بررسی اثر ضد دردی و ضد التهابی عصاره ی هیدرو الکلی دانه ی گیاه گنده تلخه در موش سوری نر

فهیمه هودگر[1]- سیما نصری[2] - غلامرضا امین[3]

چکیده

زمینه و هدف: کاربرد گیاهان دارویی به جای داروهای سنتتیک در سال های اخیر بـه دلیـل کـم بـودن عوارض جانبی و تنوع ترکیبات مؤثره ی گیاهان افزایش یافته است. بررسی اثر ضد دردی و ضد التهـابی دانه ی گنده تلخه با توجه به ترکیبات ضد دردی و ضد التهابی موجود در گیاه ضروری به نظر می رسد.

روش تحقیق: در این پژوهش از 156 سر موش سوری نر نژاد NMRI بـا وزن 25-20 گـرم اسـتفاده گردید. پس از تعیین میزان دوز کشنده عصاره ی (LD_{50})، از دو تست گـزیلن و فرمـالین بـرای بررسـی اثرات ضد التهابی و ضد دردی گیاه استفاده شد. در هر تست حیوانات به 6 گـروه: شـاهد، کنتـرل مثبـت (دریافت کننده ی دگزامتازون با دوز 15 mg/kg در تست التهاب و مورفین با دوز 10 mg/kg در تست فرمالین) و گروه های تجربی دریافت کننده ی دوزهای 42 mg/kg، 85، 170 و 340 تقسیم شدند.

یافته ها: میزان LD_{50} عصاره ی هیـدروالکلی گیـاه گنـده تلخـه 1/7 mg/kg تعیـین شـد. عصـاره ی هیدروالکلی دانه ی گیاه گنده تلخه دارای اثر ضد التهابی در تمامی دوزها می باشد. هم چنین آن موجب کاهش معنـی دار درد هـم در فـاز حـاد و هـم در فـاز مـزمن شـد کـه بیشـترین اثـر ضـد دردی را دوز 340 mg/kg به خصوص در فاز مزمن داشت.

نتیجه گیری: عصاره ی هیدروالکلی دانه ی گیاه گنده دارای اثرات ضد التهابی و ضد دردی به خصوص در فاز مزمن (فاز التهابی) تست فرمالین می باشد که این اثر ممکن است به دلیل وجود فلاونوئید و تـانن موجود در گیاه باشد که در گذشته اثرات ضد دردی و ضد التهابی آن ها شناخته شده است.

کلید واژه ها: دانه ی گنده تلخه؛ دوز کشنده؛ ضد التهاب؛ ضد درد؛ موش سوری نر

افق‌دانش؛ فصـلنامه ی دانشـگاه علـوم پزشـکی و خـدمات بهداشـتی درمـانی گنابـاد (دوره ی17؛ شـماره ی1؛ بهـار 1390)

دریافت: 1389/4/20 اصلاح نهایی: 1389/6/31 پذیرش: 1389/12/20

1- کارشناس ارشد زیست شناسی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده ی علوم، دانشگاه پیام نور، مرکز تهران

2- **نویسنده ی مسؤول؛** استادیار، دکترای زیست شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده ی علوم، دانشگاه پیام نور، مرکز تهران

آدرس: تهران - خیابان استاد نجات الهی- خیابان فلاحپور- دانشگاه پیام نور، مرکز تهران- مجتمع علوم پایه و کشاورزی، گروه زیست شناسی

تلفن: 021-88913475 **نمابر:** 021-88807580 **پست الکترونیکی:** s_nasri2000@yahoo.com

3- استاد، دکترای فارماکوگنوزی، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

مقدمه

هنگامی که بافتی دچار آسیب می شود، درد به وجود می آید که شخص در مقابل آن از خود واکنش نشان داده و محرک دردزا را از میان برمی دارد. درد به عنوان محافظ بدن در برابر آسیب بافت به کار می رود و به دو نوع عمده تقسیم می شود: درد سریع و درد آهسته (1). از ترکیباتی که دارای خاصیت ضد دردی می‌باشند، اوپیوئیدها هستند که به دو دسته تقسیم می‌شوند:

1- اوپیوئیدهای درون زا: که به طور طبیعی در بدن یافت می‌شوند و در سرکوب و مهار درد مؤثر هستند.

