Original Article

Evaluating the analgesic effect of the aqueous extract of *Elaeagnus angustifolia* in rats

Tamtaji OR[1,2], Talaei SA[1], Takhtefiroozeh SM[2], Hamidi Gh[1], Taghizadeh M[3*]

1- Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.
2- Student Research Committee, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.
3- Research Center for Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

Received July 26, 2014; Accepted March 13, 2014

Abstract:

Background: Considering the side effects of chemical drugs, several studies have been conducted to investigate the analgesic effect of plants. The aqueous extract of *Elaeagnus angustifolia* L. contains high levels of polyphenols and flavonoids. Considering the analgesic effect of such compounds, this study was designed to estimate the analgesic effect of the *E. angustifolia* aqueous extract in rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 50 male Wistar rats were randomly allocated into 5 groups (n=10 for each): the groups received the *E. angustifolia* aqueous extract (50, 100, 200 and 400 mg/kg) and control group. The aqueous extract was administered through gavage every day for 4 weeks. Finally, the pain level was evaluated using the mechanical and thermal allodynia, thermal hyperalgesia and formalin tests.

Results: Our results showed that supplementation of *E. angustifolia* aqueous extract significantly reduced pain scores in thermal allodynia, mechanical allodynia, hyperalgesia and formalin test ($P<0.05$).

Conclusion: Aqueous extract of *E. angustifolia* has a prominent dose-dependent analgesic effect on rats.

Keywords: *Elaeagnus angustifolia* L., Allodynia, Hyperalgesia, Formalin test, Analgesic, Rat

* **Corresponding Author.**
Email: taghizadeh_m@kaums.ac.ir
Tel: 098 913 363 3213
Fax: 098 31 556 21157

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences October, 2014; Vol. 18, No 4, Pages 308-316

Please cite this article as: Tamtaji OR, Talaei SA, Takhtefiroozeh SM, Hamidi Gh, Taghizadeh M. Evaluating the analgesic effect of the aqueous extract of *Elaeagnus angustifolia* in rats. ***Feyz*** 2014; 18(4): 308-16.

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی اثر ضد دردی عصاره آبی میوه سنجد در موش‌های صحرایی

امیدرضا تمتاجی [۱و۲]، سید علیرضا طلائی [۳]، سید مهدی تخت فیروزه [۴]، غلامعلی حمیدی [۵]، محسن تقی‌زاده [۶*]

خلاصه:

سابقه و هدف: به‌دلیل عوارض ناشی از داروهای شیمیایی، مطالعات مختلفی جهت بررسی اثر ضد دردی گیاهان صورت گرفته است. عصاره آبی سنجد دارای مقادیر زیادی از ترکیبات پلی فنولی و فلاونوئیدی می‌باشد. با توجه به اثر ضد درد و ضد التهابی ترکیبات فلاونوئیدی موجود در گیاهان، این مطالعه به‌منظور بررسی اثر ضد دردی عصاره آبی سنجد در موش‌های صحرایی صورت گرفت.

مواد و روش ها: این تحقیق تجربی بر روی ۵۰ سر موش صحرایی نر که به‌طور تصادفی به پنج گروه ۱۰ تایی شامل ۴ گروه دریافت-کننده عصاره آبی سنجد با دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر وزن بدن و گروه کنترل تقسیم شدند، انجام شد. عصاره آبی سنجد هر روز و به‌مدت ۴ هفته به‌صورت گاواژ تجویز شد. در نهایت، اثر ضد دردی این عصاره توسط آزمون‌های آلودینیای حرارتی، آلودینیای مکانیکی، هایپرآلژزیای حرارتی و آزمون فرمالین ارزیابی شد.

نتایج: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره آبی سنجد به‌طور قابل توجهی نمره درد را در آزمون‌های آلودینیای حرارتی، آلودینیای مکانیکی، هایپرآلژزیای حرارتی و آزمون فرمالین کاهش می‌دهد ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: عصاره آبی سنجد به‌صورت وابسته به دوز دارای اثر ضد دردی قابل توجهی در موش‌های صحرایی می‌باشد.

واژگان کلیدی: سنجد، آلودینیا، هیپرآلژزیا، آزمون فرمالین، ضد دردی، موش صحرایی

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره هجدهم، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۹۳، صفحات ۳۱۶-۳۰۸

مقدمه

درد یکی از شایع‌ترین شرایط محدود کننده کیفیت زندگی است که جهت تسکین آن از تعداد زیادی داروهای ضد درد مانند داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی (NSAIDs)، ضد دردهای مخدر و غیرمخدر استفاده می‌شود، اما در اثر مصرف طولانی مدت این داروها عوارض زیادی مشاهده می‌شود [۲،۱]. به‌دلیل عوارض ناشی از مصرف داروهای شیمیایی مطالعات زیادی روی اثر ضد دردی گیاهان مختلف انجام گرفته است [۵-۳]. ثابت شده است که ترکیبات فلاونوئیدی مانند میرستئین [۶]، کوئرستین [۹-۷]، رسوراترول [۱۰]، کورکومین [۱۱]، و جنسنوزید [۱۲] دارای اثر ضد دردی هستند.

