی ۴۰۰×).

آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست Tukey از نظر آماری بررسی گردید. همهٔ داده‌ها به‌صورت Mean ± S.E.M. ارائه شدند. اختلاف بین گروه‌ها در سطح معنی‌داری $p<0.05$ تعیین شد.

نتایج

نتایج ایمونوسیتوشیمی نشان داد که تیمار استرپتوزوتوسین، موجب تخریب سلول‌های بتا در گروه کنترل دیابتی در مقایسه با گروه کنترل سالم می‌شود. از طرف دیگر، تیمار عصاره هیدروالکلی گل انار به‌مدت ۱۸ روز، موجب افزایش تعداد سلول‌های بتای رنگ‌آمیزی شده در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل دیابتی می‌گردد (نمودار ۱).



نمودار ۱ – اثر تزریق درون‌صفاقی عصارهٔ الکلی گل انار در غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر تعداد سلول‌های بتای پانکراس در موش‌های صحرایی سالم (Control)، کنترل دیابتی (Control-diabetic) و تجربی. هر ستون Mean ± S.E.M. را برای ۸ رت نشان می‌دهد. گروه‌های کنترل و سالم، سالین را به‌عنوان حلال عصاره دریافت کردند. $p<0.05$ *, $p<0.001$ ***، اختلاف از گروه کنترل سالم (Control) را نشان می‌دهد. $p<0.05$ +, $p<0.001$ +++، اختلاف از گروه کنترل دیابتی را نشان می‌دهد.

بحث

دیابت قندی، یک بیماری در حال افزایش در همهٔ کشورهاست. این بیماری دومین بیماری اندوکرینی کشور ما به‌شمار می‌آید. شیوع بالای دیابت و مشکلات فردی و اجتماعی حاصل از آن و لزوم احیای طب سنتی و شناسایی اثرات آنتی‌دیابتیک گیاهان دارویی موجود در طبیعت که دارای آثار درمانی با ارزشی هستند، ما را بر آن داشت تا اثر آنتی‌دیابتیک گل انار و مکانیسم اثر آن را مورد مطالعه قرار دهیم.

میوه انار (*Punica granatum* L. Punicaceae) به‌طور معمول خوراکی است. در طب سنتی کوبا، میوه انار برای درمان اسیدوز، اسهال، عفونت‌های میکروبی، اسهال، helminthiasis، خونریزی و بیماری‌های تنفسی کاربرد دارد (۷،۸،۹).

Arseculeratne و همکاران در سال ۱۹۸۵ کاربرد معمول انار در درمان بیماری تنفسی را گزارش کردند (۱۰). *Punica granatum* دارای فعالیت ضدویروسی است. عصاره گیاه بر ضد ویروس herps موثر است (۱۱). عصاره‌های هیدروالکلی میوه انار دارای فعالیت بالایی بر ضد ویروس انفلوانزا می‌باشد (۱۲،۱۳،۱۴).

گل‌های انار دارای ترکیباتی هستند که در پوست میوه انار (مانند اسید گالیک) و هسته (مانند اسید اورسولیک) یافت می‌شوند (۱۵). مطالعات بیشتری برای شناسایی شیمی این گل‌ها باید انجام گیرد. گل‌های انار در طب سنتی Unani و Ayurvedic برای درمان دیابت توصیف شده‌اند (۱۶،۱۷).

نتایج آزمایش‌های ایمونوسیتوشیمی نشان داد که تیمار طولانی‌مدت عصاره هیدروالکلی (۸۰٪) گل انار به حیوانات دیابتی، موجب افزایش میزان انسولین در سلول‌های بتای پانکراس در مقایسه با رت‌های دیابتی کنترل می‌گردد.

در توافق با نتایج حاضر، Jafri و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که تیمار عصاره هیدروالکلی

(۵۰٪) گل انار موجب کاهش گلوکز سرم در رت‌های تیمار شده توسط آلوکسان می‌گردد. این مطالعه برای اولین بار اثر آنتی‌هیپرگلیسمیک عصاره گل‌های انار را گزارش می‌کند که یک داروی یونانی مورد استفاده توسط پزشکان یونانی برای درمان دیابت است. در تضاد با نتایج تحقیق حاضر، آن‌ها پیشنهاد نمودند که اثر گل انار، به سبب تقویت ترشح انسولین از سلول‌های بتای پانکراس تبوده و احتمالا در دیابت غیروابسته به انسولین موثر است و احتمالا به سبب افزایش مصرف محیطی گلوکز است (۱۸).

