

석류 열수 추출물의 수면박탈을 유도한 Rat 모델에서의 항스트레스 효과

나주련^{1,2*} · 김선오^{1*} · 조아라³ · 배동혁³ · 오교녀³ · 김용재² · 이유현⁴ · 전우진²

¹(주)비엔텍, ²전남대학교 식품영양학과
³천연자원연구센터, ⁴수원대학교 식품영양학과

Anti-Stress Effect of *Punica granatum* L. Extract against Sleep Deprivation-Induced Impairment

Ju-Ryun Na^{1,2*}, Sunoh Kim^{1*}, Ara Jo³, Donghyuck Bae³, Kyo-Nyeo Oh³,
Yong Jae Kim², Yoo-Hyun Lee⁴, and Woojin Jun²

¹Bioresources and Technology, ²Division of Food and Nutrition, Chonnam National University
³Jeonnam Institute of Natural Resources Research
⁴Department of Food Science and Nutrition, The University of Suwon

ABSTRACT The anti-stress effects of *Punica granatum* L. (family Lythraceae, PG) on H₂O₂/corticosterone (CORT)-induced stress in cells and sleep-deprived rats were investigated. The PG extract showed neuroprotective effects in SH-SY5Y cells against H₂O₂/CORT-induced stress. Sleep deprivation led to behavioral, hormonal, and biochemical alterations in the animal model. The effects of *P. granatum* on physiological, behavioral, and biochemical parameters aggravated by sleep deprivation were investigated. Sleep deprivation impaired physiological (survival, body weight, and drowsiness scores) and behavioral (rotarod, passive avoidance, hot hyperalgesia, and Y maze) parameters as well as biochemical factors (cortisol, serotonin, dopamine, testosterone, and growth factor I contents in serum). These parameters were significantly recovered by PG extract in a concentration-dependent manner. The PG extract also enhanced catalase, superoxide dismutase, and non-enzymatic antioxidative activities such as glutathione compared to sleep-deprived rats. On the basis of these results, our findings suggest that *Punica granatum* prevents impairment of body functions induced by sleep deprivation and related oxidative damage.

Key words: *Punica granatum*, stress, sleep deprivation, oxidative stress, neuroprotection

서 론

수면은 인체의 생리작용이며, 항상성 유지에 중요한 요소로 조직, 호르몬, 유전자, 세포 내 신호전달 및 움직임, 각성, 인지기능을 조절하는 중추신경계, 자율신경계를 조절한다. 수면부족 또는 수면박탈(sleep deprivation) 등의 수면장애는 스트레스 요인으로 작용하여 신체증상뿐만 아니라 뇌 기능에도 영향을 미친다(1).

Reimund(2)의 연구에 따르면 수면은 깨어있는 동안 축적된 활성산소를 제거하는 것으로 알려져 있다. 깨어있는 동안 신경계에서 전자전달과 같이 많은 산소를 소모하는 과정을 통한 대사작용이 뇌에서 이루어지며, 이는 활성산소의 증가시키며, 수면은 항산화 작용을 증가시켜 활성산소로부터 뇌를 보호한다.

수면박탈은 신경생물학적, 생리학적, 대사적, 인지 결핍을 비롯한 다양한 분야의 세포 기능을 저하시킨다. 최근 연구 결과에 따르면 수면박탈은 뇌의 산화적 스트레스를 증가시키는 요인으로도 밝혀졌다(3,4). Superoxide anion radical(O₂^{·-}), hydroxyl radical(·OH), hydrogen peroxide(H₂O₂)와 같은 활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 생체 내 대사과정의 부산물로 항산화 작용에 의하여 분해되어 비활성화 되지만, 지속적인 수면박탈은 항산화 활성보다 활성산소가 과잉으로 생산되어 뇌의 다양한 부위에 직간접적으로 영향을 미쳐 세포 손상뿐만 아니라 지질, 단백질, DNA의 손상을 가져온다(4,5).

석류(영문명 pomegranate)의 학명은 *Punica granatum* L.(PG)로 부처꽃과(Lythraceae)에 속하는 낙엽활엽교목으로 인도, 페르시아가 원산지이며, 우리나라의 중부와 남부에서도 재배한다. 석류의 나무껍질과 뿌리, 열매껍질은 말려서 구충제, 이질 등의 약으로 사용하며, 수렴, 지사, 항통증, 항염증 및 항균제로서 예로부터 사용해왔다(6). 석류의 주요성분으로는 polyphenols, flavonoids, anthocyanins, fatty acids, organic acids, alkaloids, vitamins, steroidal es-

Received 29 January 2016; Accepted 29 September 2016
Corresponding author: Woojin Jun, Division of Food and Nutrition, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea
E-mail: wjjun@jnu.ac.kr, Phone: +82-62-530-1337

*These authors contributed equally to this work.

trogens 등이 알려져 있으며(6,7), 이러한 성분들을 통해 항산화(8), 항암(9), 항당뇨(10), 골관절염(11), 간 보호(12), 출혈 억제(13), 에스트로겐(14) 및 뇌신경 보호(15)와 같은 석류의 생리활성이 확인되었다. 특히 석류는 알츠하이머와 같은 뇌 질환에 대한 예방 및 개선 효과를 갖는 것으로 알려졌다. 이는 석류에 함유된 항산화 성분이 작용하는 것으로 확인되었다(15).

이에 수면박탈 스트레스로 인한 인체 내 활성산소의 증가 및 이로 인한 생리적, 인지적 저하에 대해 항산화 효과가 뛰어난 석류가 미치는 영향을 확인하기 위하여 H₂O₂/corticosterone으로 스트레스를 유발하고, 특히 산화적 손상에 민감한 인간 뉴런기원의 신경모세포인 SH-SY5Y 세포 모델에 대한 석류 추출물의 보호 효과를 *in vitro* 상에서 확인하고, 수면박탈 동물모델을 이용하여 *in vivo* 상에서 그 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

시료의 추출 및 제조

석류(Shinan, Korea)의 열매 부분을 본 실험에 사용하였다. 과피를 제거한 석류열매를 열수로 100°C에서 4시간 동안 추출하였다. 필터 후 감압 농축하고 동결 건조하여 석류 추출물(PG)을 수득(17.6%)하였다. 석류 추출물은 saline (0.9% NaCl) 또는 D.W.에 녹여 사용하였다.

H₂O₂, corticosterone 및 caffeine은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 세포배양에 사용한 minimal essential medium(MEM) medium, fetal bovine serum(FBS), penicillin 및 streptomycin 등은 Gibco BRL Co.(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, 그 외 사용된 시약은 first grade 이상의 등급으로 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하여 사용하였다.

세포배양

신경세포 보호 효과를 확인하기 위하여 SH-SY5Y 세포(KCLB 22266, Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)를 실험에 사용하였다. 배지는 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 함유된 MEM medium에서 37°C에서 5% CO₂의 조건으로 배양하였다.

세포독성 측정 및 corticosterone/H₂O₂에 의한 세포 손상 유도에 대한 보호 효과 측정

세포의 생존율 및 세포막 손상은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 환원 방법과 LDH(lactate dehydrogenase)를 이용하여 측정하였다.

SH-SY5Y 세포를 48-well plate에 7×10⁴ cells/mL의 농도로 500 µL씩 분주하고 24시간 동안 배양한 후, 시료를 최종 농도가 0, 1, 3, 10, 30, 100 µg/mL가 되도록 세포에

처리하여 24시간 또는 48시간 동안 배양하였다. 이후 PBS에 2 mg/mL의 농도로 녹인 MTT 용액을 세포에 처리하고, 37°C에서 4시간 동안 더 배양하여 MTT를 환원시켜 formazan 생성을 확인하였다. 떨어지지 않도록 배지를 조심스럽게 제거한 후 DMSO를 100 µL씩 분주하여 10분 동안 혼합한 다음 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

SH-SY-5Y 세포막 손상 효과는 농도별 추출물을 24시간 동안 전처리한 후 H₂O₂ 100 µM을 처리하여 24시간 동안 배양한 다음 상층액 100 µL를 취하여 LDH assay kit(Bio Vision, Milpitas, CA, USA)으로 측정하였다.

H₂O₂ 및 corticosterone에 대한 석류 추출물의 세포보호 효과를 확인하기 위하여 SH-SY5Y 세포를 48-well plate에 분주하고 24시간 동안 배양한 후, 시료를 24시간 동안 전처리한 다음 H₂O₂(100 µM) 또는 corticosterone(0.7 mM)을 첨가하고 24시간 반응시킨 후 MTT와 LDH로 세포의 생존율을 측정하였다.