[۱] دانشجوی کارشناسی بهداشت عمومی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

[۲] دانشجوی کارشناسی بهداشت عمومی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

[۳] دانشجوی دکتری علوم اعصاب، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

[۴] کارشناس بهداشت محیط، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

[۵] دانشیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

[۶] استادیار، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

*** نشانی نویسنده مسئول:**

کاشان، کیلومتر ۵ بلوار قطب راوندی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک

تلفن: ۰۹۱۳ ۳۶۳۳۲۱۳ **دورنویس:** ۰۳۱۵۵۶۲۱۱۵۷

پست الکترونیک: taghizadeh_m@kaums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۲۲ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۳/۵/۴

همچنین، نشان داده شده است که اثرات ضد دردی گیاهان مختلف مانند زعفران و تخم شیرازی (*Securigera securidaca*) [۱۴،۱۳]، می‌تواند به‌دلیل وجود مقادیر زیادی از ترکیبات فلاونوئیدی در این گیاهان باشد. ترکیبات پلی فنولی برخی از گیاهان دارویی نیز همانند ترکیبات فلاونوئیدی اثر ضد دردی مطلوبی را نشان داده است [۱۶،۱۵]. به‌طور عمده ترکیبات فلاونوئیدی و پلی فنولی از طریق مهار آنزیم سیکلو اکسیژناز اثر ضد دردی خود را نشان می‌دهند [۱۷]. سنجد (*Elaeagnus Angustifolia L.*) درختی با میوه شیرین و قابض می‌باشد که در طب سنتی از این گیاه برای درمان بیماری‌هایی مانند تهوع، زردی، استفراغ، آسم و نفخ استفاده می‌شده است [۱۸]. هم‌چنین، مطالعات مختلفی جهت بررسی خواص درمانی این گیاه انجام گرفته است. در یک مطالعه مشخص شد عصاره آبی سنجد می‌تواند باعث بهبود زخم پوستی در موش‌های صحرایی گردد [۱۹]. در مطالعه دیگری نشان داده شد که این گیاه در درمان بیماری لیکن پلان بسیار موثر است [۲۰]. در مطالعات مختلف اثر ضد دردی عصاره سنجد نیز مورد بررسی قرار گرفته است. رمضانی و همکاران اثر ضد دردی قابل توجهی در آزمون‌های فرمالین و tail-flick برای دوز ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی سنجد مشاهده نمودند [۲۱]. هم-چنین، در یک مطالعه دیگر عصاره سنجد به‌صورت درون صفاقی در دوزهای مختلف تزریق شده و اثر ضد دردی قابل توجهی در آزمون‌های فرمالین و رایتینگ مشاهده شد [۲۲]. مواد موثره موجود در سنجد نیز شامل ترکیبات پلی‌فنولی، ترکیبات فلاونوئیدی،

Archive of SID

www.SID.ir

ترپنوئیدها و گلیکوزیدهای قطبی می‌باشد [۲۵-۲۲]. با توجه به اینکه در مطالعات مختلف نشان داده شده است که تزریق درون صفاقی عصاره آبی سنجد در کاهش درد موثر است، مطالعه حاضر به‌منظور بررسی اثر ضد دردی تجویز خوراکی عصاره آبی سنجد در موش‌های صحرایی نر انجام شد.

مواد و روش‌ها

حیوانات و تجویز عصاره آبی سنجد

این مطالعه تجربی بر روی ۵۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کاشان انجام شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به ۵ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. گروه‌های مطالعه شامل ۴ گروه دریافت‌کننده عصاره آبی سنجد با دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و گروه کنترل (دریافت‌کننده آب مقطر) بود. گروه‌های دریافت کننده عصاره، عصاره آبی سنجد را روزانه (ساعت ۹ صبح) و به‌صورت گاواژ با استفاده از سرنگ انسولین دریافت کردند. پس از تجویز عصاره به‌مدت ۴ هفته، شدت درد موش‌ها با آزمون‌های آلودینیای حرارتی، آلودینیای مکانیکی، هایپرآلژزیای حرارتی و آزمون فرمالین مورد ارزیابی قرار گرفت. در طول مطالعه حیوانات از نظر دسترسی به آب و غذا آزاد بودند. درجه حرارت محل نگهداری حیوانات ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۶۰-۵۰ درصد و سیکل روشنایی تاریکی ۱۲ ساعته بود.

تهیه عصاره آبی سنجد

به‌منظور تهیه عصاره آبی سنجد ابتدا میوه سنجد مورد نیاز از فروشگاه‌های شهر کاشان خریداری شده و پس از بررسی و تائید آن از نظر هرباریوم توسط کارشناس ارشد گیاه‌شناسی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی شرکت باریج اسانس، آن را در داخل هاون ریخته و به آرامی آسیاب کردیم تا بخش میوه از هسته جدا شود. قسمت پودری کاملا آسیاب شده به همراه آب مقطر جوشیده به داخل ارلن مایر ریخته شد تا کاملا خمیری شکل شود. با توجه به وجود کربوهیدرات در میوه سنجد و جذب آب توسط آن، طی چند مرحله به مقدار کافی آب جوش به آن اضافه شد تا سطح آن با آب پوشیده گردید (روش ماستراسیون) و به‌مدت ۷۲ ساعت در داخل روتاری در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد باقی ماند تا کاملا مخلوط شده و عصاره آن خارج شود. سپس عصاره آبی موجود در ارلن توسط کاغذ صافی، صاف شده و به‌منظور تغلیظ، محلول حاصل در دمای ۵۵ درجه قرار گرفت. در نهایت مقدار ماده خشک عصاره تغلیظ شده اندازه‌گیری شد و میزان فلاونوئید عصاره آبی سنجد بر اساس کوئرسیتین و میزان پلی‌فنول‌های آن بر اساس گالیک اسید مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز عصاره

