

Comparative Evaluation of the Antioxidant Activities and Selective Cytotoxic Effects of Black-Peel Pomegranate (*Punica granatum* L.) Extracts from Three Native Iranian Cultivars

Samira Farhadi¹, Ali Aalami^{2*} , Mehdi Sohani³, Shahrokh Ghovvati⁴, Hassan Rezadoost⁵, Issa S. Al-Amri⁶

1. Ph.D. Student in Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

2. Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

3. Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

4. Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

5. Associate Professor, Medicinal Plants and Drug Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

6. Professor, Department of Biological Sciences and Chemistry, College of Arts and Sciences, University of Nizwa, Nizwa, Sultanate of Oman.

Correspondence:

Ali Aalami

Email: ali_aalami@guilan.ac.ir

Received: 7, Jul. 2025

Accepted: 2, Sep. 2025

How to cite:

Farhadi, S., Aalami, A., Sohani, M., Ghovvati, S., Rezadoost, H., & S. Al-Amri, I. (2025). Comparative Evaluation of the Antioxidant Activities and Selective Cytotoxic Effects of Black-Peel Pomegranate (*Punica granatum* L.) Extracts from Three Native Iranian Cultivars. *Crop Biotechnology*, 15 (2), 27-38.

(DOI: [10.30473/cb.2025.75086.2013](https://doi.org/10.30473/cb.2025.75086.2013))

ABSTRACT

This study evaluated the antioxidant and anticancer activities of both crude and fractionated (aqueous and ethyl acetate) extracts derived from black peel pomegranate fruits of three Iranian cultivars: Yazd, Saveh, and Esfahan. Extracts were obtained through sonication in a hydroalcoholic solvent, followed by liquid-liquid partitioning. Antioxidant capacity was assessed using the ABTS assay, while cytotoxic effects were measured via the MTT assay in two human breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231), along with normal HUVEC cells to assess selectivity. The ethyl acetate fraction of the Yazdi cultivar exhibited the highest antioxidant activity, achieving over 90% inhibition of ABTS^{•+} radicals. It also induced significant, dose-dependent cytotoxicity in both cancer cell lines, with negligible effects on normal cells, indicating promising selectivity. To explore the mechanism of action, qRT-PCR was used to evaluate the expression of pro-apoptotic genes. Treatment with the Yazdi extract resulted in a substantial upregulation of BAX (12-fold) and TP53 (13-fold), suggesting activation of the intrinsic apoptotic pathway. The notable bioactivity observed in the Yazdi extract may be attributed to its rich phytochemical profile, potentially enhanced by the region's arid climate, which is known to promote the biosynthesis of secondary metabolites. These findings highlight the potential of black peel pomegranate, particularly the Yazdi cultivar, as a natural, safe, and effective candidate for adjunctive breast cancer therapy. Additionally, the valorization of agricultural byproducts such as pomegranate peel represents a sustainable and cost-effective strategy in natural product-based drug discovery.

KEYWORDS

Antioxidant, Apoptosis, Breast cancer, Pomegranate peel extract.



«مقاله پژوهشی»

ارزیابی مقایسه‌ای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و اثر سیتوتوکسیک انتخابی عصاره سه رقم انار (*Punica granatum* L.) پوست سیاه بومی ایران

سمیرا فرهادی^۱، علی اعلمی^{۲*}، مهدی سوهانی^۳، شاهرخ قوتی^۴، حسن رضادوست^۵ و عیسی الامری^۶

چکیده

هدف این پژوهش، بررسی جامع خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی عصاره تام و بخش‌بندی‌شده (آبی و اتیل استاتی) حاصل از میوه کامل انار پوست سیاه از سه رقم بومی ایران (یزد، ساوه و اصفهان) بر رده‌های سلولی سرطان پستان بود. عصاره‌ها با استفاده از روش سونیکاسیون در حلال هیدروالکلی استخراج و سپس با اتیل استات به دو فاز قطبی و نیمه‌قطبی تفکیک شدند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی با آزمون ABTS و سمیت سلولی با آزمون MTT در رده‌های MCF-7، MDA-MB-231 و سلول‌های نرمال HUVEC به‌منظور ارزیابی انتخاب‌پذیری مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین، برای بررسی مسیرهای مولکولی آپوپتوز، بیان ژن‌های BAX و TP53 در سلول‌های تیمار شده با عصاره اتیل استاتی رقم یزد با روش qRT-PCR سنجیده شد. نتایج نشان داد که عصاره اتیل استاتی رقم یزد دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با مهار بیش از ۹۰ درصد رادیکال ABTS⁺ و اثرات سیتوتوکسیک معنادار وابسته به دوز در هر دو رده سرطانی بود، در حالی که سلول‌های نرمال HUVEC پاسخ منفی قابل توجهی نشان ندادند. بیان ژن‌های BAX و TP53 نیز به‌ترتیب تا ۱۲ و ۱۳ برابر افزایش یافت که نشان‌دهنده القای مسیر ذاتی آپوپتوز در این رده‌های سرطانی است. جمع‌بندی نتایج حاکی از آن است که عصاره اتیل استاتی انار پوست سیاه رقم یزد، به‌واسطه دارا بودن ترکیبات زیست‌فعال با پتانسیل بالا، می‌تواند گزینه‌ای طبیعی، ایمن و مؤثر در توسعه درمان‌های مکمل یا جایگزین برای سرطان پستان باشد. استفاده از ضایعات کشاورزی مانند پوست انار نیز رویکردی پایدار و اقتصادی در مسیر کشف دارو محسوب می‌شود. با این حال، انجام مطالعات پیش‌بالینی گسترده‌تر و شناسایی دقیق ترکیبات مؤثر برای تأیید اثربخشی بالینی ضروری است.

واژه‌های کلیدی

آپوپتوز، آنتی‌اکسیدان، عصاره پوست انار، سرطان پستان.

۱. دانشجوی دکترا، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۲. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۳. استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۴. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۵. دانشیار، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.
۶. استاد گروه علوم زیستی و شیمی، دانشکده هنر و علوم، دانشگاه نرزی، نرزی، سلطان‌نشین عمان.