실험동물 및 시료처리

Sprague-Dawley rats(male, 210~250 g)을 썬타코(Osan, Korea)에서 구입하여 6일 동안 순화 후 이상이 없는 개체를 선별하여 실험을 진행하였다. 모든 실험동물은 온도(22±2°C), 상대습도(50±5%), 환기횟수(10~15회/시간), 조명주기(lights on from 8:00 am~8:00 pm), 조도(150~300 Lux)의 환경으로 설정된 동물사육실에서 사료는 임의(*ad libitum*)로 제공하였다. 모든 동물실험은 천연자원연구센터의 동물실험윤리위원회의 승인 후 진행하였다(2014-021). Rats은 총 10개의 군(n=6)으로 분리하였다: 대조군(non-SD+ saline administered group, CTL), 수면박탈군(sleep deprived+ saline administered group, SD), PG 50 mg/kg 투여군(sleep deprived+ PG 50 mg/kg B.W. administered group, PG50/SD), PG 100 mg/kg 투여군(sleep deprived+ PG 100 mg/kg B.W. administered group, PG100/SD), PG 200 mg/kg 투여군(sleep deprived+ PG 200 mg/kg B.W. administered group, PG200/SD), 양성대조군 caffeine 투여군(sleep deprived+ caffeine 10 mg/kg administered group, PCTL), 비수면박탈 PG 50, 100, 200 mg/kg 투여군 및 양성대조군 투여군. 모든 실험동물은 개별적으로 분리되어 물로 둘러싸인 크거나 작은 원형의 platform(16) 위에서 실험기간 동안 사육되었다.

수면박탈

Single platform 방법(16)을 이용하여 수면박탈 동물실험을 진행하였다. 실험동물이 두발을 겨우 딛고 설 수 있는 작은 원형기둥 모양의 platform(직경 6 cm, 높이 10 cm)이 부착된 아크릴케이지(21×25×27 cm)에 platform 높이의 1 cm 아래까지 물을 채워 실험동물이 줄거나 수면에 빠져 균형을 잃으면 물에 빠져 수면이 불가능하게 만들었다. 물은 매일 교체하여 음수로 사용할 수 있도록 제공하였다. 대조군

을 비롯한 비수면박탈 실험군은 직경 15 cm의 넓은 platform을 제공하여 충분한 수면이 이뤄질 수 있도록 하였다.

수면박탈 유도 및 PG 투여에 따른 생리학적 변화를 관찰하기 위하여 몸무게, 생존율은 매일 확인하였으며, 수면박탈 후 3일째에 꾸벅임 정도(5 min, 14:00~15:00 pm)를 비디오로 촬영하여 분석하였으며, 행동학적 인자를 측정하기 위한 시험(rotarod, passive avoidance, hot hyperalgesia)은 스트레스 강도에 따른 변화를 확인하기 위하여 수면박탈 3일째, 10일째로 구분하여 측정하였다. 수면박탈 과정 동안 측정된 생리학적, 행동학적 인자들은 다른 결과에 미치는 영향을 최소화하고자 별도로 분리하여 진행하였다.

실험 종료 후 혈액과 뇌 조직을 채취하여 생화학 인자의 변화를 측정하였다. 뇌는 해마(hippocampus)와 피질(cortex)을 바로 분리하였으며, 모든 시료는 -80°C에서 보관하였다.

Rotarod test

균형감각과 운동협응력을 측정하기 위해(17) rotarod test(four-lane accelerating rotarod, Jeung Do Bio & Plant, Seoul, Korea)를 실시하였다. 실험 전날 1분간 2회씩 회전하는 원통(diameter 8 cm, rotation speed 11 rpm)위를 강제로 걷게 하여 적응훈련을 시킨다. 24시간 후 동일한 조건의 회전하는 원통 위에서 균형을 잃고 떨어지는 시간을 측정하였다. 실험동물마다 최대 측정 시간은 5분으로 하였다.

Passive avoidance test

공포자극에 대한 기억능력을 확인하기 위하여 Bae 등(18)의 실험방법을 수정하여 실험을 진행하였다. 밝은 불빛이 드는 light chamber와 dark chamber가 작은 통로로 연결되어 있는 shuttle box(Iwoo Scientific Co., Seoul, Korea)를 실험으로 사용하였다. Light chamber에 실험동물을 놓아두면 실험동물을 본능적으로 dark chamber로 들어가게 되며, 그때 전기충격(75 mV, 0.5 mA, 50 Hz)을 가하여 혐오자극을 주어 공포에 대한 학습을 시킨다. 24시간 후 light chamber에 실험동물을 두었을 때 dark chamber에 들어갈 때까지의 시간을 측정하여 이를 수치화하였다. 실험동물마다 최대 측정 시간은 5분으로 하였다.

Hot hyperalgesia test

통각에 대한 민감성을 측정하기 위하여 Fanselow와 Bolles(19)의 실험방법을 수정하여 진행하였다. 투명아크릴 원통을 씌워 동물의 행동반경을 제한한 열판(hot plate, Ugo Basile S.R.L., Gemonio, Italy)을 실험에 사용하였다. 49±1°C로 유지된 열판 위에 실험동물을 올려놓은 후 행동을 관찰하여 앞발 또는 뒷발을 핥는 행동, 위로 뛰어오르는 행동을 보이는 데 걸리는 시간을 측정하였다. 실험동물의 발바닥에 화상이 생기지 않도록 최대 실험 시간은 90초로 설정

하였으며, 실험은 08:00~10:00 am 사이에 진행하였다.

Y maze test

Sarter 등(20)의 방법을 참고로 Y maze(three equal compartments of 10 cm×90 cm×30 cm)를 이용하여 실험동물의 공간지각능력 및 단기기억에 관해 확인하였다. 검은 아크릴판으로 제작한 Y-자 모양의 사방이 막힌 미로로 되어 있으며, 각 미로는 120°의 일정한 각도로 배치되어 있다. 각각의 미로를 A, B, C로 설정한 후, 실험동물을 미로의 가장자리에 넣고 8분간 자유롭게 움직이도록 하여 미로에 적응하도록 하였다. 그 후 8분간 실험동물의 움직임을 관찰하여 각 미로에 들어간 횟수 및 순서를 측정하여 변경행동력(spontaneous alternation, %) 계산하였다. 세 곳의 각 arm을 순차적으로 들어간 경우 1점으로 인정하였으며, 연속적으로 들어가지 않는 경우는 배제하였다. 이러한 원리로 다음과 같은 수식으로 계산하였다.

$$\text{Spontaneous alteration (\%)} = \frac{\text{Total number of alteration}}{\text{Total number of arm entry} - 2} \times 100$$

혈중 cortisol, serotonin, dopamine, testosterone, growth factor I 함량 측정

혈액은 3,000×g에서 원심분리 하여 얻어진 혈장을 실험에 사용하였다. Cortisol의 함량은 ELISA kit(Calbiotech, Spring Valley, CA, USA)을 이용하였으며, cortisol MAb가 코팅된 microplate를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Serotonin과 dopamine은 Abnova(Taipei, Taiwan)에서 제조한 ELISA kit을 이용하였다. Serotonin의 intra와 inter-assay 변이계수는 각각 12.6%, 10.4%이며, 최저측정가능치는 6.2 ng/mL였다. Dopamine의 intra-assay 변이계수는 21.5%이며, 최저측정가능치는 3.3 pg/mL였다.

Testosterone은 ELISA kit(Enzo, New York, NY, USA)을 이용하여 측정하였다. Intra와 inter-assay 변이계수는 각각 10.0%, 11.3%이며, 최저측정가능치는 5.67 pg/mL였다.

IGF-1(growth factor I)는 ELISA kit(R&D Systems, Abingdon, UK)을 사용하였으며, intra와 inter-assay 변이계수는 각각 5.6%, 9.1%이며, 최저측정가능치는 3.5 pg/mL였다.

모든 생화학 인자는 각 kit에 제공된 standard를 이용하여 표준곡선을 획득한 후 정량화하였다.

뇌의 항산화 활성(glutathione, catalase, superoxide dismutase) 측정

뇌 조직 내 GSH(glutathione)의 함량은 균질화된 뇌 조직을 4°C에서 한 시간 동안 4% sulfosalicylic 용액으로 처리한 후, 상층액을 취하여 DTNB와 반응시킨 다음 412 nm에

서 측정하였다.