تعیین مقدار فلاونوئیدهای تام بر اساس کوئرستین

ابتدا جهت رسم منحنی کالیبراسیون کوئرستین در واکنش با معرف آلومینیم کلراید، ۵ میلی گرم کوئرستین استاندارد توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ میلی گرم توزین شد. پس از حل کردن کوئرستین در اتانول ۸۰ درجه در یک بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری به حجم رسانده شد (۵۰۰µg/ml). از محلول فوق توسط پیپت مقادیر ۱، ۱/۵ و ۲ میلی لیتر برداشته شده و به بالن‌های حجمی ۱۰ میلی لیتری منتقل گردیده و با اتانول ۸۰ به حجم رسانده شد، تا غلظت‌های ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به‌دست آید. از هر یک از محلول‌های اخیر با پیپت حجمی مقدار ۰/۵ میلی لیتر برداشته شده و به بالن حجمی ۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد. سپس، به آن ۲ میلی لیتر اتانول ۸۰ درجه اضافه گردید. به‌دنبال آن به هر یک از بالن‌ها مقدار ۰/۱ میلی لیتر محلول آلومینیوم کلراید (w/w) ۱۰ درصد و ۰/۱ میلی لیتر محلول پتاسیم استات یک مولار اضافه نموده و با اتانول ۸۰ درصد به حجم رسانده شد. پس از ۳۰ دقیقه، جذب محلول‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر در برابر محلول شاهد ثبت گردید (محلول شاهد شامل کلیه اجزا به‌جز محلول نمونه می‌باشد که همزمان با بقیه تهیه می‌گردد). این آزمایش برای هر غلظت سه بار تکرار شد و میانگین جذب هر غلظت برای رسم منحنی کالیبراسیون به‌کار برده شد. در نهایت جهت تعیین مقدار فلاونوئید تام در نمونه، مقدار مشخصی از نمونه درون یک بالن رفلاکس ۵۰ میلی‌لیتری توزین شد. سپس، به آن ۸ میلی لیتر اتانول ۸۰ درجه اضافه گردید و به‌مدت یک ساعت رفلاکس شد. پس از سرد شدن مخلوط به‌وسیله کاغذ صافی واتمن نمره ۴۰ به داخل یک بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری صاف گردید. محتویات بالن و صافی با مقدار کافی از اتانول ۸۰ درجه شسته شده و در نهایت محلول مورد نظر به حجم رسانده شد. ۰/۵ میلی لیتر از این محلول توسط پیپت به بالن حجمی ۵ میلی لیتری منتقل گردید و مشابه روش ذکر شده برای رسم منحنی کالیبراسیون با معرف آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد واکنش داده شد. این آزمایش سه مرتبه تکرار گردید و میانگین جذب محلول‌ها در ۴۱۵ نانومتر به‌دست آمد.

Archive of SID

www.SID.ir

تعیین مقدار ترکیبات فنولیک تام بر اساس گالیک اسید

جهت رسم منحنی کالیبراسیون گالیک اسید، مقدار ۵/۵ میلی گرم از استاندارد گالیک اسید با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ میلی گرم توزین گردید و پس از حل کردن در مقداری آب در یک بالن حجمی ۱۰ میلی لیتری، به حجم رسانده شد (µg/ml ۵۵۰). از محلول فوق با پیپت مقادیر ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌لیتر برداشته شده و به بالن‌های حجمی ۵ میلی لیتری منتقل گردید و سپس با آب به حجم رسانده شد. بدین ترتیب محلول‌های استاندارد از گالیک اسید با غلظت‌های ۵۵، ۱۱۰، ۱۶۵، ۲۲۰ و ۲۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر به‌دست آمد. ۰/۲ میلی‌لیتر از هر یک از محلول‌های استاندارد فوق توسط پیپت به بالن‌های حجمی ۵ میلی-لیتری منتقل گردید. سپس، به هر کدام از بالن‌ها ۲ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۲۵ میلی‌لیتر معرف فولین اضافه شده و خوب تکان داده شد. پس از گذشت ۲ دقیقه به هر یک از بالن‌ها، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات ۲۰ درصد (حجمی/وزنی) افزوده شد و در نهایت با آب مقطر به حجم رسانده شد. محلول شاهد نیز به‌طور هم‌زمان و به طریق مشابه بدون افزودن محلول نمونه به آن تهیه گردید. پس از گذشت ۲ ساعت از به حجم رساندن محلول‌ها، جذب آن‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر در برابر محلول شاهد ثبت گردید. این آزمایش برای هر غلظت سه مرتبه تکرار شد و میانگین جذب برای هر غلظت محاسبه گردید و سپس منحنی کالیبراسیون رسم شد. در نهایت جهت تعیین مقدار ترکیبات فنولیک تام در نمونه، مقدار مشخصی از نمونه درون یک بالن رفلاکس ۵۰ میلی لیتری توزین شد و با اتانول ۸۰ درجه به حجم رسانده شد. ۰/۲ میلی لیتر از محلول اخیر توسط پیپت حجمی به بالن ژوژه ۵ میلی لیتری منتقل شده و مشابه روش ذکر شده برای رسم منحنی کالیبراسیون گالیک اسید با معرف فولین واکنش داده شد. میزان جذب محلول پس از دو ساعت در طول موج ۷۶۰ نانومتر در برابر محلول شاهد ثبت گردید [۲۷،۲۶].

آزمون‌ها

بعد از گذشت ۴ هفته از تجویز خوراکی عصاره آبی سنجد، از آزمون‌های زیر جهت بررسی اثر ضد دردی این عصاره استفاده گردید.

۱- آلودینیای حرارتی (Acetone test)

جهت مشخص کردن حساسیت حیوان به آلودینیای حرارتی از پاشیدن استون به کف پا استفاده شد [۲۸]. در این روش حیوان بر روی یک شبکه سیمی قرار داده شده و به‌وسیله یک سرنگ انسولین که به‌جای سوزن آن یک لوله باریک پلی-پروپیلن قرار داشت، یک قطره استون به کف پای چپ حیوان پاشیده شد. این آزمایش ۵ بار و هر بار به فاصله ۳ دقیقه انجام گرفت. در صورتی‌که با پاشیده شدن استون حیوان پای خود را بلند می‌کرد، به‌عنوان پاسخ مثبت و در غیر این صورت پاسخ منفی در نظر گرفته می‌شد. درصد پاسخ‌ها از طریق تعداد پاسخ مثبت حیوان نسبت به کل تعداد تحریک محاسبه گردید.