نویسنده مسئول:

علی اعلمی

رایانامه: ali_aalami@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۱۱

استناد به این مقاله:

فرهادی، سمیرا؛ اعلمی، علی؛ سوهانی، مهدی؛ قوتی، شاهرخ؛ رضادوست، حسن و الامری، عیسی (۱۴۰۴). ارزیابی مقایسه‌ای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و اثر سیتوتوکسیک انتخابی عصاره سه رقم انار (*Punica granatum* L.) پوست سیاه بومی ایرانی ب، فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۳۷-۳۸، (۲)، ۱۵.

(DOI: [10.30473/cb.2025.75086.2013](https://doi.org/10.30473/cb.2025.75086.2013))



مقدمه

سرطان پستان به عنوان شایع ترین سرطان در میان زنان، همچنان یکی از مهم ترین معضلات سلامت عمومی در سطح جهان محسوب می شود. بر پایه گزارش های اپیدمیولوژیک اخیر، از جمله داده های GLOBOCAN 2022، سالانه بیش از ۲/۳ میلیون مورد جدید سرطان پستان در دنیا شناسایی می شود و این بیماری عامل نزدیک به ۶۸۵ هزار مرگ سالانه در میان زنان است (Cao et al., 2021; Cao et al., 2022). به طور خاص، این نوع سرطان حدود ۱۱/۶ درصد از کل موارد جدید سرطان را به خود اختصاص داده و در بسیاری از کشورها، به عنوان اولین یا دومین علت مرگ و میر زنان ناشی از سرطان گزارش شده است (Bray et al., 2021; Sung et al., 2024). در ایران نیز، مطابق با گزارش وزارت بهداشت و داده های پایگاه ثبت سرطان، سرطان پستان با نرخ بروز استاندارد شده سنی حدود ۳۵/۸ در هر ۱۰۰ هزار زن، مقام نخست را در میان سرطان های زنان دارد و روند افزایشی آن طی دو دهه گذشته نگران کننده بوده است. گزارش های اپیدمیولوژیک اخیر در ایران نشان می دهد که نرخ بروز استاندارد شده سنی از ۱۸۰۸ در سال ۱۹۹۰ به ۳۴۰۰ در سال ۲۰۱۹ افزایش یافته است (Aryannejad et al., 2023). همچنین، مطالعه ای جغرافیایی، اپیدمیولوژیک در جمعیت استان گلستان، رشد سالانه متوسط ۴/۴٪ را گزارش کرده است (Haghpanah et al., 2023). شروع بیماری در زنان ایرانی معمولاً حدود ۱۰ سال زودتر از میانگین جهانی رخ می دهد و این امر بر اهمیت غربالگری، پیشگیری و درمان مؤثر تأکید می کند (Alizadeh et al., 2021; Aryannejad et al., 2023). علیرغم پیشرفت های درمانی در حوزه های شیمی درمانی، هورمون درمانی و درمان های هدفمند، مقاومت دارویی، عوارض جانبی قابل توجه و نرخ بالای عود بیماری، چالش های جدی در مدیریت این بیماری محسوب می شوند. در این میان، استفاده از ترکیبات طبیعی با منشأ گیاهی به دلیل سمیت پایین، سازگاری بهتر با بدن و مکانیسم های چندگانه اثرگذاری، به عنوان گزینه ای مکمل

یا جایگزین مورد توجه گسترده قرار گرفته اند (Newman & Cragg, 2020).

یکی از عوامل کلیدی در شروع و گسترش سرطان، استرس اکسیداتیو است که در نتیجه تولید بیش از حد رادیکال های آزاد و کاهش توان آنتی اکسیدانی بدن ایجاد می شود. ترکیبات زیست فعال گیاهی نظیر پلی فنول ها و فلاونوئیدها می توانند با خنثی سازی رادیکال ها، تنظیم مسیرهای سیگنال دهی سلولی و القای آپوپتوز، نقش مهمی در مهار تومور ایفا کنند (Reuter et al., 2010; Zheng et al., 2021). آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلول، یکی از فرآیندهای حیاتی در حفظ تعادل بافتی و حذف سلول های آسیب دیده یا سرطانی است. این فرآیند از طریق مسیرهای درونی و بیرونی تنظیم می شود و اختلال در آن، نقش مهمی در ایجاد و پیشرفت بسیاری از سرطان ها از جمله سرطان پستان دارد. هدف قرار دادن مسیرهای آپوپتوز، یکی از استراتژی های مهم در درمان سرطان محسوب می شود. ترکیبات طبیعی زیست فعال با تأثیر بر این مسیرها می توانند منجر به فعال سازی مرگ سلولی در سلول های توموری شوند و از این طریق به کاهش رشد و پیشرفت سرطان کمک کنند (Elmore, 2007; Wong, 2011).

در این زمینه، انار (*Punica granatum* L.) میوه ای، غنی از پلی فنول ها، تانن ها، اسید های فنوئیک و فلاونوئیدهاست که خواص آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و ضد توموری آن در مطالعات متعددی به اثبات رسیده است. به ویژه ارقام بومی با پوست سیاه مانند انار یزد، ساوه و اصفهان که در مناطق خشک ایران رشد می کنند، به دلیل غلظت بالاتر رنگدانه ها و متابولیت های ثانویه، پتانسیل زیستی بیشتری دارند و می توانند از منظر دارویی نیز حایز اهمیت باشند (Lansky & Newman, 2007; Seeram et al., 2006).

در این مطالعه، با هدف ارزیابی اثرات ضدسرطانی و آنتی اکسیدانی این ارقام، از دو رده سلولی سرطان پستان شامل MCF-7 (هورمون گیر مثبت) و MDA-MB-231 (سه گانه منفی) به همراه سلول های نرمال HUVEC استفاده شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها

انتخاب سه رقم بومی انار شامل یزد، ساوه و اصفهان بر پایه ویژگی‌های فیتوشیمیایی و غنای آن‌ها در ترکیبات زیست‌فعال صورت گرفت. پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که ارقام انار با رنگدانه‌های تیره‌تر، به‌ویژه انواع با پوست سیاه، دارای مقادیر بالاتری از پلی‌فنول‌ها، آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها هستند که با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و پتانسیل ضد سرطانی بالاتر مرتبط است (Ardekani et al., 2010; Tehranifar et al., 2011). همچنین، این سه رقم به دلیل سازگاری با اقلیم خشک و نیمه‌خشک ایران، به‌عنوان منابع غنی از متابولیت‌های ثانویه مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این مطالعه، میوه‌های کامل در فصل برداشت جمع‌آوری شدند. میوه‌های سالم، بدون آسیب فیزیکی یا بیماری، پس از شست‌و شو، خشک شدند. کل میوه شامل پوست، دانه و بافت داخلی به پودر یکنواخت تبدیل و برای استخراج ترکیبات زیستی فعال مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه عصاره آبی و هیدروالکلی

برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال، دو نوع عصاره آبی و هیدروالکلی تهیه شد. در هر دو روش، مقدار ۵/۰ گرم از پودر خشک‌شده میوه کامل انار در ۱۰ میلی‌لیتر از حلال مربوطه ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق روی شیکر با سرعت ۱۵۰ rpm نگهداری شد. رای عصاره آبی، حلال مورد استفاده آب مقطر بود و برای عصاره هیدروالکلی، از مخلوطی با نسبت ۱:۱ از آب و اتانول ۹۹ درصد استفاده گردید. پس از پایان استخراج، عصاره‌ها با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شدند و برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. پس از استخراج، به‌منظور جلوگیری از تخریب حرارتی ترکیبات حساس، عصاره‌ها با روش Refractance Window Drying (RWD) در دمای پایین خشک شدند (Baeghbali et al., 2011; Shams Ardekani et al., 2016).

آزمون آنتی‌اکسیدانی با روش ABTS

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از آزمون ABTS بررسی شد. رادیکال ABTS⁺ با واکنش میان ABTS و پراکسید هیدروژن تولید شد و جذب نوری آن در طول موج ۷۲۸ نانومتر اندازه‌گیری گردید. حجم‌های مختلفی از عصاره به محلول ABTS افزوده شد و درصد مهار رادیکال‌ها محاسبه گردید. نتایج به‌صورت معادل تروکس (TEAC) گزارش شدند (Re et al., 1999).

تفکیک فاز آبی و اتیل‌استاتی

بر اساس نتایج مقدماتی، عصاره هیدروالکلی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدتوموری بالاتری داشت. بنابراین، این عصاره برای مرحله جداسازی مایع-مایع مورد استفاده قرار گرفت. عصاره هیدروالکلی سه بار با حلال اتیل استات پارتیشن شد و به دو فاز تفکیک گردید: فاز آبی (حاوی ترکیبات قطبی‌تر) و فاز اتیل‌استاتی (غنی از ترکیبات نیمه‌قطبی مانند پلی‌فنول‌ها و فلاونوئیدها). فاز اتیل استات به صورت جداگانه با دستگاه روتاری اوپراتور تغلیظ و سپس خشک شدند (Kumar & Mutreja, 2010; Panichayupakaranant et al., 2015).

آزمون سمیت سلولی (MTT Assay)

اثرات سیتوتوکسیک عصاره‌ها بر سلول‌های MCF-7 (هورمون‌گیر مثبت) و MDA-MB-231 (سه‌گانه منفی) و HUVEC (سلول نرمال اندوتلیال انسانی) با استفاده از آزمون MTT بررسی شد. سلول‌ها در محیط DMEM حاوی سرم جنین گاوی ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اتمسفر ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند. سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره (۰ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته تیمار شدند. دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) به‌عنوان کنترل منفی در بالاترین غلظت مورد استفاده قرار گرفت. در پایان هر بازه زمانی، محلول MTT به چاهک‌ها افزوده شد و پس از ۴ ساعت انکوباسیون، رسوب فورمازان با DMSO حل و جذب نوری در ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری

جمله عصاره اتیل استاتی ساوه و اصفهان نیز فعالیت داشتند، اما شدت آن به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از نمونه یزد بود (شکل ۱).

سمیت سلولی عصاره‌ها

آزمون MTT در سلول‌های سرطانی MCF-7 و MDA-MB-231 و سلول نرمال HUVEC نشان داد که عصاره اتیل استاتی BY بیشترین سمیت سلولی را به‌صورت دوز-وابسته نشان داد. در غلظت 400 µg/ml، زنده مانی سلول‌های MCF-7 و MDA-MB231 به حدود ۵۰٪ کاهش یافت، در حالی که زنده مانی سلول‌های نرمال HUVEC حدود ۸۰٪ باقی ماند. این ویژگی نشان‌دهنده اثر انتخاب‌پذیر و بالقوه درمانی عصاره BY است (شکل ۲).

تحلیل بیان ژن‌های BAX و TP53 در پاسخ به تیمار با بخش اتیل استاتی عصاره هیدروالکلی پوست انار

سیاه رقم یزد

بر اساس نتایج حاصل از qRT-PCR، تیمار سلول‌های سرطانی با بخش اتیل استاتی عصاره منجر به افزایش قابل توجه بیان ژن‌های BAX و TP53 شد (Elmore, 2007). در سلول‌های MCF-7 میزان بیان ژن BAX و TP53 به‌ترتیب ۹/۸۵ و ۱۱/۳۱ برابر نسبت به کنترل افزایش یافت ($p < 0.001$, One-way ANOVA). در سلول‌های MDA-MB-231 نیز بیان این دو ژن به‌ترتیب ۱۲/۱۳ و ۱۳ برابر افزایش نشان داد ($p < 0.001$). در مقابل، در سلول‌های نرمال HUVEC تغییرات جزئی و غیرمعنی‌دار بود (حدود ۱/۱۵ برابر، $p > 0.05$). این نتایج نشان‌دهنده القای آپوپتوز از طریق مسیر ذاتی در سلول‌های سرطانی و نقش بالقوه ترکیبات موجود در عصاره در تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی است (جدول ۲).

شد. درصد زنده‌مانی سلول‌ها نسبت به کنترل محاسبه و نتایج حاصل از سه تکرار مستقل به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شدند (Stoddart, 2011). تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism (نسخه ۱۰) و آزمون‌های ANOVA و t-test انجام گرفت ($p < 0.001$).