CAT(catalase) 활성은 20 mM의 H₂O₂를 기질로 실험 직전 준비하여 사용하였다. H₂O₂의 분해되는 정도를 3분간 240 nm에서 측정하였다. 효소의 활성은 H₂O₂의 감소하는 정도를 mM/min/protein으로 계산하였으며, U/mg protein의 단위로 표현하였다.

SOD(superoxide dismutase) 측정은 ELISA kit(Bio Vision)을 이용하여 측정하였으며, 뇌 조직 현탁액을 WST-1 용액, SOD 효소용액과 혼합하여 20분간 37°C에서 반응시킨 후 450 nm에서 측정하였다.

통계분석

본문실험의 결과는 평균 표준오차(the mean±standard error of the mean(SEM))로 표기하였으며, 각 그룹 간의 유의성 검증은 GraphPad Prism 5(Graph Pad Software, San Diego, CA, USA)를 이용하여 one-way ANOVA를 실시한 후 $P < 0.05$ 의 유의수준에서 Dunnett's multiple comparison test로 각 실험군의 평균치 간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

석류 추출물의 corticosterone/H₂O₂에 대한 뇌신경세포 보호 효과

뇌 신경세포의 corticosterone(CORT)에 의한 세포독성에 대해 석류 추출물의 효과를 확인하기 위하여, SH-SY5Y 세포(neuroblastoma cell line)를 실험에 사용하였다. 다양한 농도(1, 3, 10, 30, 100 µg/mL)의 석류(PG) 열수 추출물 세포에 24시간 전처리한 후 0.7 mM의 CORT를 24시간 동안 처리한 다음, MTT를 이용하여 세포의 생존율을 확인하였다(Fig. 1A). CORT 처리에 의하여 세포 생존율은 70.92 ± 1.44%로, CTL에 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. PG 열수 추출물(1, 3, 10, 30, 100 µg/mL)의 전처리에 의하여 세포 생존율의 감소가 억제되었으며, 특히 10 µg/mL, 30 µg/mL의 농도로 전처리하였을 때 유의적으로 회복하는 것을 확인하였다. PG 추출물을 농도별로 단독으로 처리하였을 때 세포독성은 나타나지 않았다(data not shown).

SH-SY5Y 세포에 산화적 스트레스의 주요 요인 중 하나인 H₂O₂에 의한 세포독성에 대해 석류 추출물의 효과를 확인하기 위하여 위와 동일한 방법으로 실험을 진행하였다(Fig. 1B). H₂O₂(100 µM)에 의해 유의적으로 감소한 세포 생존율은 PG 추출물에 의해 농도 의존적으로 개선되는 것을 확인하였다(3 µg/mL, 90.85 ± 1.48%; 10 µg/mL, 94.70 ± 0.30%; 30 µg/mL, 97.00 ± 3.06%; 100 µg/mL, 101.8 ± 2.99%).

또한, 세포막 손상에 미치는 효과를 확인하기 위하여 세포 배지에 방출된 LDH의 함량을 측정된 결과(Fig. 1C), H₂O₂(100 µM)에 의해 CTL 대비 44.76 ± 12.27% ($P < 0.005$)

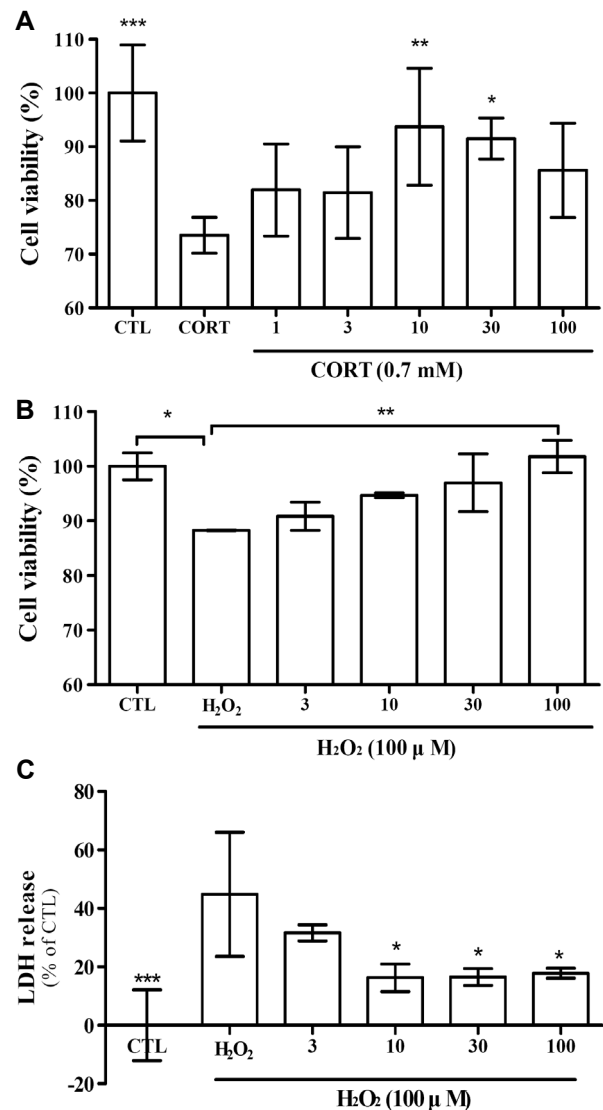


Fig. 1. Neuroprotective effects of *Punica granatum* L. (PG) extract on CORT or H₂O₂-induced apoptosis. Cells were pretreated with various concentrations (1, 3, 10, 30, and 100 µg/mL) of the PG water extract, followed by 0.7 mM CORT or 100 µM of H₂O₂ challenge for 24 h. (A) Effect of the PG extract on CORT (0.7 mM)-induced SH-SY5Y cell apoptosis. (B) Effect of the PG extract on H₂O₂ (100 µM)-induced SH-SY5Y cell apoptosis. (C) Effect of the PG extract on H₂O₂ (100 µM)-induced LDH release in SH-SY5Y cell. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.005$ vs CORT/H₂O₂. Statistical significance was tested with the ANOVA (Dunnett's multiple comparison test). CTL: control group, CORT: corticosterone treated. All data were representative of three independent experiments.

수준으로 증가한 것을 확인하였으며, PG에 의하여 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. 이를 통해 PG 추출물의 CORT, H₂O₂에 대한 뇌신경 보호 효과를 확인하였다.

수면박탈 스트레스에 의한 생리학적 저하에 대한 석류 추출물의 개선 효과

수면박탈 스트레스에 의한 생리학적 변화를 확인하기 위

하여 동물모델을 이용하여 생존율, 몸무게 및 꾸벅임 정도를 확인하였다.

석류 열수 추출물의 효과를 확인하기 위하여 수면박탈을 유도한 실험군에 50, 100, 200 mg/kg의 농도로 경구투여한 후 매일 생존율을 확인하였다(Fig. 2A). 대부분의 실험군이 6일째부터 사망하는 것을 관찰하였으며, 수면박탈 14일째의 생존율은 비수면박탈 대조군(CTL) 100%, 수면박탈군(SD) 0%, 석류 200 mg/kg 투여군(PG200/SD) 60%, 카페

인 10 mg/kg 투여군(PCTL/SD) 20%로, SD군보다 PG 투여군의 생존율이 더 뛰어남을 확인하였다.

CTL군의 몸무게(Fig. 2B) 실험기간 동안 꾸준히 증가하는 반면, 수면박탈 스트레스를 받은 실험동물은 무게 증가가 CTL군에 비해 유의적으로 차이가 나는 것($P<0.005$)을 확인하였다. 수면박탈군에서도 PG200/SD군은 실험 5일째부터 SD군에 비해 몸무게 증가가 유의적($P<0.05$)으로 차이가 나는 것을 확인할 수 있었다.

수면박탈은 에너지를 고갈시키며 지속될 경우 에너지 결핍상태에 도달하게 되며, 이로 인하여 수면박탈 동물모델에게 사료가 충분히 공급되어도 체중을 감소하는 결과로 이어진다(21). 본 실험에서는 수면박탈 케이지의 특성상 사료 일부가 물로 떨어지기 때문에 섭취량은 기록하지 않았지만 SD군과 비교했을 때 PG200/SD군의 체중이 유의적으로 증가한 경향을 보아, PG 추출물에 의한 에너지 고갈이 감소하는 가능성을 추정할 수 있다.