۲- آلودینیای مکانیکی (von–Frey filament)

حیوانات بر روی یک شبکه سیمی و در داخل یک محفظه پلاکسی گلاس به ابعاد ۲۰×۲۰ و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر قرار داده شده و بعد از عادت کردن حیوان به محیط جدید از تارهای مختلف von–Frey جهت سنجش آلودینیای مکانیکی استفاده شد. در این آزمایش از تارهای فوق در محدوده ۲ تا ۶۰ گرم ساخت شرکت Stoelting, USA استفاده شد. هر آزمایش را با تار دارای کمترین وزن شروع کرده و به‌ترتیب در صورت عدم پاسخ حیوان، تار با شماره بالاتر انتخاب می‌گردید. هر تار را سه بار متوالی به فاصله ۵ ثانیه و هر بار به‌مدت یک ثانیه به کف پای حیوان فشار داده، اگر ۲ بار متوالی پاسخ داده می‌شد (حیوان پای خود را بلند می‌کرد) آستانه پاسخ به‌حساب می‌آمد و دیگر آزمایش ادامه پیدا نمی‌کرد. در صورتی‌که حیوان به تار شماره ۶۰ نیز پاسخ نمی‌داد، عدد ۶۰ به‌عنوان آستانه پاسخ در نظر گرفته می‌شد [۲۹].

۳- هایپرآلژزیای حرارتی (Radiant Heat Plantar test):

در این آزمایش از دستگاه Radiant heat plantar test (Ugo Bassil, Italy) استفاده شد. با استفاده از این دستگاه با تاباندن اشعه مادون قرمز از میان سطح پلکسی گلاس به کف پای سالم، میزان تحمل حیوان نسبت به محرک آسیب رسان حرارتی مورد سنجش قرار می‌گرفت. این روش توسط Hargreaves و همکارانش معرفی شده است [۳۰]. در این روش، بخش میانی کف پای حیوان در معرض اشعه قرار گرفته و زمان تاخیر در عقب کشیدن پا Paw Withdrawal Latency (PWL) ثبت می‌گردد. تحریکات حرارتی سه مرتبه و با فواصل ۵ تا ۱۰ دقیقه تکرار می‌شد. نقطه برش آزمایش ۲۲ ثانیه بود.

۴- آزمون فرمالین

آزمون فرمالین یک روش استاندارد جهت اندازه‌گیری پاسخ‌های ایجاد شده به محرک‌های دردزای شیمیایی می‌باشد که اولین بار توسط Dubission و Dennis معرفی گردید [۳۱]. در این آزمون، حیوان در یک جایگاه ویژه که شامل یک چهار پایه

Archive of SID

www.SID.ir

آلومینیومی است و روی آن یک صفحه شیشه‌ای قرار دارد، درون اتاقکی مستقر می‌شود. در زیر صفحه شیشه‌ای، آینه‌ای با زاویه ۴۵ درجه تعبیه شده است که مشاهدات را آسان‌تر و دقیق‌تر می‌کند. قبل از هر آزمایش، برای سازگاری با محیط جدید، ۳۰ دقیقه قبل از شروع آزمون، حیوان درون جایگاه مشاهده قرار داده می‌شد. پس از آن حیوان را در محفظه مقید کننده (Restrainer) گذاشته و مقدار ۵۰ میکرولیتر محلول فرمالین رقیق شده ۲/۵ درصد با استفاده از سرنگ انسولین به زیر پوست کف پای چپ حیوان تزریق می‌شد. پس از تزریق فرمالین، حیوان بلافاصله به جایگاه مشاهده بازگردانده شده و به‌مدت ۶۰ دقیقه پاسخ‌های حیوان به محرک‌های دردزا ثبت می‌گردید. رفتارهای ناشی از درد به‌صورت قراردادی به شرح زیر امتیازدهی می‌شود: صفر- حیوان کف پای تزریق شده را روی زمین گذاشته و هیچ علامتی مبنی بر احساس درد نشان نمی‌دهد؛ یک- حیوان کف پای تزریق شده یا نوک انگشتان خود را با احتیاط روی زمین گذاشته، اما وزن خود را روی آن قرار نمی‌دهد؛ دو- حیوان کاملا پای تزریق شده را از زمین بلند کرده و بدون هیچ تماسی به زمین نزدیک بدن خود قرار می‌دهد؛ و سه- حیوان علاوه بر بالا آوردن پای تزریق شده، شروع به تکان دادن، لیسیدن و یا گاز گرفتن آن می‌کند.

آنالیز آماری

داده‌ها پس از جمع‌آوری وارد نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ شده و جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از آزمون واریانس یک‌طرفه استفاده شد. در صورت معنی‌دار بودن نتیجه آزمون برای مقایسه دو به‌دوی گروه‌ها از پس آزمون Bonferroni استفاده گردید. داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف استاندارد از میانگین نشان داده شده و مقادیر P کمتر ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید.

نتایج

آنالیز عصاره

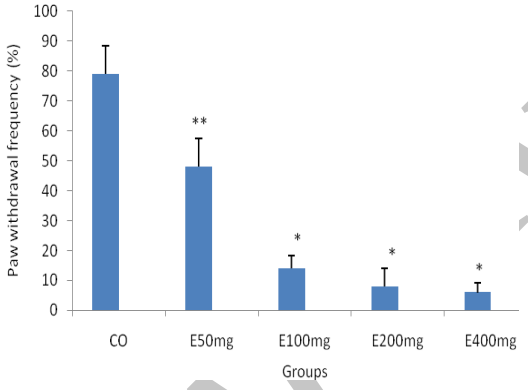
با توجه به‌روش‌های ذکر شده برای آنالیز ترکیبات موجود در عصاره آبی سنجد، و پس از ۶ تکرار برای هر آزمایش، میانگین پلی فنول‌ها بر اساس گالیک اسید معادل ۲/۵ درصد به ازای هر گرم ماده خشک و میزان فلاونوئیدهای آن بر اساس کوئرستین معادل ۵۰ میکروگرم به ازای هر گرم ماده خشک به‌دست آمد.