2- اوپیوئیدهای برون زا: این ترکیبات در خارج از بدن وجود داشته و به عنوان داروهای ضد درد مصرف می‌شوند مانند مورفین (2). استفاده از این داروها مشکلاتی مانند مقاومت به دارو، وابستگی، سرخوشی و غیره ایجاد می کند (3). دگزامتازون یک کورتیکواستروئید با اثر طولانی است که برای بسیاری از عفونت های پوست و بافت های نرم ناشی از حساسیت یا التهاب تجویز می شود. درمان طولانی مدت با مقدار مصرف زیاد این دارو می تواند عوارض جانبی خطرناکی مانند سوء هاضمه، ضعف عضلات، احتباس مایعات و غیره را به دنبال داشته باشد (4).

گیاه *Securigera securidaca L.* در طبقه بندی موجودات زنده متعلق به تیره ی حبوبات و زیر تیره ی پروانه آساها (*Papilionaceae*) می‌باشد (5). این گیاه در فارسی تخم شیرازی و گنده تلخه نامیده می شود. معمولاً گیاهانی بدون کرک دارای ساقه های پخش شده اند که به صورت علف های هرز در مزارع و باغات استان خوزستان خصوصاً دزفول و رامهرمز دیده می شود، دارای میوه های کوچک سوزنی شکل به رنگ قهوه ای روشن حاوی تعداد اندکی دانه است (6).

از آزمایش های فیتوشیمیایی انجام شده بر روی دانه و پوسته مشخص شده که ماده ی مؤثره ی گیاه در دانه ی آن وجود دارد (7). مهم ترین ترکیباتی که در دانه ی گیاه گزارش شده اند شامل ترکیباتی از گروه ساپونین های تری ترپنی، کاردنولیدها، فلاونوئیدها، کومارین ها و استرول ها می باشند (8).

عصاره ی آبی و اتانولی دانه های گنده تلخه حاوی آلکالوئید، تانن و غنی از فلاونوئید است (9).

عصاره ی دانه ی این گیاه دارای خواص مدر، هیپوکالمیک، هیپوگلیسمیک (کاهش قند خون)، ضد تشنج (صرع) و کرونوتروپیک می باشد (12-10). این گیاه در طب سنتی ایران به عنوان پایین آورنده ی فشار خون، قند خون، درمان دیابت (دیابت ملیتوس) و چربی خون بالا مورد استفاده قرار می گیرد (6,13). مطالعات انجام شده حاکی از آن است که دانه های این گیاه می توانند سبب مهار آسیب مخاط معده شوند و دارای اثر محافظت کننده ی معده[1] و ضد ترشحی[2] بر روی موکوس معده می باشد. گنده تلخه در درمان التهاب و زخم معده مؤثر است (14). عصاره ی دانه سبب کاهش کلسترول LDL و تری گلیسرید و بهبود عملکرد وابسته به اندوتلیوم عروقی می شود (13). عصاره ی کلروفرمی دانه های گیاه گنده تلخه، سبب کاهش قند خون از طریق اثراتی مشابه انسولین و یا از طریق افزایش آزاد سازی انسولین می شود (15).

با توجه به ترکیبات و اثرات ضد دردی و ضد التهابی موجود در گیاهان خانواده ی پروانه آساها و هم چنین در دانه ی گیاه گنده تلخه و پژوهش های انجام شده بر آن تاکنون و همچنین اطلاعات بومی و محلی مبنی بر اثرات ضد دردی این گیاه و هم چنین عوارض جانبی و زیاد داروهای نارکوتیک، انجام مطالعه ای در زمینه ی اثرات بی دردی و ضد التهابی این گیاه ضروری به نظر می رسد.

روش تحقیق

حیوانات: در این مطالعه ی تجربی 156 سر موش سوری نر شامل دو زیر گروه 60 و 96 سر موش با محدوده ی وزنی 25-20 گرم که از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند استفاده گردید. موش ها در شرایط دمایی مناسب 2±23 درجه سانتی گراد و طول روز و شب یکسان (12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی) در اتاق حیوانات با دسترسی آزاد به غذا و آب نگهداری شدند.