استخراج RNA و بررسی بیان ژن با qRT-PCR

برای تحلیل مکانیسم‌های مولکولی آپوپتوز، بیان ژن‌های BAX و TP53 در سلول‌های تیمارشده با عصاره اتیل استاتی رقم یزد بررسی شد. استخراج RNA کل با روش TRIzol انجام گرفت. پس از لیز سلول‌ها، کلروفرم افزوده و فاز آبی جدا شد. RNA با ایزوپروپانول رسوب داده شد، با اتانول ۷۰ درصد شسته و در آب بدون Rnase حل شد. کیفیت و کمیت RNA با دستگاه نانودراپ تعیین شد. سنتز cDNA با آنزیم Transcriptase Reverse انجام گرفت و واکنش qRT-PCR با SYBR Green و پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های هدف و ژن مرجع GAPDH انجام شد (Hussain et al., 2018; Malcolm et al., 2025). آنالیز داده‌ها با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام گردید (جدول ۱).

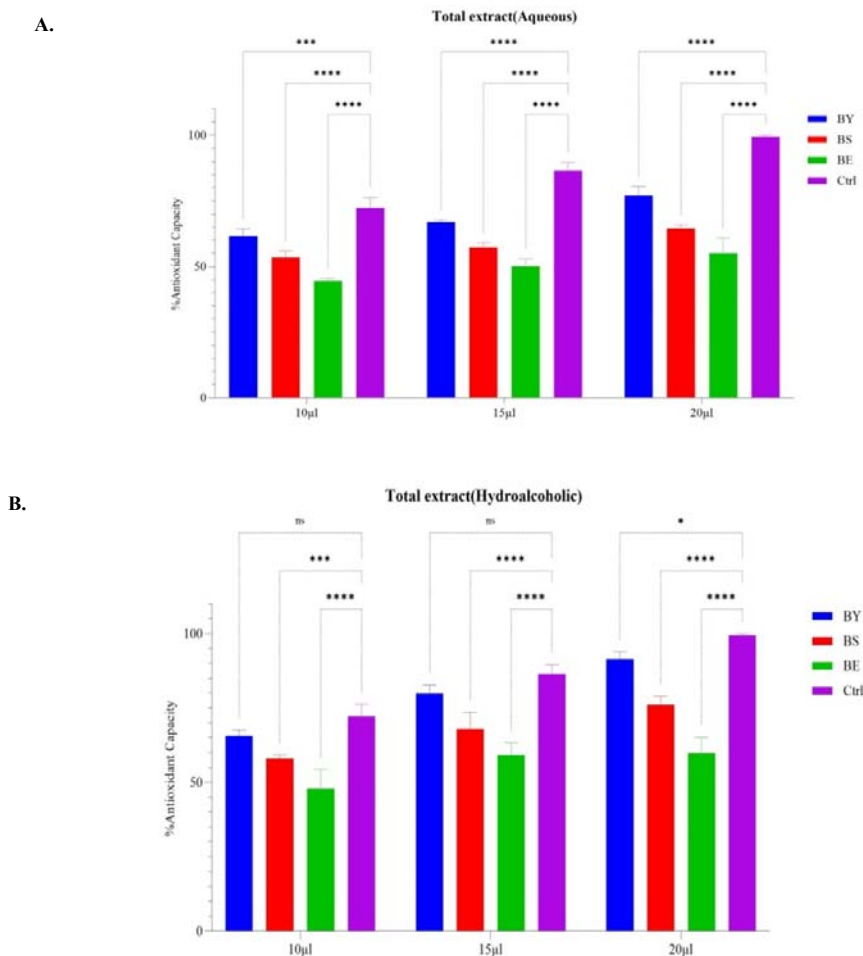
یافته‌های پژوهش

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها

بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های تام، آبی و هیدروالکلی با آزمون ABTS نشان داد که همه عصاره‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد عملکرد قابل‌قبولی دارند. در این میان، عصاره اتیل استاتی انار پوست سیاه یزد با مهار حدود ۹۰ درصد در حجم ۲۰ میکرولیتر، بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان داد که قابل مقایسه با تروکس به‌عنوان استاندارد مثبت بود. سایر نمونه‌ها از

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای سنجش بیان ژن‌های BAX، TP53 و GAPDH در واکنش qRT-PCR

Table 1. Primer sequences used for the expression analysis of BAX, TP53, and GAPDH genes in the qRT-PCR assay		
Target Gene	Forward Primer(5'→3')	Reverse Primer(5'→3')
BAX	TTTGCTTCAGGGTTTCATCC	CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA
TP53	CAGCACATGACGGAGGTTGT	TCATCCAAATACTCCACACGC
GAPDH	GAAGGTGAAGTCCGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC



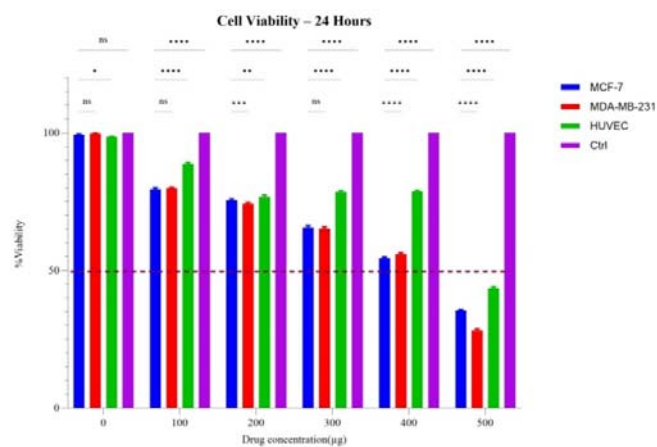
شکل ۱. مقایسه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی (A) و هیدروالکلی (B) حاصل از میوه کامل انار پوست سیاه در سه رقم بومی، یزد (BY)، ساوه (BS)، اصفهان (BE) با استفاده از آزمون ABTS به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار از سه تکرار مستقل ($n=3$) گزارش شده‌اند. تحلیل آماری با آزمون ANOVA دوطرفه (Two-way ANOVA) انجام شد. تفاوت‌های معنی‌دار در سطح $p < 0.001$ مشخص شده‌اند.

جدول ۲. بیان نسبی ژن‌های *BAX* و *TP53* در رده‌های سلولی تیمار شده با عصاره اتیل استاتی انار رقم یزد در مقایسه با گروه کنترل، محاسبه شده بر اساس روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ افزایش معنی‌دار بیان ژن‌ها در سلول‌های سرطانی MCF-7 و MDA-MB-231 و تغییر جزئی در سلول نرمال HUVEC مشاهده شد.