آزمون‌های رفتاری

نتایج حاصل از هر آزمون، به تفکیک در قالب یک نمودار مقایسه‌ای بین گروه‌های دریافت کننده مقادیر مختلف عصاره و گروه کنترل نمایش داده شده است.

آلودینیای حرارتی

نتایج آنالیز آماری داده‌های مربوط به آلودینیای حرارتی نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه نسبت به پاشیدن استون به کف پای حیوانات وجود دارد ($P<$۰/۰۰۰۱؛ $F_{۴,۴۹}=$۲۰/۹۳۴). بررسی داده‌ها نشان می‌دهد که فرکانس پس کشیدن پا در حیوانات گروه کنترل ۷۹±۹ درصد بود و پس از دریافت عصاره این فرکانس کاهش یافت؛ به‌نحوی‌که با دریافت دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره فرکانس پس کشیدن پا به ۶±۳ درصد کاهش یافت. پس آزمون Bonferroni نشان داد که اختلاف بین گروه‌های کنترل و دریافت‌کننده عصاره با دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن وجود دارد؛ به‌ترتیب $P=$۰/۰۲۳، $P<$۰/۰۰۰۱، $P<$۰/۰۰۰۱، و $P<$۰/۰۰۰۱. به‌علاوه، اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های دریافت‌کننده عصاره با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم مشاهده نشد.



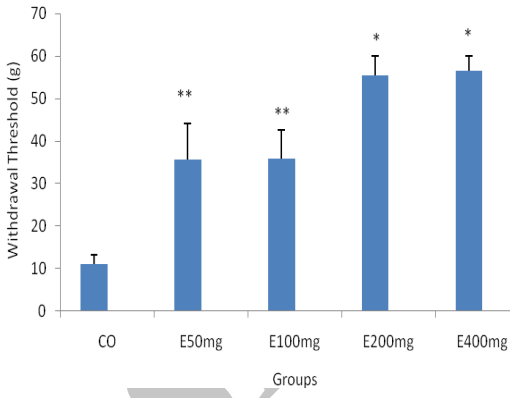
نمودار شماره ۱- بررسی تاثیر دریافت دوزهای مختلف عصاره آبی سنجد بر فرکانس پس کشیدن پا در آزمون آلودینیای حرارتی. داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف استاندارد میانگین نمایش داده شده‌اند.
* اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل و گروه‌های دریافت‌کننده عصاره با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم ($P<$۰/۰۰۰۱).
** اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل و گروه دریافت کننده عصاره ۵۰ میلی گرم ($P=$۰/۰۲۳).

آلودینیای مکانیکی

در این مطالعه آستانه پاسخ حیوانات گروه‌های دریافت کننده عصاره آبی سنجد در تمامی دوزها نسبت به تحریک مکانیکی غیر دردناک که توسط تارهای von–Frey اعمال می‌گردید، افزایش یافت ($P<$۰/۰۰۰۱؛ $F_{۴,۴۹}=$۱۱/۳۴۵). اختلاف

www.SID.ir

آستانه پاسخ در تمامی گروه‌های دریافت‌کننده عصاره با گروه کنترل معنی‌دار بود؛ به‌طوری‌که اختلاف بین گروه‌های دریافت کننده عصاره با دوز ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم با کنترل برابر با ($P<۰/۰۰۰۱$) و گروه‌های دریافت‌کننده عصاره با دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ با کنترل نیز برابر با $P=۰/۰۲$ بود.



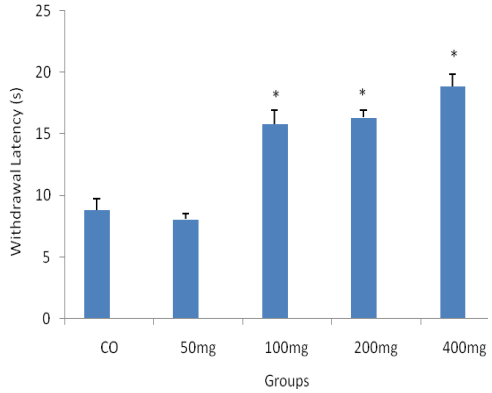
نمودار شماره ۲- بررسی تاثیر دریافت دوزهای مختلف عصاره آبی سنجد در پاسخ به تحریک ناشی از تماس von–Frey در آزمون آلودینیای مکانیکی. داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف استاندارد میانگین نمایش داده شده‌اند.

* اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل و گروه‌های دریافت کننده عصاره با دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم ($P<۰/۰۰۰۱$).

** اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل و گروه‌های دریافت کننده عصاره با دوز ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم ($P=۰/۰۲$)

هایپرآلژزیای حرارتی

نتایج حاصل از آزمون هایپرآلژزیای حرارتی نیز نشان داد که گروه‌های دریافت کننده عصاره آبی سنجد تحمل بیشتری نسبت به حرارت ناشی از اشعه مادون قرمز در مقایسه با گروه کنترل داشتند و پنجه پای خود را با تاخیر بیشتری به عقب می‌کشیدند ($P<۰/۰۰۰۱$؛ $F_{۴,۴۹}=۳۲/۳۲۸$). میانگین زمان عقب کشیدن پنجه پا در حیوانات گروه دریافت کننده عصاره با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ۸/۰۶±۰/۴ ثانیه بود که در مقایسه با گروه کنترل که ۸/۸۱±۰/۹ ثانیه بود، اختلاف معنی با یکدیگر نداشتند ($P=۰/۹۷۱$)، اما گروه‌های دیگر در مقایسه با گروه کنترل تحمل بیشتری نسبت به اشعه مادون قرمز داشتند و اختلاف زمان عقب کشیدن پا در حیوانات این گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل معنی-دار بود ($P<۰/۰۰۰۱$).