1- Gastroprotective
2- Antisecretory

تهیه عصاره ی هیدروالکلی دانه ی گیاه گنده تلخه: در این تحقیق از دانه ی گیاه گنده تلخه (تهیه شده از عطاری های شهرستان دزفول در استان خوزستان) که در هرباریوم بخش فارماکوگنوزی دانشکده ی داروسازی دانشگاه تهران مورد تأیید قرار گرفت، استفاده شد و برای عصاره گیری از روش سوکسله استفاده گردید. به این ترتیب که 50 گرم پودر دانه ی گیاه گنده تلخه را داخل کاغذ صافی که سوراخ های بسیار ریز دارد قرار داده، سپس حلال مورد نظر (اتانول70 درجه) را در فلاسک ریخته و قسمت فوقانی دستگاه را روی آن قرار دادیم و در ادامه درجه حرارت را مطابق نقطه ی جوش حلال تنظیم نمودیم. حلال بخار شده در طول لوله بالا می رود، بخار حلال توسط دستگاه مبرد خنک شده، مایع می شود و به صورت قطراتی وارد پودر خام می شود. وقتی سطح حلال به سیفون رسید، حلال به طور اتوماتیک تخلیه می شود و در فلاسک جمع آوری می گردد. این جریان به طور مرتب تا 4 ساعت انجام شده تا عمل استخراج روی پودر خام مورد آزمایش کامل شود (6,17).

روش تعیین دوز کشنده ی عصاره: جهت تعیین دوز کشنده ی عصاره ی از 60 سر موش سوری نر استفاده شد. موش ها به گروه های 10 تایی تقسیم شدند. سپس عصاره ی گیاه با دوزهای مختلف به صورت داخل صفاقی به آن ها تزریق شد. کمترین دوز تزریقی 0/6 گرم بر کیلو گرم وزن حیوان بوده است و اعداد بعدی با نسبت تصاعد هندسی انتخاب شد (0/6 gr/kg، 0/9، 1/35،2/03و3/04). تعداد موش های مرده 24 ساعت پس از هر تزریق بررسی شدند. سپس با رسم منحنی تغییرات Sg^1 و Dg^2، نقطه ی تقاطع دو منحنی را به دست آورده که بدین ترتیب می توان کمترین مقدار دوز کشنده برای 50 درصد حیوانات را به دست آورد (نمودار 1). بدین ترتیب میزان دوز کشنده برای عصاره ی هیدورالکلی گیاه گنده تلخه، 1/7 گرم بر کیلوگرم وزن حیوان به دست آمد. برای تعیین دوز مؤثر 1/10 دوز LD_{50} را در نظر گرفتیم. 1/10 میزان 1/7 برابر است با 170 میلی گرم بر کیلوگرم و علاوه بر دوز 170 دوزهای 42، 340 و 85 میلی گرم بر کیلوگرم وزن حیوان نیز تزریق شد (18).

تست گزیلن: برای انجام این تست موش ها را به صورت تصادفی به 6 گروه که هر گروه شامل 8 سر موش بود تقسیم کردیم:1- گروه شاهد (کنترل منفی) که به این گروه، نرمال سالین به صورت داخل صفاقی تزریق شد. 2- گروه کنترل مثبت که 15 mg/kg دگزامتازون (در نرمال سالین حل شد) به روش داخل صفاقی به آن ها تزریق شد. 3- گروه های تجربی (هر کدام شامل 8 سر موش) که به هر کدام از گروه ها عصاره ی گیاه را با دوزهای متفاوت (42 mg/kg، 85،170، 340) به صورت تک دوز برای هر حیوان و به روش داخل صفاقی تزریق کردیم (کلیه تزریقات 15 دقیقه قبل از تجویز گزیلن می باشد). سپس برای ایجاد التهاب در گوش موش ها از گزیلن (خریداری شده از شرکت Romil انگلیس) استفاده شد. به طوری که 15 دقیقه بعد از تزریقات درون صفاقی ذکر شده، 0/03 میلی لیتر گزیلن، در سطح قدامی و پشتی لاله ی گوش راست حیوان تزریق و دو ساعت بعد حیوان کشته شد (19)، سپس هر دو گوش حیوان را جدا کرده و برش های 7 میلی متری از دو گوش چپ و راست گرفته، وزن گردید و اختلاف وزن برش های دو گوش چپ و راست مشخص شد. این اختلاف وزن میزان التهاب را نشان می دهد و هر چه تفاوت وزن دو گوش بیشتر باشد، میزان التهاب نیز بیشتر است (19,20).