수면박탈 동물모델 군에서 꾸벅임을 측정된 결과(Fig. 2C), 석류 추출물을 투여한 군은 SD군에 비해 유의적으로 감소하는 경향을 관찰하였다(SD, 14.25 ± 4.50 ; PG50/SD, 5.33 ± 1.50 ; PG100/SD, 6.40 ± 1.29 ; PG200/SD 2.80 ± 1.07 , $P<0.05$; PCTL/SD, 8.83 ± 2.69).

이러한 결과를 바탕으로 PG 추출물은 수면박탈 스트레스에 의해 저해된 생리적 인자를 개선시켜 항스트레스 효과를 갖는 것을 확인할 수 있었다.

Kumar 등(22)이 발표한 연구에 따르면 pentobarbital을 이용한 수면유도 실험에서 석류 추출물에 의하여 수면잠복기(sleep latency) 증가 및 수면시간(sleeping time)의 감소를 유발하며, 이를 통해 중추신경계의 자극 및 각성에 영향을 준다고 보고한 바 있다. 이러한 연구 결과는 수면이 부족한 상태인 본 실험에 석류 추출물의 항스트레스 효과에 도움을 줄 것으로 추측할 수 있다.

수면박탈 스트레스에 의한 행동학적 저하에 대한 석류 추출물의 개선 효과

수면박탈이 지속됨에 따라 석류 열수 추출물의 투여가 행동학적 인자에 미치는 변화를 확인하기 위하여, 수면박탈 3일째와 10일째에 행동학적 실험들을 수행하였다.

첫 번째로 균형감각과 운동협응력을 확인하는 실험방법인 rotarod 실험을 수행하였으며, 그 결과는 Fig. 3에서 나타내었다. 수면박탈 스트레스에 의해 유의적으로 운동능력이 감소하는 것($P<0.005$)이 관찰되었으며, 실험 3일째(Fig. 3A)에 PG100/SD군과 PG200/SD군은 SD군에 비해 유의적으로 운동능력이 개선되는 것을 확인하였다(CTL, 246.8 ± 53.25 초; SD, 81.77 ± 4.57 초; PG100/SD, 202.2 ± 37.986 초; PG200/SD, 243.7 ± 56.33 초). PCTL/SD군은 SD군에 비해 운동능력이 개선되었지만 유의차는 확인되지 않았다. 10일째(Fig. 3B) 또한 3일째와 유사하게 PG100/SD군과 PG 200/SD군의 유의적으로 개선되며, PCTL/SD군은 운동

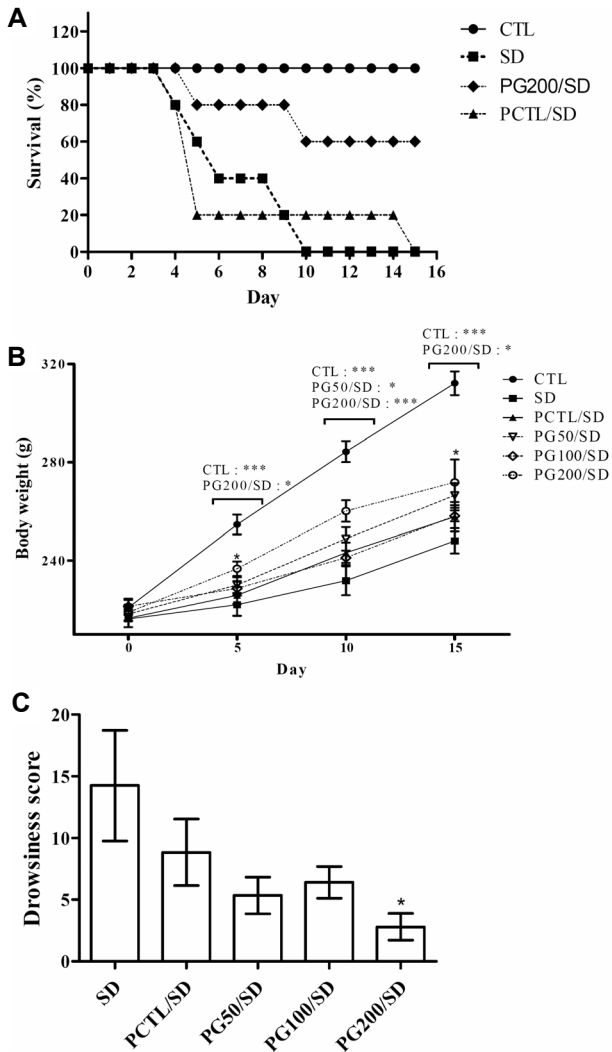


Fig. 2. Effects of PG extract on the impairment of physiological factors induced by sleep deprivation in rats. (A) The effects of the PG extract on survival in sleep deprived rats. (B) The effects of the PG extract on sleep deprivation reduction in body weight in rats. (C) Drowsiness score of sleep-deprived rats. Data are expressed as the mean±SEM (n=6). *** $P<0.005$ and * $P<0.05$ vs SD group. Statistical significance was tested with the Dunnett's multiple comparison test. CTL: control group, SD: sleep deprived group, PG50/SD: 50 mg/kg of *Punica granatum* extract treated sleep deprived group, PG100/SD: 100 mg/kg of *Punica granatum* extract treated sleep deprived group, PG200/SD: 200 mg/kg of *Punica granatum* extract treated sleep deprived group, PCTL/SD: 10 mg/kg of caffeine treated sleep deprived group. PG and caffeine were administrated orally.

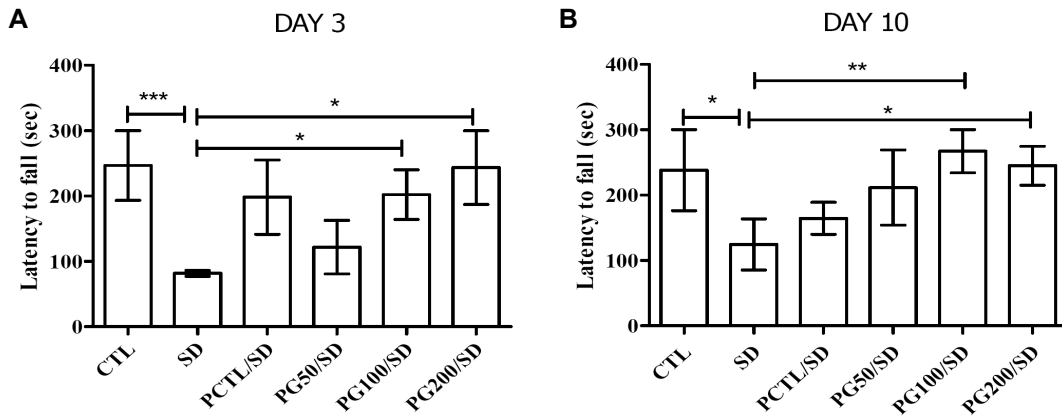


Fig. 3. Effects of a PG extract on a behavioral rotarod test against sleep deprivation in rats. (A) Effect of the PG extract on motor coordination and balance deficits induced by sleep deprivation in the rotarod test on day 3. (B) The rotarod test on day 10. *** $P < 0.005$, ** $P < 0.01$, and * $P < 0.05$ vs SD. Statistical significance was tested with the Dunnett's multiple comparison test.

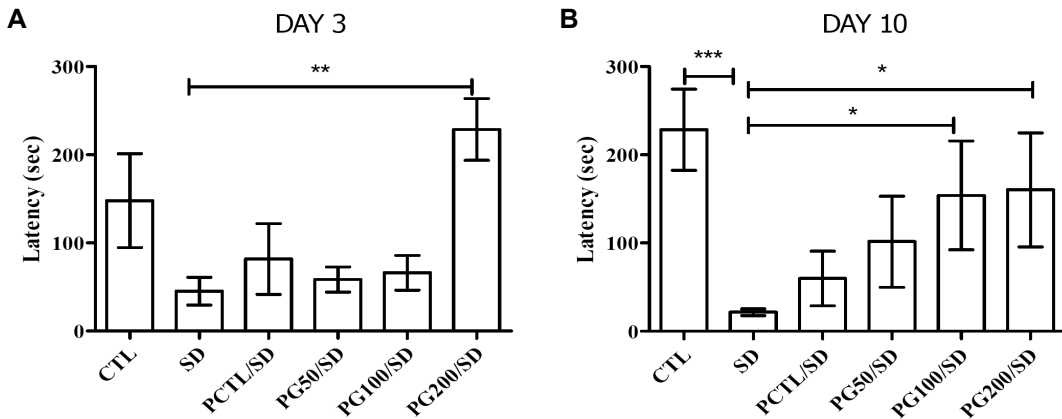


Fig. 4. Effects of a PG extract on behavioral passive avoidance tests against sleep deprivation in rats. (A) Effect of the PG extract on memory acquisition and retention induced by sleep deprivation in the passive avoidance test on day 3. (B) The passive avoidance test on day 10. *** $P < 0.005$, ** $P < 0.01$, and * $P < 0.05$ vs SD. Statistical significance was tested with the Dunnett's multiple comparison test.