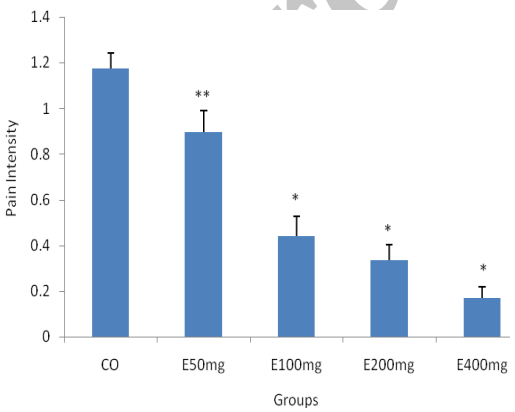


نمودار شماره ۳- بررسی تاثیر دریافت دوزهای مختلف عصاره آبی سنجد نسبت به تحریک ناشی از Radiant Heat در آزمون هایپرآلژزیای حرارتی. داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف استاندارد میانگین نمایش داده شده‌اند.

* اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل و گروه‌های دریافت کننده عصاره با دوز ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم ($P<۰/۰۰۰۱$).

آزمون فرمالین

تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که موش‌های گروه‌های دریافت کننده عصاره آبی سنجد نسبت به گروه کنترل شدت درد کمتری را حس کرده و کمتر پای خود را بلند کرده یا اقدام به لیسیدن آن می‌کردند($P<۰/۰۰۰۱$؛ $F_{۴,۴۹}=۳۱/۵۰۴$). پس آزمون Bonferroni نشان داد که اگرچه اختلاف بین میانگین نمره درد مربوط به حیوانات گروه کنترل و حیوانات دریافت کننده عصاره با دوز ۵۰ میلی گرم معنی‌دار نبود ($P=۰/۰۷۶$)، اما اختلاف میانگین نمره درد حیوانات گروه کنترل با حیوانات گروه‌های دریافت کننده عصاره با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم معنی‌دار بود ($P<۰/۰۰۰۱$).



نمودار شماره ۴- بررسی تاثیر دریافت دوزهای مختلف عصاره آبی سنجد نسبت به درد ناشی از تزریق فرمالین در آزمون فرمالین. داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف استاندارد میانگین نمایش داده شده‌اند.

* اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل و گروه‌های دریافت‌کننده عصاره با دوز ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم ($P<۰/۰۰۰۱$).

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

این مطالعه نشان داد که تجویز خوراکی عصاره آبی میوه سنجد دارای اثر ضد دردی قابل توجهی در هر چهار آزمون آلودینیای مکانیکی، آلودینیای حرارتی، هایپرآلژزیای حرارتی و آزمون فرمالین در موش‌های صحرایی می‌باشد. نتایج حاصل از این مطالعه تایید کننده مطالعات قبلی بود. احمدیانی و همکاران عصاره آبی سنجد را به‌صورت تک دوز و به مقدار ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تجویز کرده بودند و اثر ضد دردی قابل توجهی در آزمون‌های فرمالین و tail-flick مشاهده نمودند [۲۱]. هم‌چنین، در یک مطالعه دیگر عصاره سنجد به‌صورت درون صفاقی در دوزهای مختلف تزریق شده و اثر ضد دردی قابل توجهی در آزمون‌های فرمالین و رایتینگ مشاهده شد [۲۲]. در آزمون هایپرآلژزیای حرارتی و فرمالین موش‌های دریافت کننده دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ تاثیر قابل توجهی در کاهش درد از خود نشان دادند، اما در دوز ۵۰ میلی‌گرم اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل مشاهده نشد. در آزمون آلودینیای مکانیکی و آلودینیای حرارتی گروه‌های دریافت‌کننده عصاره آبی سنجد در تمامی دوزها اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل از خود نشان دادند. بنابراین، با توجه نتایج حاصل از این آزمون‌ها می‌توان نتیجه گرفت دوز موثره عصاره آبی سنجد جهت کاهش درد، دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن می‌باشد. بیان شده است که ترکیب فلاونوئیدی کوئرستین باعث کاهش درد در آزمون‌های صفحه داغ و tail-flick می‌شود [۸]. در یک مطالعه اثر ضد دردی رسوراترول با دیکلوفناک و سلکوکسیب مورد مقایسه قرار گرفت و در نهایت مشخص شد که رسوراترول و دیکلوفناک اثر ضد دردی قابل توجهی نسبت به سلکوکسیب در آزمون فرمالین دارند [۱۰]. هم‌چنین، نشان داده شده است که زعفران دارای اثر ضد دردی قابل توجهی می‌باشد که علت آن می‌تواند وجود مقادیر زیادی از ترکیبات فلاونوئیدی در این گیاه باشد [۱۳]. علاوه بر ترکیبات فلاونوئیدی، ترکیبات پلی‌فنولی موجود در گیاهان نیز می‌تواند دارای اثر ضد دردی باشد [۱۶]. در یک مطالعه مشخص شد بخش پلی فنولی عصاره گیاه مرزه دارای اثر ضد دردی خوبی در آزمون فرمالین و کاراگینان می‌باشد [۱۵]. در مطالعه Küpeli و همکاران نیز مشخص شد عصاره گیاه ژرانیوم دارای اثر ضد دردی و ضد التهابی در آزمون‌هایی مانند Prostaglandin E2 (PGE2) و 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) می‌باشد [۳۲]. در مطالعه حاضر عصاره آبی سنجد آنالیز شد و مشخص گردید این عصاره حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات پلی‌فنولی و هم‌چنین ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشد. در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده است که عصاره سنجد دارای مقادیر زیادی از ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشد [۲۴،۲۲]. در مطالعه Ayaz و Bertoft مشخص شد که میوه سنجد دارای ۳/۲ درصد ترکیبات پلی فنولی در ۱۰۰ گرم میوه خشک می‌باشد [۲۵]. بنابراین، شاید علت اثر ضد دردی عصاره آبی سنجد وجود مقادیر زیادی از ترکیبات پلی‌فنولی و فلاونوئیدی باشد. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که مهار آنزیم‌های سیکلو اکسیژناز باعث کاهش درد می‌شود و داروهای مهار کننده سیکلو اکسیژناز می‌توانند درد را کاهش دهند [۳۴،۳۳]. نشان داده شده است L-745,337 که مهار کننده انتخابی سیکلو اکسیژناز ۲ می‌باشد باعث اثر ضد دردی می‌شود [۳۵] ترکیبات پلی فنولی نیز باعث مهار آنزیم سیکلو اکسیژناز ۲ می‌شوند [۳۸-۳۶]. هم‌چنین، در مطالعات زیادی ثابت شده است که ترکیبات فلاونوئیدی مانند کوئرستین، نارینجنین، آپیجنین، گالانجین، هسپاریدین و واگونین با مهار آنزیم سیکلو اکسیژناز ۲ درد را کاهش می‌دهند [۴۰،۳۹،۱۷]. در مطالعه فرحبخش و همکاران نیز ثابت شد که عصاره آبی سنجد باعث مهار آنزیم های سیکلواکسیژناز می‌شود [۴۱]. بنابراین، علت اثر ضد دردی عصاره آبی سنجد می‌تواند مهار آنزیم‌های سیکلو اکسیژناز به‌خصوص آنزیم سیکلو اکسیژناز ۲ توسط ترکیبات پلی فنولی و فلاونوئیدی موجود در آن باشد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که حیوانات گروه کنترل در مقایسه با حیوانات گروه‌های دریافت کننده عصاره آبی سنجد، پاسخ رفتاری شدیدی در مقابل محرک‌های حرارتی و مکانیکی غیر دردناک و محرک‌های حرارتی و مکانیکی دردناک از خود بروز دادند. این اثر ضد دردی عصاره آبی سنجد می‌تواند به‌دلیل وجود مقادیر زیادی از ترکیبات پلی فنولی و فلاونوئیدی باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی کاشان با کد ۹۲۰۶۱ می‌باشد. بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی این دانشگاه به‌دلیل همکاری و حمایت‌های مالی، کمال تشکر و قدردانی را به‌عمل می‌آورند.