تست فرمالین: در این مطالعه از آزمون فرمالین ابداع شده توسط دنیس و دابوسون که مدلی برای ارزیابی درد است ،استفاده شد (22-20). در این تست دو مرحله درد مشخص دیده می شود (23,24). در فاز اول درد (درد نوروژنیک) ماده ی p و برادی کینین و در فاز دوم درد (درد التهابی- محیطی) هیستامین و پروستاگلاندین ها نقش دارند که این امر نیز می تواند خود بیانگر التهابی بودن مرحله ی دوم باشد (25,26). برای انجام این تست از 6 گروه که موش ها به صورت تصادفی در این گروه ها تقسیم شدند و هر گروه شامل 8 سر موش است، استفاده شد. گروه ها مانند تست گزیلن تقسیم بندی می شوند، با این تفاوت که در این

1- Survived groups: تعداد موش های زنده با این دوز یا کمتر

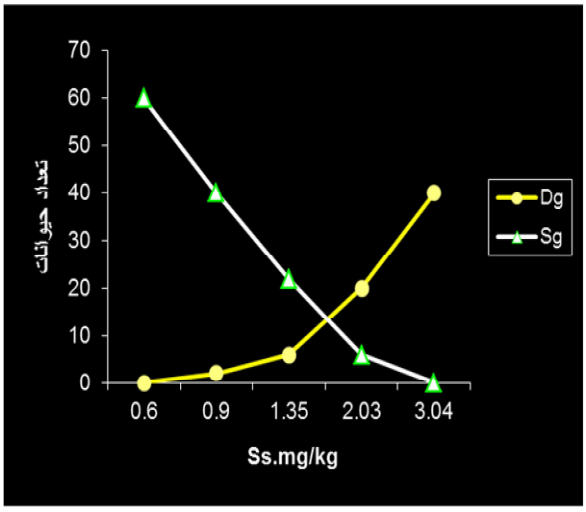
2- Dead groups: تعداد موش های مرده با این مقدار یا مقادیر بیشتر

تست، گروه کنترل مثبت 10 mg/kg مورفین را به روش داخل صفاقی (در نرمال سالین حل شد) دریافت می کنند. تزریقات درون صفاقی 15 دقیقه بعد از قرارگیری حیوان در زیر قیف شیشه ای روی جعبه ی درد (این جعبه ی با ابعاد 30x30x30 بوده و به منظور مشاهده بهتر حرکات موش، آیینه ای با زاویه ی 45 درجه زیر آن و رو به روی مشاهده ی کننده قرار می گیرد)، صورت می گیرند (27). بلافاصله پس از تزریق عصاره، حیوان برای سازگاری با محفظه ی آزمایش به مدت 30 دقیقه در زیر قیف قرار می گیرد. سپس 0/02 ml فرمالین (خریداری شده از شرکت Romil انگلیس) 2/5 درصد به زیر پوست کف پای راست حیوان به صورت زیر جلدی تزریق می شود و حیوان مجدداً به داخل جعبه مخصوص تست برگردانده شده، حرکات حیوان در این مرحله طی دو فاز بررسی می گردد. هنگامی که حیوان پای راست را لیسیده، جویده یا به شدت تکان می داد به عنوان زمان لیسیدن در نظر گرفته می شود. میانگین زمان لیسیدن در فاصله ی زمانی بین 5-0 دقیقه به عنوان فاز اول درد و میانگین دقایق 30-15 به عنوان فاز دوم یا محیطی تست فرمالین در نظر گرفته می شود (حجم تزریقات داروها و عصاره ها تا 0/1 ml بود) (28).

آنالیز داده ها: در هر گروه از آزمایش ها، اثر دوزهای مختلف به صورت میانگین ± انحراف معیار در 8 موش ثبت گردید. انتخاب داده ها به صورت کاملاً تصادفی صورت گرفت. جهت تعیین وجود اختلاف معنی دار میان گروه هایی که غلظت های متفاوت عصاره را دریافت کرده بودند، با گروه های کنترل مثبت، از آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن از تست توکی استفاده و اختلاف با $p> 0/001$ به عنوان مرز استنتاج آماری در نظر گرفته شد. برای رسم نمودارها نیز از برنامه های Excel و Word 2003 استفاده شد، پس از اتمام آزمایش ها موش ها به روش قطع نخاع کشته شدند (29).