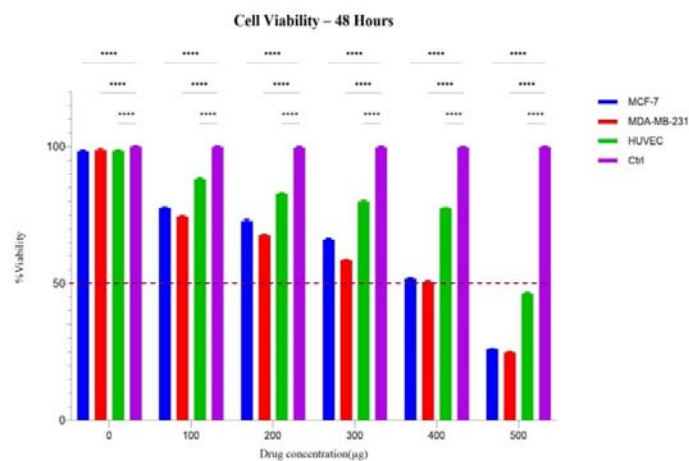
Table 2. Relative expression levels of *BAX* and *TP53* genes in cell lines treated with the ethyl acetate extract of the Yazdi pomegranate cultivar compared to the control group, calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. A significant increase in gene expression was observed in MCF-7 and MDA-MB-231 cancer cell lines, while only slight changes were detected in the normal HUVEC cells.

Cell Line	Gene	Fold Change (vs. control)
MCF-7	BAX	9.85
	TP53	11.31
MDA-MB-231	BAX	12.13
	TP53	13.00
HUVEC (normal)	BAX	1.15
	TP53	1.12

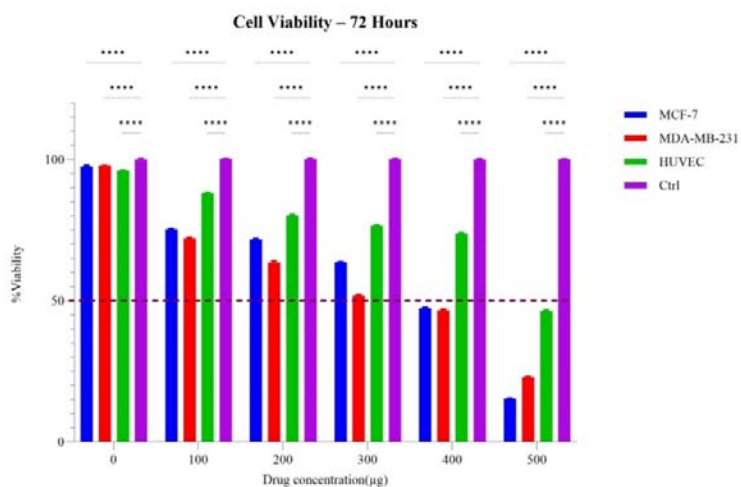
A.



B.



C.



شکل ۲. اثر سیتوتوکسیک عصاره ایتیل استاتی انار رقم یزد بر رده‌های سلولی سرطان پستان MCF-7، MDA-MB-231 و سلول نرمال HUVEC در غلظت‌های مختلف (۰ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) طی سه بازه زمانی 24 (A)، 48 (B) و 72 (C) ساعت (آزمون MTT)، داده‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار از سه تکرار مستقل ($n=3$) گزارش شده‌اند. تحلیل آماری با آزمون ANOVA دوطرفه (Two-way ANOVA) انجام شد؛ تفاوت‌های آماری در سطح معنی‌داری $p < 0.001$ مشخص شده‌اند.

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که عصاره اتیل‌استاتی استخراج‌شده از میوه کامل انار پوست سیاه رقم یزد، فعالیت زیستی قابل‌توجهی شامل خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی و اثر سیتوتوکسیک انتخاب‌پذیر بر سلول‌های سرطانی پستان از خود نشان می‌دهد. این یافته‌ها با نتایج مطالعات قبلی در مورد فعالیت ضدسرطانی عصاره‌های انار و مشتقات پلی‌فنولی آن همخوانی دارد (Lansky & Newman, 2007)، اما برتری قابل توجه عصاره رقم یزد نسبت به ارقام ساوه و صفهان، نشان‌دهنده تفاوت‌های فیتوشیمیایی خاص این رقم است که احتمالاً ناشی از اقلیم خشک و نیمه‌خشک منطقه رویش آن می‌باشد. مطالعات اخیر نیز نشان داده‌اند که اقلیم، شرایط خاک و تنوع ژنتیکی، تأثیر مستقیم بر ترکیب متابولیت‌های ثانویه و فعالیت زیستی عصاره‌های انار دارند (Rangbulla et al., 2025). مطالعات مشابه نشان داده‌اند که ترکیب و غلظت متابولیت‌های ثانویه مانند پلی‌فنول‌ها، فلاونوئیدها و تانن‌ها به شدت تحت تأثیر عوامل اقلیمی و ژنتیکی رقم قرار دارند (Sweidan et al., 2023). بنابراین، تفاوت اثرگذاری عصاره رقم یزد ممکن است ناشی از غلظت بالاتر این ترکیبات فعال زیستی باشد که به صورت خاص در فاز اتیل‌استاتی جذب و استخراج شده‌اند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجه عصاره، که حدود ۹۰ درصد مهار رادیکال $ABTS^+$ را نشان می‌دهد، بیانگر وجود ترکیباتی با ظرفیت اهدا الکترون بالا و قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد است. این خاصیت با یافته‌های پژوهش‌هایی مانند (Rice-Evans et al., 1996) که نقش ساختار شیمیایی پلی‌فنول‌ها و مشتقات اسیدهای فنولیک را در مهار آسیب اکسیداتیو تأیید کرده‌اند، سازگار است. مکانیسم مهار آسیب اکسیداتیو به اجزای سلولی نظیر DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها، نقش کلیدی در پیشگیری از مراحل اولیه کارسینوژنز ایفا می‌کند (Cai et al., 2004; Pereira et al., 2009).