Archive of SID

www.SID.ir

References:

[1] Jage J. Opioid tolerance and dependence—do they matter? ***Eur J Pain*** 2005; 9(2): 157-62.

[2] Milano J, Rossato MF, Oliveira SM, Drewes C, Machado P, Beck P, et al. An tinociceptive action of 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1 H-pyrazole methyl ester in models of inflammatory pain in mice. ***Life Sci*** 2008; 83(21-22): 739-46.

[3] Jain NK, Kulkarni SK. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Tanacetum parthenium L. extract in mice and rats. ***J Ethnopharmacol*** 1999; 68(1-3): 251-9.

[4] Roome T, Dar A, Naqvi S, Choudhary MI. Evaluation of antinociceptive effect of Aegiceras corniculatum stems extracts and its possible mechanism of action in rodents. ***J Ethnopharmacol*** 2011; 135(2): 351-8.

[5] Park SH, Sim YB, Kim SM, Kang YJ, Lee JK, Suh HW. Antinociceptive profiles and mechanisms of orally administered curcumin in various pain models. ***J Korean Society Applied Biological Chemistry*** 2012; 55(1): 57-61.

[6] Meotti FC, Luiz AP, Pizzolatti MG, Kassuya CA, Calixto JB, Santos AR. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for a role of the L-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. ***J Pharmacol Exp Ther*** 2006; 316(2): 789-96.

[7] Esmaeili-Mahani S, Rezaeezadeh-Roukerd M, Esmaeilpour K, Abbasnejad M, Rasoulian B, Sheibani V, et al. Olive (Olea europaea L.) leaf extract elicits antinociceptive activity, potentiates morphine analgesia and suppresses morphine hyperalgesia in rats. ***J Ethnopharmacol*** 2010; 132(1): 200-5.

[8] Kaur R, Singh D, Chopra K. Participation of α 2 Receptors in the Antinociceptive Activity of Quercetin. ***J Med Food*** 2005; 8(4): 529-32.

[9] Gorzalczany S, Marrassini C, Miño J, Acevedo C, Ferraro G. Antinociceptive activity of ethanolic extract and isolated compounds of Urtica circularis. ***J Ethnopharmacol*** 2011; 134(3): 733-8.

[10] Torres-López JE, Ortiz MI, Castañeda-Hernández G, Alonso-López R, Asomoza-Espinosa R, Granados-Soto V. Comparison of the antinociceptive effect of celecoxib, diclofenac and resveratrol in the formalin test. ***Life Sci*** 2002; 70(14): 1669-76.

[11] de Sá PG, Nunes X, de Lima J, Fontana A, de Siqueira J, Quintans-Júnior L, et al. Antinociceptive effect of ethanolic extract of Selaginella convoluta in mice. ***BMC Complement Altern Med*** 2012; 12(1): 187.

[12] Toker G, Küpeli E, Memisoğlu M, Yesilada E. Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of Tilia argentea (silver linden). ***J Ethnopharmacol*** 2004; 95(2-3): 393-7.

[13] Hosseinzadeh H, Younesi HM. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Crocus sativus L. stigma and petal extracts in mice. ***BMC Pharmacol*** 2002; 2(1): 7.

[14] Shahidi S, Pahlevani P. Antinociceptive Effects of an Extract of Securigera securidaca and Their Mechanisms in Mice. ***Neurophysiology*** 2013: 1-5.