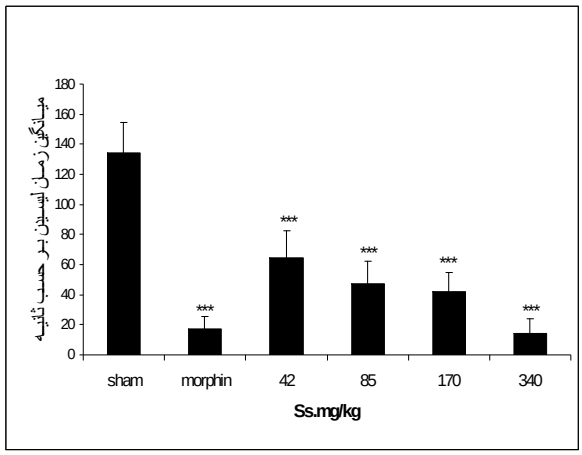
یافته ها

میزان LD_{50} عصاره ی هیدروالکلی دانه ی گیاه گنده تلخه 1/7 گرم بر کیلوگرم وزن حیوان محاسبه گردید (نمودار 1) که با استفاده از آن دوزهای تزریقی عصاره ی 42mg/kg، ۸۵،۱۷۰،۳۴۰ در نظر گرفته شدند. با توجه به اینکه عصاره ی دانه گیاه دارای اثر کاهش فشار و قند خون است، از تزریق عصاره ی بالاتر از دوز 340 میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش خودداری شد، زیرا سبب کند شدن حرکات موش و تکرر ادرار می شد، از طرف دیگر به علت نزدیک شدن دوزهای بالاتر از 340 میلی گرم بر کیلوگرم به دوزهایی که سبب مرگ حیوانات می شد، دوزهای بالاتر عصاره را بررسی نکردیم.



نمودار1: تعیین میزان دوز کشنده بر حسب مقدار Sg و Dg

اثرات ضد التهابی: بررسی نتایج تست التهاب نشان داد که عصاره در مقایسه با گروه شاهد سبب کاهش معنی دار التهاب ($p<0/001$) در دوزهای 42mg/kg، 85، 170و340 می شود. بین گروه دریافت کننده دگزامتازون و گروه دریافت کننده ی دوز 340 mg/kg عصاره، تفاوت معنی دار وجود نداشت. با افزایش میزان دوز عصاره، خاصیت ضد التهابی آن بیشتر شد. بنابراین دوز 340 mg/kg اثر قابل ملاحظه ای نزدیک به اثر دگزامتازون بر کاهش التهاب ناشی از گزیلن دارد (نمودار 2).



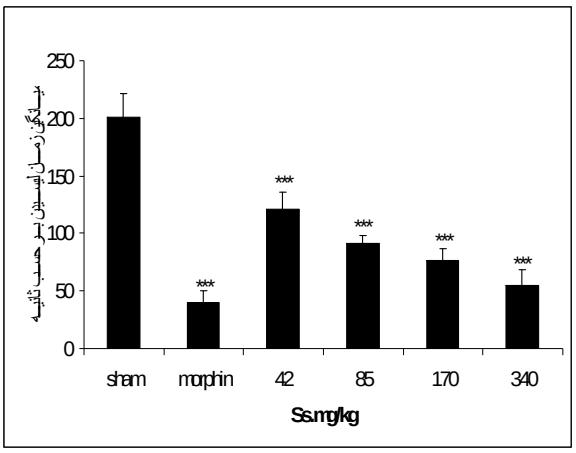
p<0/001 *** تفاوت با گروه شاهد

نمودار 2: نتایج حاصل از تزریق داخل صفاقی عصاره ی تام دانه گیاه گنده تلخه (Ss.) بر التهاب با استفاده از تست گزیلن در مقایسه با گروه شاهد (کنترل منفی).