همچنین، بر اساس نتایج، تحقیقات گزارش کرده‌اند که عصاره انار موجب کاهش جذب گلوکز در روده می‌شود (۱۹). تحقیقات Sharma و همکارانش در سال ۱۹۸۳ نشان داد که گل انار، موجب مهار مکانیسم جذب مجدد توبول پراکسیمال گلوکز در کلیه و در نتیجه، باعث کاهش گلوکز خون می‌شود (۲۰).

Althunibat و همکاران گزارش نمودند که تیمار درون‌صفاقی عصاره پوست انار به مدت ۴ هفته، بطور موثری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کبد و کلیه رت‌های دیابتی‌شده توسط استرپتوزوتوسین را افزایش می‌دهد. این عصاره، مالون‌دی‌هیدرات را که یک مارکر لیپید است، به میزان قابل توجهی در رت‌های دیابتی کاهش و نیز ظرفیت آنتی‌اکسیدان توتال را در طرح غیروابسته به غلظت، افزایش می‌دهد. بنابراین، عصاره پوست انار دارای نقش محافظتی بر ضد آسیب اکسیداتیو در رت‌های دیابتی‌شده توسط استرپتوزوتوسین است (۲۱).

Bagri و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که تیمار عصاره آبی گل انار به‌مدت ۲۱ روز، موجب اثر آنتی‌هیپرگلیسمیک وابسته به دوز در رت‌های دیابتی‌شده توسط استرپتوزوتوسین می‌گردد. یافته‌های آن‌ها اثرات مثبت گل انار را بر رت‌هایی که توسط استرپتوزوتوسین دچار اختلالاتی در پروفیل لیپوپروتئین، وضعیت آنتی‌اکسیدان و تحمل گلوکز شده بودند، نشان داد. پس، عصاره آبی گل انار، در کنترل دیابت، اختلال در پروفیل لیپید و استرس اکسیداتیو با فعال‌نمودن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان پانکراسی مفید است (۲۲).

Huang و همکارانش در سال ۲۰۰۵ گزارش نمودند که عصاره گل انار با فعال‌نمودن رسپتورهای فعال‌شده تکثیر پراکسیزوم (Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-γ) دارای عمل ضددیابتی است. گالیک اسید موجود در این بخش از انار، ترکیب مهم و موثر این گیاه است (۲۳).

Li و همکارانش در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که عصاره گل انار با مهار آنزیم گلوکوزیداز روده‌ای، موجب بهبود دیابت در رت‌های دیابتی می‌شود (۲۴).

طبق نتایج تحقیق حاضر، عصارهٔ الکلی گل انار به‌صورت مؤثری، گلوکز سرم را در رت‌های دیابتی کاهش می‌دهد و مکانیسم اثر آن با افزایش آزادسازی انسولین از سلول‌های بتای پانکراسی است. لذا می‌توان عصاره این گیاه را به‌عنوان داروی ضددیابتی در نظر گرفت. هر چند تحقیق‌های بیوشیمیایی و فارماکولوژیکی بیشتری را باید برای استفاده از آن مدنظر قرار داد.

تقدیر و تشکر

از باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین به‌واسطه تامین بودجه مالی تحقیق حاضر، کمال تشکر و امتنان داریم. همچنین از پرسنل محترم بخش پاتولوژی بیمارستان رسول اکرم صمیمانه تشکر می‌نماییم.

منابع مورد استفاده

۱. پویان، م. ۱۳۸۸. گیاهان دارویی خراسان جنوبی، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد بیرجند. فصل ۴، ص ۳۹۴-۳۹۲.

۲. عیدی، ا، عیدی، م. ۱۳۸۴. گیاهان دارویی ایران. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ص ۱۱۰-۱۰۹.