در زمینه اثرات ضدتوموری، آزمون MTT نشان داد که عصاره اتیل‌استاتی رقم یزد به طور دوزوابسته موجب کاهش چشمگیر زنده‌مانی سلول‌های سرطانی MCF-7

و MDA-MB-231 شد. این اثر مشابه نتایج گزارش شده در مطالعاتی مانند (Syed et al., 2007) است که فعالیت سیتوتوکسیک عصاره‌های انار را اثبات کرده‌اند. نکته مهم، انتخاب‌پذیری زیستی این عصاره است؛ به‌طوری‌که حفظ زنده‌مانی حدود ۸۰ درصد در سلول‌های سالم HUVEC نشان می‌دهد که این ترکیب می‌تواند به‌عنوان یک درمان هدفمند با حداقل آسیب به سلول‌های سالم مطرح شود، موضوعی که در تحقیقات دارویی نیز مورد توجه قرار گرفته است (Seeram et al., 2005). پاسخ مثبت و قابل توجه رده سلولی MDA-MB-231 به عصاره نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این رده که فاقد گیرنده‌های ER، PR و HER2 است و به درمان‌های مرسوم مقاومت نشان می‌دهد، معمولاً چالش‌بزرگی در درمان سرطان پستان به شمار می‌رود. پاسخ‌دهی این سلول به عصاره می‌تواند ناشی از اثر چندمسیره ترکیبات طبیعی باشد که مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط با رشد، بقا و التهاب، از جمله MAPK، PI3K/Akt و NF- κ B را مهار می‌کنند. این نتیجه با پژوهش‌های قبلی که نشان‌دهنده مهار این مسیرها توسط پلی‌فنول‌ها هستند، مطابقت دارد و اهمیت استفاده از ترکیبات طبیعی چندهدفه را در درمان سرطان‌های مقاوم برجسته می‌سازد (Huang et al., 2009). تحلیل بیان ژن‌های آپوپتوتیک نشان داد که تیمار سلول‌ها با عصاره اتیل‌استاتی رقم یزد موجب افزایش چشمگیر بیان ژن‌های BAX و TP53 شد. افزایش بیش از ۱۰ برابری این ژن‌ها در رده‌های سرطانی، القای مسیر ذاتی آپوپتوز را تأیید می‌کند، که از طریق افزایش نفوذپذیری غشای میتوکندری و آزادسازی سیتوکروم C منجر به فعال‌سازی Caspase-9 و نهایتاً مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌شود (Elmore, 2007). این مکانیسم در بسیاری از مطالعات مشابه به‌عنوان یکی از راه‌های کلیدی کنترل رشد و پیشرفت تومور شناخته شده است.

از دیدگاه فیتوشیمی، ترکیباتی مانند الایک‌اسید، کاتچین، کورستین، اورولیتین‌ها، روزوراترول و مشتقات اسید کافیک در پوست انار شناسایی شده‌اند که خواص

ویژگی های فیتوشیمیایی خاص رقم یزد، به ویژه محتوای بالاتر ترکیبات فنولی و متابولیت های ثانویه تحت تأثیر اقلیم خشک و نیمه خشک منطقه رویش آن باشد.

فعالیت آنتی اکسیدانی چشمگیر عصاره حدود ۹۰ درصد مهار رادیکال $ABTS^+$ حاکی از حضور ترکیبات با ظرفیت بالای اهدا الکترون و مهار رادیکال های آزاد است. ساختار شیمیایی پلی فنول ها، فلاونوئیدها، تانن ها و مشتقات اسیدهای فنولیک، که عمدتاً دارای گروه های هیدروکسیل قابل برهم کنش با ROS هستند، سبب مهار آسیب اکسیداتیو به اجزای سلولی نظیر DNA، پروتئین ها و لیپیدها می شود (Shahidi & Ambigaipalan, 2015). این مکانیسم در مهار مراحل اولیه کارسینوژنز نقش کلیدی ایفا می کند.

در بعد اثرات ضدتوموری، آزمون MTT نشان داد که عصاره اتیل استاتی رقم یزد به طور دوزوابسته موجب کاهش چشمگیر زندهمانی در هر دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 شد. کاهش زندهمانی سلولی تا حدود ۵۰ درصد در غلظت $400 \mu g$ و در عین حال، حفظ زندهمانی حدود ۸۰ درصد در سلول های نرمال HUVEC، حاکی از اثر انتخاب پذیری زیستی این عصاره است؛ که این ویژگی از چالش های مهم در توسعه درمان های هدفمند سرطان محسوب می شود.

نکته قابل توجه، پاسخ مثبت سلول های MDA-MB-231 به این عصاره بود. این رده سلولی به دلیل فقدان گیرنده های ER، PR و HER2، معمولاً مقاوم به درمان های رایج است و پاسخ دهی آن به عصاره گیاهی می تواند معرف فعالیت چندمسیره ی ترکیبات طبیعی موجود در عصاره باشد. همچنین گزارش شده است که عصاره پوست انار مسیرهای PI3K/AKT و MAPK/ERK را مهار می کند و به ویژه در انواع تهاجمی سرطان پستان، اثری ضدتکثیر، ضدگرزایی و ضدتوموری از خود نشان می دهد (Esmali et al., 2025). پلی فنول ها و مشتقات آن ها توانایی مهار مسیرهای سیگنال دهی مرتبط با رشد، بقا و التهاب را دارند؛ از جمله مسیرهای PI3K/Akt، MAPK و NF- κ B که در سرطان پستان، به ویژه نوع تهاجمی، بیش فعال هستند.

تحلیل بیان ژن های آپوپتوتیک نیز نشان داد که تیمار سلول ها با عصاره اتیل استاتی رقم یزد موجب

آنتی اکسیدانی، ضدتکثیر، ضدآنژیوژنز و تحریک آپوپتوز را دارند (Viuda-Martos et al., 2010). در عصاره اتیل استاتی رقم یزد، ترکیبات غالب شامل کاتچین و الازیک اسید هستند که احتمال تجمع آن ها علت اصلی اثربخشی بالای زیستی عصاره را توضیح می دهد. ساختار قطبی این ترکیبات، تمایل آن ها به حضور در فاز اتیل استاتی را توجیه می کند و نشان دهنده اهمیت انتخاب روش استخراج در حفظ و افزایش فعالیت بیولوژیکی است.