نمودار 2 بر اساس میانگین و انحراف معیار رسم گردیده است. همان طور که در نمودار مشاهده می شود کمترین میانگین اختلاف وزن مربوط به گروه کنترل مثبت (دگزامتازون) و بیشترین میانگین اختلاف وزن مربوط به گروه کنترل منفی (نرمال سالین) می باشد. در گروه های آزمایش کمترین اختلاف وزن مربوط به دوز 340 میلی گرم است. بنابراین، دوز مذکور اثر ضد التهابی قابل ملاحظه ای نزدیک به اثر دگزامتازون دارد.

اثرات ضد دردی: در فاز اول تست فرمالین (فاز حاد درد) تمامی دوزها در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی دار درد را نشان دادند (p<0/001) (نمودار 3). در فاز دوم تست فرمالین (فاز مزمن درد)، تمامی دوزها به جز دوز 42 mg/kg در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی دار درد را نشان دادند (p<0/001) (نمودار 4).

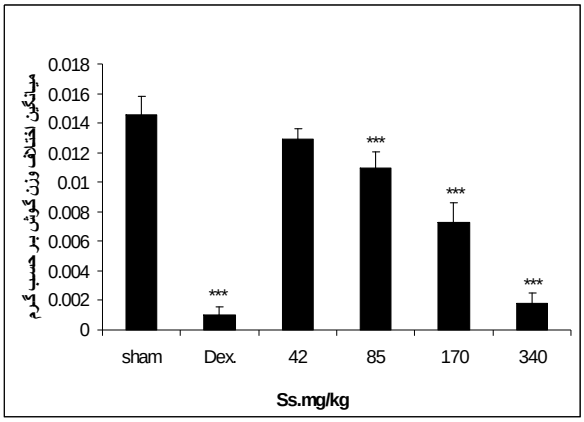
بر اساس تست توکی در این فاز دوزهای 340 mg/kg، 170 و گروه دریافت کننده ی مورفین، تفاوت معنی دار با هم نداشته، به این معنی که اثر ضد دردی مشابهی در این فاز از خود نشان دادند (نمودار 3و4). در هر دو فاز درد، با افزایش میزان دوز تزریقی، اثر ضد دردی عصاره نیز افزایش یافت، بنابراین دوز 340 مؤثرترین دوز با اثر ضد دردی می باشد.



p<0/001*** تفاوت با گروه شاهد

نمودار 3: :نتایج حاصل از تزریق داخل صفاقی عصاره تام دانه گیاه گنده تلخه (Ss.) بر درد حاد (0-5 دقیقه) با استفاده از تست فرمالین در مقایسه با گروه شاهد (کنترل منفی).

نمودار 3 براساس میانگین و انحراف معیار رسم گردیده است. همان طور که در نمودار دیده می شود، میانگین زمان لیسیدن برای گروه کنترل مثبت (مورفین)کمترین مقدار و برای گروه کنترل منفی (شاهد) بیشترین مقدار است. بر اساس تست توکی بیشترین اثر ضد دردی عصاره ی دانه در فاز حاد تست فرمالین، مربوط به دوز 340 mg/kg است. نمودار 4 براساس میانگین و انحراف معیار رسم گردیده است. همان طور که در نمودار دیده می شود کمترین زمان لیسیدن در این فاز مربوط به دوز 340 میلی گرم از گروه تجربی و بیشترین زمان مربوط به گروه کنترل منفی (شاهد) می باشد.



p<0/001*** تفاوت با گروه شاهد

نمودار 4: نتایج حاصل از تزریق داخل صفاقی عصاره تام دانه گیاه گنده تلخه (Ss.) بر درد مزمن (15-30 دقیقه) با استفاده از تست فرمالین در مقایسه با گروه شاهد (کنترل منفی).

بحث

پـژوهش حاضـر نشـان داد کـه عصـاره ی هیـدروالکلی دانه ی گیاه گنده تلخه دارای اثـر ضـددردی و ضـد التهـابی می باشد و احتمالاً بخش عمـده ای از آثـار ضـد دردی آن از مهـار التهـاب (مرحلـه ی دوم درد) ناشـی مـی شـود (زیـرا عصاره ی گیاه در مهار درد التهابی مؤثرتر اسـت). بـه عـلاوه، عصاره ی هیدروالکلی دانه ی گیاه دارای خاصـیت ضـددردی مؤثرتری نسبت به مورفین در فاز دوم تست فرمالین بود.