[1] Hajhashemi V, Ghannadi A, Pezeshkian SK. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Satureja hortensis L. extracts and essential oil. ***J Ethnopharmacol*** 2002; 82(2-3): 83-7.

[16] Ojewole JA. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of Bryophyllum pinnatum (Crassulaceae) leaf aqueous extract. ***J Ethnopharmacol*** 2005; 99(1): 13-9.

[17] Raso GM, Meli R, Di Carlo G, Pacilio M, Di Carlo R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A. 1. ***Life Sci*** 2001; 68(8): 921-31.

[18] Mirhydar H. Encyclopedia of plants: indications of plants in the prevention and treatment of diseases. Islamic Farhang, Tehran. 1998; 2: 163-4.

[19] Mehrabani Natanzi M, Pasalar P, Kamalinejad M, Dehpour AR, Tavangar SM, Sharifi R, et al. Effect of aqueous extract of Elaeagnus angustifolia fruit on experimental cutaneous wound healing in rats. ***Acta Med Iran*** 2012; 50(9): 589-96.

[20] Beigom Taheri J, Anbari F, Maleki Z, Boostani S, Zarghi A, Pouralibaba F. Efficacy of Elaeagnus angustifolia Topical Gel in the Treatment of Symptomatic Oral Lichen Planus. ***J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*** 2010; 4(1): 29-32.

[21] Ramezani M, Hosseinzadeh H, Daneshmand N. Antinociceptive effect of Elaeagnus angustifolia fruit seeds in mice. ***Fitoterapia*** 2001; 72(3): 255-62.

[22] Ahmadiani A, Hosseiny J, Semnanian S, Javan M, Saeedi F, Kamalinejad M, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Elaeagnus angustifolia fruit extract. ***J Ethnopharmacol*** 2000; 72(1): 287-92.

[23] Dembińska-Migas W, Gill S. Flavonoids in leaves of Elaeagnus angustifolia L. ***Pol J Pharmacol Pharm*** 1973; 25(6): 599.

[24] Hosseinzadeh H, Ramezani M, Namjo N. Muscle relaxant activity of Elaeagnus angustifolia L. fruit seeds in mice. ***J Ethnopharmacol*** 2003; 84(2-3): 275-8.

[25] Ayaz FA, Bertoft E. Sugar and phenolic acid composition of stored commercial oleaster fruits. ***J Food Composition Analysis*** 2001; 14(5): 505-11.

Archive of SID

www.SID.ir

[26] Arvouet-Grand A, Vennat B, Pourrat A, Legret P. Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants= Standardization of a propolis extract and identification of the main constituents. ***J Pharm Belg*** 1994; 49(6): 462–8.
[27] Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. ***Methods Enzymol*** 1999; 299: 152-78.
[28] Choi Y, Yoon YW, Na HS, Kim SH, Chung JM. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. ***Pain*** 1994; 59(3): 369-76.
[29] Chaplan S, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. ***J Neurosci Methods*** 1994; 53(1): 55-63.
[30] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. ***Pain*** 1988; 32(1): 77-88.
[31] Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. ***Pain*** 1978; 4(2): 161-74.
[32] Küpeli E, Tatli I, Akdemir ZS, Yesilada E. Estimation of antinociceptive and anti-inflammatory activity on Geranium pratense subsp. finitimum and its phenolic compounds. ***J Ethnopharmacol*** 2007; 114(2): 234-40.
[33] Mazario J, Gaitan G, Herrero JF. Cyclooxygenase-1 vs. cyclooxygenase-2 inhibitors in the induction of antinociception in rodent withdrawal reflexes. ***Neuropharmacology*** 2001; 40(7): 937-46.
[34] Déciga-Campos M, López UG, Reval MIDa, López-Muñoz FJ. Enhancement of antinociception by co-administration of an opioid drug (morphine) and a preferential cyclooxygenase-2 inhibitor (rofecoxib) in rats. ***Eur J Pharmacol*** 2003; 460(2): 99-107.
[35] Boyce S, Chan C-C, Gordon R, Li C-S, Rodger I, Webb J, et al. L-745,337: a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 elicits antinociception but not gastric ulceration in rats. ***Neuropharmacology*** 1994; 33(12): 1609-11.
[36] Luceri C, Caderni G, Sanna A, Dolara P. Red wine and black tea polyphenols modulate the expression of cycloxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and glutathione-related enzymes in azoxymethane-induced f344 rat colon tumors. ***J Nutr*** 2002; 132(6): 1376-9.
[37] Simonyi A, Woods D, Sun AY, Sun GY. Grape Polyphenols Inhibit Chronic Ethanol-Induced COX-2 mRNA Expression in Rat Brain. ***Alcohol Clin Exp Res*** 2002; 26(3): 352-7.
[38] Roy P, George J, Srivastava S, Tyagi S, Shukla Y. Inhibitory effects of tea polyphenols by targeting cyclooxygenase-2 through regulation of nuclear factor kappa B, Akt and p53 in rat mammary tumors. ***Invest New Drugs*** 2011; 29(2): 225-31.
[39] Chi YS, Cheon BS, Kim HP. Effect of wogonin, a plant flavone from Scutellaria radix, on the suppression of cyclooxygenase-2 and the induction of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells. ***Biochem Pharmacol*** 2001; 61(10): 1195-203.
[40] Sakata K, Hirose Y, Qiao Z, Tanaka T, Mori H. Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line. ***Cancer lett*** 2003; 199(2): 139-45.
[41] Farahbakhsh S, Arbabian S, Emami F, Rastegar Moghadam B, Ghoshooni H, Noroozzadeh A, et al. Inhibition of Cyclooxygenase type 1 and 2 enzyme by aqueous extract of Elaeagnus angustifolia in mice. ***Basic Clin Neurosci*** 2011; 2(2): 31-7.

Archive of SID

www.SID.ir