از منظر زیست فناوری و داروسازی، استفاده از ضایعات کشاورزی مانند پوست انار برای استخراج ترکیبات زیست فعال، یک رویکرد مقرون به صرفه، پایدار و سازگار با محیط زیست است که با اهداف توسعه پایدار و اقتصاد سبز هم سو می باشد. بهره گیری از روش های نوین مانند نانوفورمولاسیون ها، لیپوزوم های هدفمند و بیوراکتورهای زیستی، می تواند جذب زیستی، پایداری و اثربخشی ترکیبات گیاهی را به طور قابل توجهی بهبود بخشد و گامی مهم در جهت تجاری سازی این محصولات بردارد. افزون بر این، استفاده از منابع بومی مانند رقم یزدی به عنوان یک گام موثر در جهت استقلال دارویی، تقویت طب سنتی و توسعه دارو سازی دانش بنیان داخلی مطرح است که می تواند هم به اقتصاد محلی و هم به دانش علمی کشور کمک کند.

در نهایت، داده های این پژوهش حمایت روشنی از پتانسیل عصاره اتیل استاتی انار رقم یزد به عنوان یک ترکیب چندمنظوره در درمان سرطان پستان ارائه می دهد. با این حال، برای تبدیل این ترکیب به محصول دارویی قابل استفاده در بالین، مراحل پیش بالینی شامل شناسایی دقیق متابولیت ها (LC-MS/MS, HPLC, NMR)، بررسی سمیت سیستمیک، فارماکوکینتیک، آزمون در مدل های حیوانی و توسعه فرمولاسیون دارویی، الزامی است.

مطالعه حاضر نشان داد که عصاره اتیل استاتی استخراج شده از میوه کامل انار پوست سیاه رقم یزد، فعالیت زیستی قابل توجهی شامل خاصیت آنتی اکسیدانی قوی و اثر سیتوتوکسیک انتخاب پذیر بر سلول های سرطانی پستان از خود نشان می دهد. برتری این عصاره در مقایسه با سایر ارقام (ساوه و اصفهان) می تواند ناشی از

چندمنظوره در درمان سرطان پستان ارائه می‌دهد. با این حال، برای تبدیل این ترکیب به محصول دارویی قابل استفاده در بالین، مراحل پیش‌بالینی شامل شناسایی دقیق متابولیت‌ها (LC-MS/MS, HPLC, NMR)، بررسی سمیت سیستمیک، فارماکوکینتیک، آزمون در مدل‌های حیوانی و توسعه فرمولاسیون دارویی، الزامی است.

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره اتیل‌استاتی انار پوست سیاه، به‌ویژه رقم یزد، با برخورداری از ترکیبات زیست‌فعال، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قوی و اثرات ضدتوموری انتخاب‌پذیر بر سلول‌های سرطان پستان است، بدون آسیب قابل توجه به سلول‌های نرمال. افزایش بیان ژن‌های آپوپتوزی BAX و TP53 نیز حاکی از فعال‌سازی مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است. در همین راستا، مطالعه (Riaz *et al.*, 2025) نشان می‌دهد که عصاره پوست انار قادر است آنزیم ۶-فسفوگلوکونات دهیدروژناز (6PGD) را مهار کند، که این مکانیسم متابولیکی نوظهور می‌تواند به مهار رشد و پیشرفت تومورهای پستان کمک نماید. با توجه به منشأ گیاهی، ایمنی نسبی، و امکان استخراج از ضایعات کشاورزی، این عصاره پتانسیل بالایی برای توسعه داروهای طبیعی ضد سرطان دارد. با این حال، انجام مطالعات پیش‌بالینی و شناسایی دقیق ترکیبات مؤثر، لازمه تبدیل این عصاره به یک عامل درمانی بالینی است.

تشکر و قدردانی

بخشی از این تحقیق با حمایت مالی طرح مصوب ستاد توسعه زیست‌فناوری معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری و دانشگاه گیلان به شماره ۱۱/۵۰۲۲۲ اجرا شده که بدین وسیله سپاسگزاری می‌شود.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

افزایش بیان ژن‌های BAX و TP53 شد. ژن BAX از خانواده BCL-2، در افزایش نفوذپذیری غشای میتوکندری و تسهیل آزادسازی سیتوکروم C نقش دارد که منجر به فعال‌سازی Caspase-9 و در نهایت آپوپتوز سلولی می‌شود. TP53 نیز به‌عنوان یک فاکتور رونویسی، در پاسخ به آسیب DNA یا استرس اکسیداتیو، بیان BAX و مهار BCL-2 را تحریک می‌کند. افزایش بیش از ۱۰ برابری این ژن‌ها در رده‌های سرطانی نشان‌دهنده القای مسیر ذاتی آپوپتوز و یک مکانیسم کلیدی در کنترل رشد تومور است (Oltval *et al.*, 1993).

از دیدگاه فیتوشیمی، ترکیباتی مانند الایک‌اسید، کاتچین، کورستین، اورولیتین‌ها، رزوراترول و مشتقات اسید کافئیک در پوست انار گزارش شده‌اند که خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدتکثیر، ضدآنژیوژن و تحریک آپوپتوز دارند. احتمالاً تجمع این ترکیبات در عصاره اتیل‌استاتی رقم یزد علت اصلی اثربخشی زیستی بالای آن است. ساختار قطبی این ترکیبات، تمایل آن‌ها به حضور در فاز اتیل‌استاتی را توجیه می‌کند.

از منظر زیست‌فناوری و داروسازی، استفاده از ضایعات کشاورزی (پوست انار) برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال، رویکردی مقرون‌به‌صرفه، پایدار و سازگار با محیط زیست محسوب می‌شود. در مسیر توسعه صنعتی، بهره‌گیری از روش‌های مدرن مانند نانوفورمولاسیون‌ها، لیپوزوم‌های هدفمند یا بیوراکتورهای زیستی می‌تواند پایداری، جذب زیستی و اثربخشی ترکیبات گیاهی را بهبود بخشد. افزون بر آن، استفاده از منابع بومی مانند رقم یزد، گامی در جهت استقلال دارویی، تقویت طب سنتی و داروسازی دانش‌بنیان داخلی است.