3. American Diabetes Association, 1997. Clinical practice recommendations. Diabetes Care 20 (Suppl. 1), S1-S70.

4. Baily, C. J., Flatt, P. R., 1986. Antidiabetic drugs, new developments. Indian Biotechnology 6: 139-142.

5. Burman, T. K., 1985. Isolation and hypoglycaemic activity of glycoprotein Moran A from mulberry leaves. Planta Med 71: 482-484.
6. Foster, D. W., 1994. Diabetes mellitus. In: Isselbacher, K. J., Brawnwald, E., Wilson, J. D., Martin, J. B., Fauci, A. S., Kasper, D. L., (Eds.), Harrison's Principales of Internal Medicine. McGraw Hill, United State, pp. 1979-1981.
7. Roig, J. T., 1974. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Ciencia y Técnica, Havana, pp. 401–402.
8. Jimenez, C. A., Rojas, N., López, A. M., 1979. Biological evaluation of Cuban plants (IV). Revista Cubana de Medicina Tropical 31: 29–35.
9. Seoane, J., 1984. El folklor médico de Cuba. Provincia de Camaguey. Ciencias Sociales, Havana, pp. 29, 256, 285, 311, 412, 454, 629, 642.
10. Arseculeratne, S. N., Gunatilaka, A. A., Panabokke, R. G., 1985. Studies of medicinal plants of Sri Lanka. Part 14: toxicity of some traditional medicinal herbs. Journal of Ethnopharmacology 13: 323–335.
11. Zhang, J., Zhan, B., Yao, X., Gao, Y., Shog, J., 1995. Anti-viral activity of tannin from the pericarp of *Punica granatum* L. against genital Herpes virus in vitro. Chung Kuo Chung Yao Tsa Chin 20: 556–558.
12. Peña, B. R., 1998. BLBU: Un extracto de frutos de *Punica granatum* L. con actividad contra el virus de la Influenza. Thesis for the Master in Microbiology Degree. Faculty of Biology, University of Havana.
13. Peña, B. R., Martínez, M. T., 2001. Inhibición de la hemaaglutinación de cepas de influenza A por un extracto liofilizado de granada BLBU. Revista Cubana de Qu´ımica XIII, 395.
14. Caballero, O., Peña, B. R., Zurcher, J., Ortín, J., Martínez, T., 2001. Actividad inhibitory de extractos del fruto de *Punica granatum* sobre cepas del virus de la gripe. Revista Cubana de Qu´ımica XIII, 106.
15. Huang, T. H., HYang, Q., Harada, M., Li, G. Q., Yamahara, J., Roufogalis, B. D., Li, Y., 2005. Pomegranate flower extract diminishes cardiac fibrosis in Zucker diabetic fatty rats: modulation of cardiac endothelin-1 and nuclear factor-kappaB pathways. Journal of Cardiovascular Pharmacology 46: 856–862.
16. Jurjani, M. I., 1878. Zakheera-Khwarzam-Shahi. Munshi Nawal Kishore, Lucknow, 540 (Urdu translation).
17. Majoosi, A. I. A., 1889. Kamilussanah. Munshi Nawal Kishore, Lucknow 145 (Urdu translation).
18. Jafri, M. A., Aslam, M., Javed, K., Singh, S., 2000. Effect of *Punica granatum* Linn. (flowers) on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology 70: 309–314.
19. Nogueira, D. G., Pereira, N. A., 1986. Inhibitory action of intestinal absorption of glucose of the epicarp of roma (*Punica granatum* L.). Rev Bras Farm 67: 129–134.
20. Sharma, M. K., Khare, A. K., Feroz, H., 1983. Effect of neem oil on blood glucose levels of normal, hyperglycemic and diabetic animals. Ind Med Gazette 117: 380–383.
21. Althunibat, O. Y., Al-Mustafa, A. H., Tarawneh, K., Khleifat, K. M., Ridzwan, B. H., Qaralleh, H. N., 2010. Protective role of *Punica granatum* L. peel extract against oxidative damage in experimental diabetic rats. Process Biochemistry 45: 581–585.
22. Bagri, P., Mohd, A., Aeri, V., Bhowmik, M., Sultana, S., 2009. Antidiabetic effect of *Punica granatum* flowers: Effect on hyperlipidemia, pancreatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. Food and Chemical Toxicology 47: 50–54.
23. Huang, T. H. W., Peng, G., Kota, B. P., Li, G. Q., Yamahara, J., Roufogalis, B. D., Li, Y., 2005. Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: Activation of PPAR-γ and identification of an active component. Toxicology and Applied Pharmacology 207: 160–169.
24. Li, Y., Wen, S., Kota, B. P., Peng, G., Li, G. Q., Yamahara, J., Roufogalis, B. D., 2005. *Punica granatum* flower extract, a potent-glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats. Journal of Ethnopharmacology 99: 239–244.