능력이 SD군 수준으로 저하되는 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 4는 수동회피 실험(passive avoidance test) 결과로 공포자극을 주입한 dark chamber에 들어가는 시간을 측정하여 수치화하였다. 3일째에는 SD군은 45.19 ± 15.77 초로 확인되었으며, PG 200 mg/kg 투여(228.6 ± 35.00 초)에 의해 유의적으로 개선하는 효과를 확인할 수 있었다. 수면박탈 10일째에는 SD군은 매우 감소하며(21.65 ± 3.76 초), CTL군과 비교하였을 때 $P < 0.005$ 수준으로 유의적 차이가 나는 것을 확인하였다. 이러한 증상은 석류 추출물의 지속적인 투여에 의해 크게 회복되는 것을 관찰할 수 있었다(PG50/SD, 101.5 ± 51.55 초; PG100/SD, 153.9 ± 61.65 초; PG200/SD, 160.3 ± 64.58 초). 양성대조군인 caffeine 또한 개선 효과를 가지고 있었으나, SD군과 유의적인 차이는 확인되지 않았다(day 3, 81.61 ± 40.13 초; day 10, 59.97 ± 31.00 초).

수동회피 실험은 해마의존적인 학습 및 기억에 대한 척도를 판단하는 연구방법으로, dark chamber에 들어가는 시간의 감소는 노화, 수면박탈과 같은 요인으로 인한 인지능력의

저해와 연관되어 있다는 많은 연구가 밝혀지고 있다(23).

Hot hyperalgesia 실험은 앞발 또는 뒷발을 핏거나 뛰어 오르는 행동을 할 때의 시간을 측정하였으며, 실험동물을 대상으로 새로운 환경, 진동과 같은 비교적 가벼운 스트레스 자극에 의해서도 통각 과민이 증가하기 때문에(24), 수면박탈 스트레스에 의한 민감성 또한 영향을 받을 것으로 예상하였다.

실험 3일째(Fig. 5A)에 CTL군은 22.77 ± 2.26 초인 반면, SD군은 16.10 ± 1.43 초로 유의적($P < 0.05$)으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. PG100/SD(21.57 ± 1.08 초)와 PG200/SD군(23.78 ± 2.46 초)은 SD군보다 더 오랜 시간을 버티는 것으로 확인되었다. 10일째에는(Fig. 5B) 모든 군들의 시간이 짧아지는 경향을 확인할 수 있었다(CTL, 16.62 ± 3.17 초; SD, 10.86 ± 1.45 초; PCTL/SD, 11.60 ± 2.96 초; PG50/SD, 14.16 ± 3.34 초; PG100/SD, 13.34 ± 3.97 초; PG200/SD, 22.24 ± 6.08 초). 몸무게는 hot hyperalgesia 실험에 영향을 미치는 주요인으로, 무거울수록 hot hyperalgesia latency

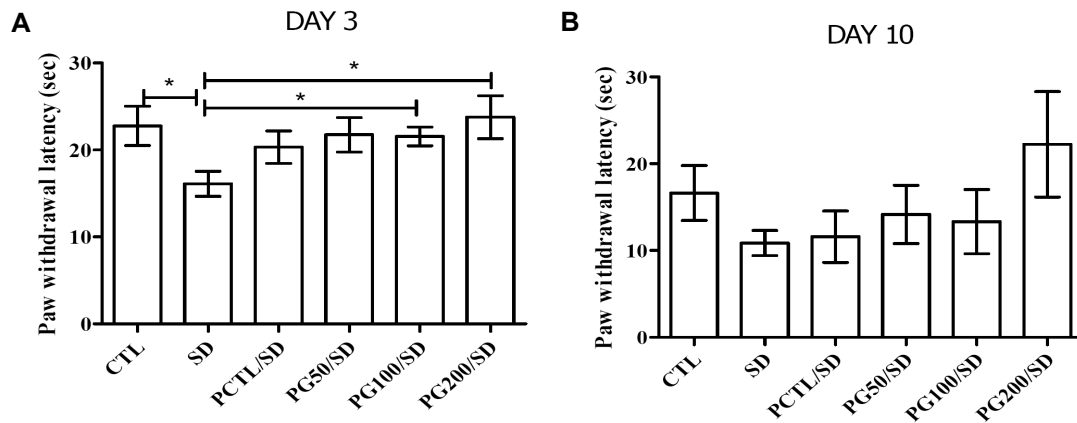


Fig. 5. Effects of a PG extract on behavioral hot hyperalgesia tests for nociception against sleep deprivation in rats. (A) Effect of the PG extract on sleep deprivation deficits in the hot hyperalgesia test on day 3. (B) The hot hyperalgesia test on day 10. **P*<0.05 vs SD. Statistical significance was tested with the Dunnett's multiple comparison test.

가 감소하는 경향을 보인다(25). 이러한 맥락으로 CTL군은 실험기간 동안 수면박탈 실험군에 비해 몸무게 증가가 뚜렷하게 나타났기 때문에 실험 10일째에는 유의차가 나타나지 않은 요인으로 작용했을 것으로 생각한다.

마지막으로 Y 미로 실험은 미로 내 움직임을 변경행동력으로 계산하여 확인한 결과(Fig. 6A), 군 간 유의차는 확인되지 않았으나 미로에 드나든 총 횟수는(Fig. 6B) 다른 군에 비해 석류 추출물 투여군(PG100/SD, PG200/SD)에서 활발한 움직임을 확인할 수 있었다.

혈중 cortisol, serotonin, dopamine, testosterone, IGF-1 함량

Kim 등(26)의 연구에서 수면 부족상태에 이르면 신경퇴행성 및 산화 스트레스 관련 인자의 증가뿐만 아니라 cortisol과 같은 glucocorticoid계 호르몬의 분비 또한 증가하는 것으로 알려져 있다.

Cortisol의 함량을 측정한 결과(Fig. 7A), 수면박탈스트레스에 의해 유의적으로 증가(SD; 24.47±2.77 ng/mL, *P*<

0.05)하며 PG 및 PCTL 투여에 의해 개선되는 확인할 수 있었다. PG 추출물의 혈액 내 cortisol 함량 변화는 농도의존적인 경향을 보였다.

Serotonin은 수면 조절 기능을 가진 신경전달물질 중 하나로 수면박탈 스트레스에 의한 serotonin 함량을 측정된 결과(Fig. 7B) cortisol과 유사한 경향을 보였으며, CTL군에 비해 SD군의 유의적인 증가(CTL, 77.52±6.78 ng/mL; SD, 371.93±149.39 ng/mL)와 PG 추출물에 의해 농도의존적이며, 유의적인 감소가 확인되었다.

혈액 내 dopamine의 함량을 측정한 결과(Fig. 7C) CTL군에 비해 SD군이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다(CTL, 2.50±0.68 ng/mL; SD, 6.33±1.37 ng/mL, *P*<0.05). 수면박탈 스트레스에 의해 증가한 dopamine의 함량은 PCTL과 PG 추출물에 의해 완화되었다(PCTL, 3.95±1.24 ng/mL; PG50, 3.41±0.49 ng/mL; PG100, 4.29±1.00 ng/mL; PG200, 2.89±0.64 ng/mL).