در نهایت، داده‌های این پژوهش حمایت روشنی از پتانسیل عصاره اتیل‌استاتی انار رقم یزد به‌عنوان یک ترکیب

منابع

Alizadeh, M., Ghajazadeh, M., Piri, R., Mirza-Aghazadeh-Attari, M., Mohammadi, S., & Naghavi-Behzad, M. (2021). Age at diagnosis of breast cancer in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Iranian Journal of Public*

Health, 50(8), 1564-1576. DOI: <https://doi.org/10.18502/ijph.v50i8.6802>. Ardekani, M. R. S., Hajimahmoodi, M., Oveisi, M. R., Sadeghi, N., Jannat, B., Ranjbar, A. M., Gholam, N., & Moridi, T. (2011).

- Comparative antioxidant activity and total flavonoid content of Persian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 10(3), 519-524.
- Aryannejad, A., Saeedi Moghaddam, S., Mashinchi, B., Tabary, M., Rezaei, N., Shahin, S., Rezaei, N., Naghavi, M., & Larijani, B. (2023). National and subnational burden of female and male breast cancer and risk factors in Iran from 1990 to 2019: Results from the Global Burden of Disease study 2019. *Breast Cancer Research*, 25(1), 47. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13058-023-01633-4>.
- Baeghbal, V., Niakousari, M., & Farahnaky, A. (2016). Refractance Window drying of pomegranate juice: Quality retention and energy efficiency. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 34-40. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.017>.
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 74(3), 229-263. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21834>.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74(17), 2157-2184. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.047>.
- Cao, M., Li, H., Sun, D., He, S., Yan, X., Yang, F., Zhang, S., Xia, C., Lei, L., & Peng, J. (2022). Current cancer burden in China: epidemiology, etiology, and prevention. *Cancer Biology & Medicine*, 19(8), 1121-1138. DOI: <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2022.0231>.
- Cao, W., Chen, H.-D., Yu, Y.-W., Li, N., & Chen, W.-Q. (2021). Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020. *Chinese Medical Journal*, 134(7), 783-791. DOI: <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000001474>.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516. DOI: <https://doi.org/10.1080/0192623070132033>.
- Esmaeli, M., Dehabadi, M. D., & Ghanbari, A. (2025). Anticancer effects of pomegranate extract on breast cancer cell lines: A systematic review of the literature. *Discover Medicine*, 2(1), 1-10. DOI: <https://doi.org/10.1007/s44337-025-00193-0>.
- Haghpahan, S., Hosseini-Bensenjan, M., Ramzi, M., Khosravizadegan, Z., & Rezaianzadeh, A. (2023). Investigating the trends of incidence rates of breast cancer in Southern Iran: a population based survey. *BMC Women's Health*, 23(1), 589. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12905-023-02757-7>.
- Huang, W.-Y., Cai, Y.-Z., & Zhang, Y. (2009). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, 62(1), 1-20. DOI: <https://doi.org/10.1080/01635580903191585>.
- Hussain, S., Saxena, S., Shrivastava, S., Mohanty, A. K., Kumar, S., Singh, R. J., Kumar, A., Wani, S. A., Gandham, R. K., & Kumar, N. (2018). Gene expression profiling of spontaneously occurring canine mammary tumours: Insight into gene networks and pathways linked to cancer pathogenesis. *PLOS ONE*, 13(12), e0208656. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208656>.
- Kumar, P., & Mutreja, R. (2015). *Comparison of Antioxidant Properties of Pomegranate Peel Extract by Different Methods*. DOI: <http://dx.doi.org/10.17758/ERPUB.ER915009>.
- Lansky, E.P., & Newman, R.A. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of ethnopharmacology*, 109(2), 177-206. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.006>.
- Malcolm, J. R., Bridge, K. S., Holding, A. N., & Brackenbury, W. J. (2025). Identification of robust RT-qPCR reference genes for studying changes in gene expression in response to hypoxia in breast cancer cell lines. *BMC Genomics*, 26(1), 59. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-025-11216-6>.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770-803. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.
- Oltval, Z. N., Milliman, C. L., & Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *cell*, 74(4), 609-619.
- Panichayupakaranant, P., Itsuriya, A., & Sirikatitham, A. (2010). Preparation method and stability of ellagic acid-rich pomegranate

- fruit peel extract. *Pharmaceutical biology*, 48(2), 201-205. DOI: <https://doi.org/10.3109/13880200903078503>
- Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A., & Andrade, P. B. (2009). Phenolics: From chemistry to biology. *Molecular Diversity Preservation International*, 14(6), 2202-2211. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules14062202>
- Rangbulla, S., Sangwan, A., Gill, P. S., Bajaj, K., & Kumar, A. (2025). Assessment of Phytochemicals and Antioxidants of Nine Pomegranate Varieties Under Subtropics. *Applied Fruit Science*, 67(2), 87. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10341-025-01318-6>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26(9-10), 1231-1237. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, 49(11), 1603-1616. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>
- Riaz, S., Rasul, A., Ahmad, M., Asrar, M & , Hassan, M. (2025). Pomegranate Peel Extract as 6-Phosphogluconate Dehydrogenase (6PGD) Inhibitor for Treatment of Breast Cancer. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 83(1), 537-553. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12013-024-01485-5>
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure–Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956. DOI: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Henning, S. M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M. G., & Heber, D. (2005). In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(6), 360-367. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.01.006>
- Seeram, N. P., Henning, S. M., Zhang, Y., Suchard, M., Li, Z., & Heber, D. (2006). Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *The Journal of Nutrition*, 136(10), 2481-2485. DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/136.10.2481>
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820-897. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
- Stoddart, M. J. (2011). Cell Viability Assays: Introduction. *Methods in Molecular Biology*, 740. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_1
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Sweidan, N., Abu Rayyan, W., Mahmoud, I., & Ali, L. (2023). Phytochemical analysis, antioxidant, and antimicrobial activities of Jordanian Pomegranate peels. *PLOS ONE*, 18(11), e0295129. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0295129>
- Syed, D. N., Afaq, F., & Mukhtar, H. (2007). Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. *Seminars in Cancer Biology*, 17(5), 377-385. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2007.05.004>
- Tehraniifar, A., Zarei, M., Nemati, Z., Esfandiyari, B., & Vazifeshenas, M. R. (2010). Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 126(2), 180-185. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.07.001>
- Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. (2010). Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 635-654. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00131.x>
- Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30, 1-14. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>
- Zheng, Q., Zhang, Q., Yu, X., He, Y., & Guo, W. (2021). FENDRR: A pivotal, cancer-related, long non-coding RNA. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 137, 111390. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111390>