گیاه گنده تلخـه متعلـق بـه راسـته فابـالس (حبوبـات) و خـانواده ی پاپیلیوناسـه (فاباسـه) اسـت (5). بـه علـت وجـود ترکیبـات ضـد دردی و ضـد التهـابی در برخـی از گونـه هـای خانواده ی پاپیلیوناسه، امکان وجود این ترکیبات در گیاه گنده تلخه نیز می باشد. به همین دلیل به بررسی اثـرات ضـد دردی و ضد التهابی در گیاه گنـده تلخـه پـرداختیم. در طـب سـنتی ترکیه از برخی گونه های شبدر[1] (متعلق به خانواده ی فاباسـه) به عنوان داروی ضد درد اسـتفاده مـی شـود (30). همچنـین عصاره ی شبدر قرمز[2] (خانواده ی فاباسه) از طریق مهار فعال شدن و تکثیر لنفوسیت ها و هم چنین از طریق مهـار ترشـح نیتریک اکساید (NO) از ماکروفاژها، فعالیت ضد التهابی خود را القا می کند (31).

مکمل های غـذایی شـبدر قرمـز دارای 4 ایزوفلاونوئیـد (Daidzein, Genistein, Formononetin and Biochanin) هستند که سبب مهار فعالیت سیکلواکسیژناز در مونوسیت هـای انسانی می شود. هم چنین سبب کاهش سنتز پروستاگلندین E و یا ترومبوکسان B_2 می شوند که نشان دهنـده ی مهـار آنـزیم سـیکلو اکسـیژناز اسـت (32). پوسـته ی بـاقلا (*Phaseolus vulgaris* L.) (خـانواده ی فاباسـه) دارای خاصیت ضد التهابی است (33). عصـاره ی جوانـه ی یونجـه (*Medicago sativa* L.) *Alfalfa sprout* (خـانواده ی فاباسه) سبب سرکوب تولید سیتوکین های پـیش التهـابی و در نتیجه کاهش خطرات حاد التهابی می شود (34).

فلاونوئیدها ترکیبات پلی فنل طبیعی موجـود در گیاهـان می باشند که دارای خواص ضد دردی و ضد التهـابی هسـتند (35). فلاونوئیدها یکی از مهارکننده های آنزیم سنتز کننده ی نیتریک اکساید به شمار می روند و مانع تولید NO مـی شـوند که به دنبال تزریق فرمالین افزایش می یابـد، بنـابراین کـاهش آن منجر به فعالیت ضد دردی می شود (36). سـایر مطالعـات نشان می دهند که فلاونوئید ها با مهـار فعالیـت گیرنـده هـای N- متیل- D- آسپارتات سبب کاهش کلسـیم داخـل سـلولی می شوند و به دنبال آن فعالیت آنزیم سنتز کننده ی نیتریـک اکساید و فسفولیپاز A_2 وابسته به کلسیم کاهش می یابـد و در نتیجـه بـا کـاهش NO و پروسـتاگلاندین هـا اثـرات ضد دردی خود را نشان می دهند (37,38). با توجه به شـواهد موجـود، فلاونوئیـدها بـا مهـار آنـزیم سـیکلو اکسـیژناز تولیـد پروسـتاگلاندین E را از اسـید آراشـیدونیک در پاسـخ بـه محرک های التهابی مهار مـی کننـد (39). در مکانیسـم هـای سلولی التهاب نوروژنیک، از انتهای نورون هـای حسـی مـوادی آزاد می شوند که شامل نوروپپتیدها و مـاده ی p مـی باشـند. این مواد آغازکننده های اصلی التهاب هستند (40). علت مهـار درد در فاز مزمن توسط داروهای ضد التهابی این است که ایـن داروها با بلوکه کردن سنتز پروستاگلندین ها از پر دردی ناشی از التهاب جلوگیری می کنند (41). با توجه به این کـه التهـاب به عنوان یـک فرآینـد محیطـی مولـد درد در تسـت فرمـالین شناخته شده است (3). بنابراین احتمال می رود بخشـی از اثـر ضد دردی این عصاره از آثار ضد التهابی آن ناشی شود. با توجه به وجود فلاونوئیدها و هم چنین شناسایی اثـرات ضـد دردی و ضد التهابی، در گونه های هم خانواده گیاه گنده تلخه (فاباسـه) و هـم چنـین بـا توجـه بـه ترکیبـات فلاونوئیـدی فـراوان در عصاره ی آبی و اتانولی دانه ی گیاه گنده تلخه تصور می شـود کـه اثر ضد التهابی و ضد دردی این گیاه که در این تحقیـق بررسـی و اثبات شد، بـه دلیـل وجـود فلاونوئیـد در دانـه هـای گیـاه باشـد.