이러한 결과를 통해 스트레스와 연관된 cortisol뿐만 아니라 신경전달물질의 종류인 serotonin, dopamine의 혈액

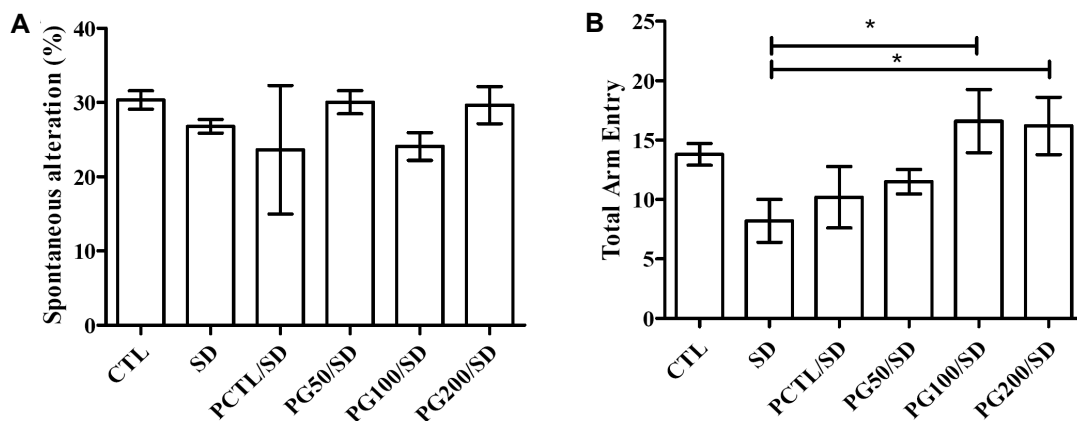


Fig. 6. Effects of a PG extract on Y-maze tests for spatial working memory activity against sleep deprivation in rats. (A) Effect of the PG extract on spontaneous alteration due to stress induced by sleep deprivation. (B) The number of total arm entries. **P*<0.05 vs SD. Statistical significance was tested with the Dunnett's multiple comparison test.

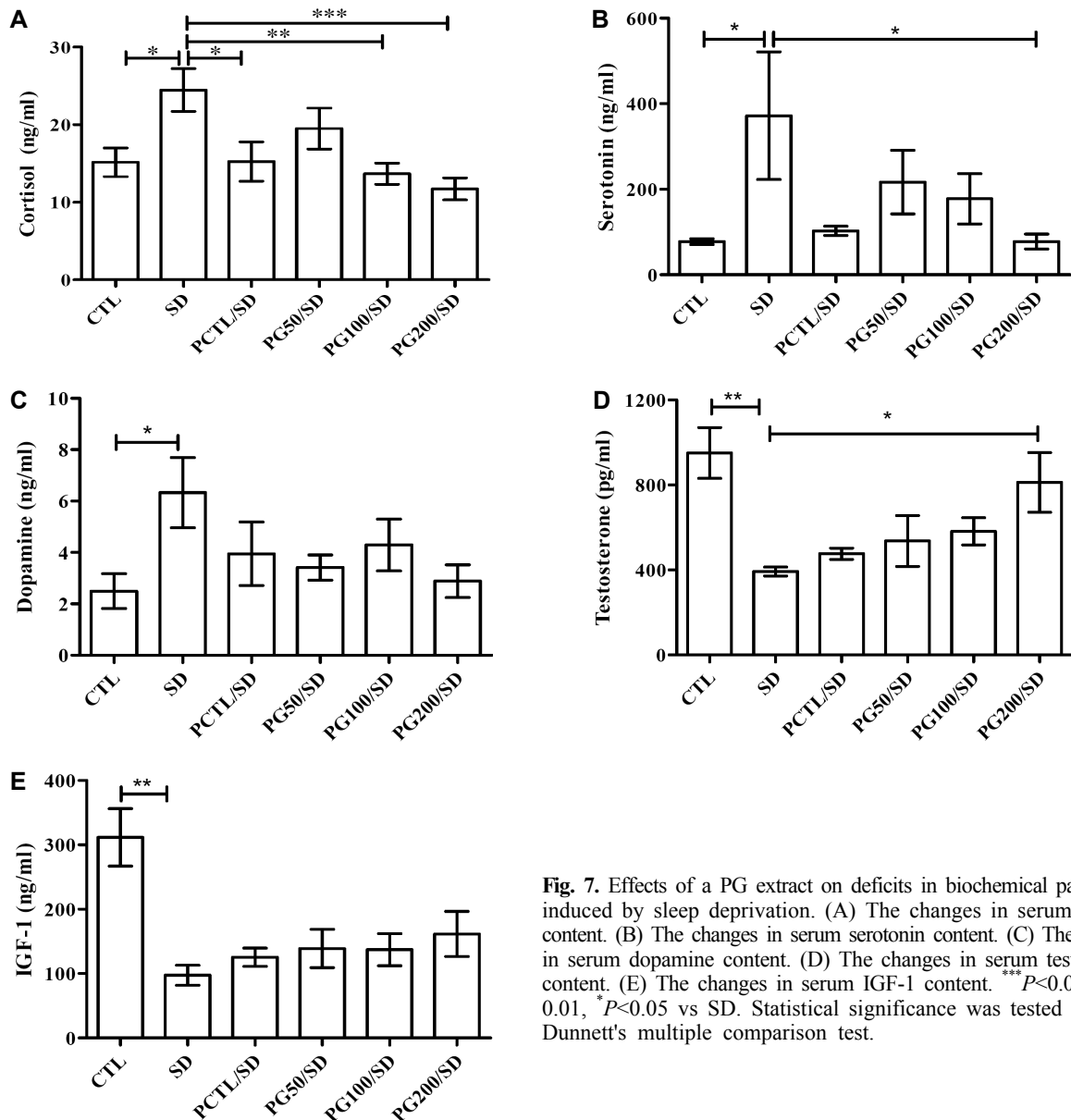


Fig. 7. Effects of a PG extract on deficits in biochemical parameters induced by sleep deprivation. (A) The changes in serum cortisol content. (B) The changes in serum serotonin content. (C) The changes in serum dopamine content. (D) The changes in serum testosterone content. (E) The changes in serum IGF-1 content. *** $P < 0.005$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs SD. Statistical significance was tested with the Dunnett's multiple comparison test.

내 함량 또한 수면 및 스트레스와 연관이 있음을 확인하였으며, 내분비계와 연관이 있는 호르몬에 미치는 변화를 확인하고자 testosterone과 IGF-1의 함량을 측정하였다.

Testosterone의 농도(Fig. 7D)는 수면박탈 스트레스에 의해 유의적으로 감소하였으며(CTL, 951.98 ± 119.08 pg/mL; SD, 392.54 ± 21.43 pg/mL, $P < 0.005$), PCTL 및 PG 추출물에 의해 회복하는 경향을 보였다. 특히 PG200/SD군(812.02 ± 140.16 pg/mL)은 SD군에 비해 유의적($P < 0.05$)으로 testosterone 함량이 증가하는 것을 확인하였다. Testosterone은 생식기관의 발달과 성숙, 그리고 생식기능 차이에 영향을 미치는 내분비계로 작용하고, steroidogenesis 과정을 통해 생성되는 스테로이드 호르몬으로 스트레스와 같은 외부요인에 의해 영향을 받으며(27), Wu 등(28)의 연구 결과에 따르면 수면박탈 스트레스에 의해 체내의 테스토

스테론 함량이 감소하는 것을 확인하였다.

성장호르몬인 IGF-1의 함량 변화(Fig. 7E)는 수면박탈 스트레스에 의해 유의적으로 감소하며, PCTL 및 PG 투여에 의해 유의적으로 회복되지는 않지만, 농도 의존적으로 증가하는 경향을 확인할 수 있었다. 성장호르몬은 수면을 취할 때 방출되고 수면박탈 시 억제되며, IGF-1은 인슐린 분비에 의해 성장호르몬의 근원세포(myoblast) 증식과 분화, 근육 내 단백질 합성 등의 다양한 역할을 수행하며, 수면박탈에 의해 IGF-1의 생성이 억제되는 것으로 알려진 기존의 연구(29)와 유사한 경향을 확인하였다.

Foley 등(30)과 Newsholme 등(31)의 연구에 따르면 수면박탈 스트레스에 의해 세로토닌과 같은 모노아민이 변화하며 이는 인지능력, 행동뿐만 아니라 CNS의 기능의 조절에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 이는 본 연구 결과인

수면박탈 스트레스로 인한 생리적, 행동학적 및 생화학적 인자의 변화를 뒷받침한다.

뇌의 GSH, CAT, SOD 활성

뇌에서 산화 스트레스는 정신적 피로를 가져오며, 수면박탈 스트레스로 인한 기억 장애는 실험동물의 해마 내 산화 스트레스의 증가에 의해 야기된다(32). 활성산소를 억제하는 방어체계로 인체의 비단백 thiol인 GSH와 같은 비효소적 방어체계 및 SOD, CAT와 같은 효소적 방어체계로 구분되며, SOD는 O₂⁻을 H₂O₂로 분해하며, 이는 CAT에 의해 물과 산소로 분해되는 일련의 과정을 거친다(33).

GSH를 측정된 결과(Fig. 8A), 수면박탈 스트레스에 의해 유의적으로 감소하며, PG100/SD군에서 유의적으로 회복되는 경향을 확인할 수 있었다.

CAT 활성은 CTL군(6.73±0.53 U/mg protein)과 비교했을 때 SD군(3.61±0.10 U/mg protein)에서 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 8B). 이는 PG 추출물에 의해서 농도 의존적으로 개선되었으며, PG100/SD군(6.95±0.66 U/mg protein), PG200/SD군(8.97±0.78 U/mg protein)과 PCTL/SD군(8.93±0.72 U/mg protein)에서 유의적으로 CAT 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

SOD의 활성(Fig. 8C)은 CAT와 유사한 경향으로 SD군(47.95±10.10 U/mg protein, P<0.01)은 가장 낮은 활성을 가지고 있으며, PCTL/SD군(121.67±28.49 U/mg protein) 및 PG200/SD군(114.77±21.88 U/mg protein)에서 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

석류는 항산화능이 뛰어난 punicalagin과 같은 폴리페놀, ellagic acid와 같은 알칼로이드, 안토시아닌 및 탄닌 성분을 다량 함유하고 있으며(6,8) 이러한 성분들이 수면박탈상태에서 증가한 산화 스트레스 관련인자의 억제 및 생리적, 생화학적, 인지능력에 보호 효과를 나타낸 것으로 추정된다.

석류의 항산화 활성을 통해 활성산소와 같은 산화적 스트레스에 취약한 뇌에 미치는 영향에 대한 연구가 다양한 뇌 질환을 이용하여 활발하게 진행 중이다. Moneim(34)의 연구에 따르면 석류 추출물 투여군의 뇌에서 H₂O₂, MDA, NO의 생성이 유의적으로 감소하고, GSH, SOD, CAT, GR, GST가 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. Yaidikar 등(35)은 뇌허혈-재관류(cerebral ischemia/reperfusion)를 통한 산화적 뇌손상을 유발한 동물모델에 석류에 함유된 폴리페놀류인 punicalagin을 투여하여 개선 효과를 확인하였으며, 알츠하이머, 파킨슨병, 크로이츠펠트-야콥병 등의 다양한 뇌질환에 대한 예방 및 개선 효과를 확인하였다(15,36, 37).

본 연구를 통하여 수면박탈 스트레스를 유도한 실험동물은 생존율, 몸무게와 같은 생리적 인자, 기억력, 균형감각 및 운동협응력, 민감성, 공간지각능력과 같은 행동학적 인자, 혈액 및 뇌의 다양한 생화학적 인자의 변화를 가져오며, 이는 산화적 스트레스와 연관이 되어 뇌의 항산화 활성의

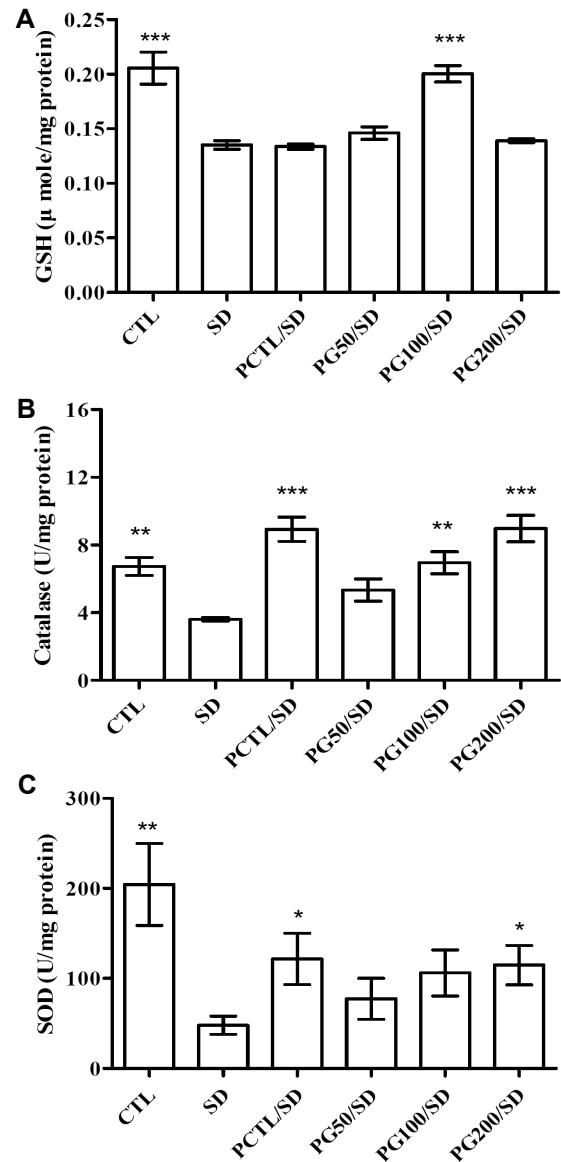


Fig. 8. Effects of a PG extract on antioxidant parameters induced by sleep deprivation. (A) Catalase enzymatic activity in the hippocampus. (B) The changes in reduced glutathione (GSH) content in the hippocampus. (C) Superoxide dismutase (SOD) enzymatic activity in the hippocampus. ***P<0.005, **P<0.01, and *P<0.05 vs SD. Statistical significance was tested with the Dunnett's multiple comparison test.

저하가 야기됨을 확인하였다. 이러한 증상들은 석류(*Punica granatum*) 열수 추출물 투여에 의해 회복하는 것을 확인하였으며, 이를 통해 석류의 수면박탈 스트레스에 대한 개선 효과를 확인하였다.

요 약

수면은 하루의 약 3분의 1을 차지하며, 중추신경계의 항상성 회복, 에너지 저장, 체온조절, 불필요한 기억의 제거, 면역 기능, 에너지 보존 등의 기능을 수행하는 생리현상이다.

이러한 조건이 충족되지 않으면 삶의 질 저하뿐만 아니라 다양한 증상 및 질병이 야기된다. 현대인은 학업, 직장 등 다양한 요소로 인한 과도한 정신적 스트레스, 불안 또는 육체적 피로 등의 이유로 일시적 또는 장기적 수면장애가 증가하는 추세이다. 이렇게 많은 현대인들이 겪는 수면장애를 예방 및 개선하기 방안을 모색하기 위하여 전남 비교우위 특산자원인 석류의 수면, 특히 수면박탈 및 스트레스에 미치는 영향을 *in vivo* 및 *in vitro* 상에서 확인하였다. 석류 (*Punica granatum* L.)는 부처꽃과에 속하는 낙엽활엽교목으로 인도, 페르시아가 원산지이다. 석류는 항산화, 항암, 항당뇨, 항통증, 항염증, 에스트로젠 효과 등이 알려져 있다. 석류 추출물을 전처리한 SH-SY5Y 세포에 H₂O₂/cortico-sterone에 의한 신경세포독성을 유발하여 보호 효과를 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide와 lactate dehydrogenase로 측정된 결과, 유의적인 보호 효과를 확인하였다. 또한, 수면박탈 동물모델에서 생존율, 몸무게, 꾸벅임에서 수면박탈군과 비교하여 모두 유의적인 보호 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다. 석류 추출물의 수면박탈 스트레스에 대한 행동학적 보호 효과는 스트레스의 강도에 따라 행동학적 변화를 관찰한 결과, 운동능력 및 인지능력은 수면박탈이 지속되어도 보호 효과를 갖는 것을 확인하였다. 통각 효과는 hot hyperalgesia test를 통해 스트레스가 지속될수록 무더지는 경향을 확인할 수 있었다. 또한, Y maze는 변경행동력은 유의적인 차이는 없었으나 석류 추출물 투여군들의 움직임이 수면박탈군에 비하여 활발함을 확인하였다. 생화학적 변화를 확인한 결과 코티졸, 세로토닌 및 도파민, 테스토스테론 및 growth factor I의 함량은 수면박탈 스트레스에 의하여 증가하다가 석류 추출물 및 카페인에 의하여 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 마지막으로 항산화 관련 인자인 catalase, glutathione, superoxide dismutase를 측정된 결과, 수면박탈군은 대조군에 비해 유의적으로 감소하는 경향을 보였으며, 석류 추출물에 의하여 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 석류의 항스트레스 효과를 확인하였으며, 특히 동물실험에서는 석류 추출물에 의하여 수면박탈 스트레스가 지속됨에 따라 감소하는 행동학적 결과들을 방지하는 것으로 나타났으며, 이러한 석류의 항스트레스 효과는 항산화적 측면과 연관이 있는 것으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부의 지역산업기술개발사업에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Pace-Schott EF, Hobson JA 2002. The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology and subcortical networks. *Nat Rev Neurosci* 3: 591-605.
2. Reimund E. 1994. The free radical flux theory of sleep. *Med Hypotheses* 43: 231-233.
3. Vollert C, Zagaar M, Hovatta I, Taneja M, Vu A, Dao A, Levine A, Alkadhi K, Salim S. 2011. Exercise prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: potential role of oxidative stress mechanisms. *Behav Brain Res* 224: 233-240.
4. D'Almeida V, Hipólido DC, Azzalis LA, Lobo LL, Junqueira VB, Tufik S. 1997. Absence of oxidative stress following paradoxical sleep deprivation in rats. *Neurosci Lett* 235: 25-28.
5. Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, Nakada K, Honma Y, Hayashi J. 2008. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science* 320: 661-664.
6. Shaygannia E, Bahmani M, Zamanzad B, Rafieian-Kopaei M. 2015. A review study on *Punica granatum* L. *J Evid Based Complementary Altern Med* 21: 221-227.
7. Satomi H, Umemura K, Ueno A, Hatano T, Okuda T, Noro T. 1993. Carbonic anhydrase inhibitors from the pericarps of *Punica granatum* L.. *Biol Pharm Bull* 16: 787-790.
8. Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, 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. *J Nutr Biochem* 16: 360-367.
9. Lansky EP, Newman RA. 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol* 109: 177-206.
10. Jafri MA, Aslam M, Javed K, Singh S. 2000. Effect of *Punica granatum* Linn. (flowers) on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 70: 309-314.
11. Ahmed S, Wang N, Hafeez BB, Cheruvu VK, Haqqi TM. 2005. *Punica granatum* L. extract inhibits IL-1 β -induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF- κ B in human chondrocytes *in vitro*. *J Nutr* 135: 2096-2102.
12. Kaur G, Jabbar Z, Athar M, Alam MS. 2006. *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol* 44: 984-993.
13. Goshtasebi A, Mazari Z, Behboudi Gandevani S, Naseri M. 2015. Anti-hemorrhagic activity of *Punica granatum* L. flower (Persian Golnar) against heavy menstrual bleeding of endometrial origin: a double-blind, randomized controlled trial. *Med J Islam Repub Iran* 29: 199.
14. Mori-Okamoto J, Otawara-Hamamoto Y, Yamato H, Yoshimura H. 2004. Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. *J Ethnopharmacol* 92: 93-101.
15. Choi SJ, Lee JH, Heo HJ, Cho HY, Kim HK, Kim CJ, Kim MO, Suh SH, Shin DH. 2011. *Punica granatum* protects against oxidative stress in PC12 cells and oxidative stress-induced Alzheimer's symptoms in mice. *J Med Food* 14: 695-701.
16. Cohen HB, Dement WC. 1965. Sleep: changes in threshold to electroconvulsive shock in rats after deprivation of "paradoxical" phase. *Science* 150: 1318-1319.
17. Watzman N, Barry H 3rd, Kinnard WJ Jr, Buckley JP. 1967. Influence of certain parameters on the performance of mice on the rotarod. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 169: 362-374.
18. Bae D, Seol H, Yoon HG, Na JR, Oh K, Choi CY, Lee DW,

- Jun W, Youl Lee K, Lee J, Hwang K, Lee YH, Kim S. 2012. Inhaled essential oil from *Chamaecyparis obtuse* ameliorates the impairments of cognitive function induced by injection of β -amyloid in rats. *Pharm Biol* 50: 900-910.
19. Fanselow MS, Bolles RC. 1979. Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 93: 736-744.
 20. Sarter M, Bodewitz G, Stephens DN. 1988. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. *Psychopharmacology (Berl)* 94: 491-495.
 21. Calegare BF, Fernandes L, Tufik S, D'Almeida V. 2010. Biochemical, biometrical and behavioral changes in male offspring of sleep-deprived mice. *Psychoneuroendocrinology* 35: 775-784.
 22. Kumar S, Maheshwari KK, Singh V. 2008. Central nervous system activity of acute administration of ethanol extract of *Punica granatum* L. seeds in mice. *Indian J Exp Biol* 46: 811-816.
 23. Silva RH, Abílio VC, Kameda SR, Takatsu-Coleman AL, Carvalho RC, Ribeiro Rde A, Tufik S, Frussa-Filho R. 2007. Effects of 3-nitropropionic acid administration on memory and hippocampal lipid peroxidation in sleep-deprived mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31: 65-70.
 24. Vidal C, Jacob J. 1986. Hyperalgesia induced by emotional stress in the rat: an experimental animal model of human anxiogenic hyperalgesia. *Ann N Y Acad Sci* 467: 73-81.
 25. Gunn A, Bobeck EN, Weber C, Morgan MM. 2011. The influence of non-nociceptive factors on hot-plate latency in rats. *J Pain* 12: 222-227.
 26. Kim Y, Laposky AD, Bergmann BM, Turek FW. 2007. Repeated sleep restriction in rats leads to homeostatic and allostatic responses during recovery sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 10697-10702.
 27. Rajaratnam SM, Arendt J. 2001. Health in a 24-h society. *Lancet* 358: 999-1005.
 28. Wu JL, Wu RS, Yang JG, Huang CC, Chen KB, Fang KH, Tsai HD. 2011. Effects of sleep deprivation on serum testosterone concentrations in the rat. *Neurosci Lett* 494: 124-129.
 29. Everson CA, Crowley WR. 2004. Reductions in circulating anabolic hormones induced by sustained sleep deprivation in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E1060-1070.
 30. Foley NC, Bhogal SK, Teasell RW, Bureau Y, Speechley MR. 2006. Estimates of quality and reliability with the physiotherapy evidence-based database scale to assess the methodology of randomized controlled trials of pharmacological and nonpharmacological interventions. *Phys Ther* 86: 817-824.
 31. Newsholme EA, Acworth IN, Blomstrand E. 1987. *Amino acids, brain neurotransmitters and a functional link between muscle and brain that is important in sustained exercise*. John Libbey Eurotext Ltd., London, UK. p 127-133.
 32. Silva RH, Abílio VC, Takatsu AL, Kameda SR, Grassl C, Chehin AB, Medrano WA, Calzavara MB, Registro S, Andersen ML, Machado RB, Carvalho RC, Ribeiro Rde A, Tufik S, Frussa-Filho R. 2004. Role of hippocampal oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation in mice. *Neuropharmacology* 46: 895-903.
 33. del Rio LA, Sandalio LM, Palma JM, Bueno P, Corpas FJ. 1992. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radic Biol Med* 13: 557-580.
 34. Moneim AEA. 2012. Antioxidant activities of *Punica granatum* (pomegranate) peel extract on brain of rats. *J Med Plants Res* 6: 195-199.
 35. Yaidikar L, Byna B, Thakur SR. 2014. Neuroprotective effect of punicalagin against cerebral ischemia reperfusion-induced oxidative brain injury in rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 23: 2869-2878.
 36. Braidy N, Selvaraju S, Essa MM, Vaishnav R, Al-Adawi S, Al-Asmi A, Al-Senawi H, Abd Alrahman Alobaidy A, Lakhtakia R, Guillemin GJ. 2013. Neuroprotective effects of a variety of pomegranate juice extracts against MPTP-induced cytotoxicity and oxidative stress in human primary neurons. *Oxid Med Cell Longev* 2013: 685909.
 37. Mizrahi M, Friedman-Levi Y, Larush L, Frid K, Binyamin O, Dori D, Fainstein N, Ovadia H, Ben-Hur T, Magdassi S, Gabizon R. 2014. Pomegranate seed oil nanoemulsions for the prevention and treatment of neurodegenerative diseases: the case of genetic CJD. *Nanomedicine* 10: 1353-1363.