نتیجه گیری

بـر اسـاس یافتـه هـای حاصـل از ایـن تحقیـق، عصـاره ی هیدروالکلی تام دانه ی گیاه گنده تلخه موجـب کـاهش معنـی دار درد در آزمون فرمالین (مرحله ی حاد و مزمن) در مقایسه با گـروه شـاهد شـد. هـم چنـین عصـاره ی دانـه ی ایـن گیـاه دارای اثـر ضد التهابی بارزی بود که نزدیک بـه اثـر دگزامتـازون مـی باشـد. خاصیت ضد دردی و ضد التهابی گیاه را می توان به وجود ترکیبات

1- Trifolium
2- Red cloverextract-RCE

فلاونوئیدی موجود در دانه ی آن نسبت داد. جهت تعیین مکانیزم های ضد دردی و ضد التهابی و تأثیر ترکیبات موجود در این عصاره بر درد و التهاب، نیاز به پژوهش بیشتری است. از جمله می توان با استفاده از مهار کننده های آنزیم سیکلواکسیژناز و مهار تولید پروستاگلندین ها اثبات کرد که آیا عصاره ی مذکور از طریق تولید پروستاگلندین ها عمل می کند یا خیر.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه مسؤولین و کارکنان مجتمع علوم پایه و کشاورزی دانشگاه پیام نور استان تهران و همچنین تکنسین هرباریوم گروه فارماکوگنوزی دانشگاه تهران جناب آقای بدرخانی که ما را در انجام پژوهش حاضر یاری کردند، تشکر می نماییم.

References:

1- Nunhuck A, Shahid M. Physiology of the nervous system. Crash course. Louis Missouri: Mosby; 2008: 42- 43.

2- Bedayat B. Aspirin and other non steroidal anti-inflammatory drugs. Tehran: Taymorzadeh; 2006: 10-32. [In Persian]

3- Elisabetsky E, Ammador TA, Albuquerque RR, Nunes DS, Carvalho Ado C. Analgesic activity of psychotria colorata (Wild ex R.&S.) Muell, Argalkaloids. J Ethnopharmaco 1995; 48(2): 77-83.

4- Katzung G B, Masters B S, Trevor J A. Basic and clinical pharmacology. USA: Lang; 2007: 150.

5- Ghahraman A. Iranian chormofits. V 1. Tehran: Academic Publication Center; 1994: 191. [In Persian]

6- Amin Gh. The most common traditional herbal plants of Iran. Tehran: ethics and history of medicine research center; 2005: 240. [In Persian]

7- Johar M, Yasa N, Amin Gh. Pharmacology faculty: Phytochemical investigation of Securigera Securidaca [Thesis]. Tehran: Tehran University; 1987. [In Persian]

8- Zatula V V, Kovalev I P, Kalashnikov D G. The structure of securigenin and securigenon. Chemistry of natural compounds 1969; 2(5): 127-128.

9- Hosseinzadeh H, Ramezani M, Danaei AR. Antihyperglycaemic effect and acute toxicity of securigera securidaca L. Seed extracts in mice. Phytoth Res 2002; 16(8): 745-747. [In Persian]

10- Porchezhian E, Ansari Sh. Effect of securigera securidaca on blood glucose levels of normal and alloxan-induced diabetic rats. Pharmaceutical Biology 2001; 39(1): 62-64.

11- Ali A A, Mohammed M H, Kamel M S, Fouad M A, Spring O. Studies on Securigera securidaca (L.) Deg. Et Dorfl. (Fabaceae) seeds, an antidiabetic egyption folk medicine. Pharmazie 1998: 53(10): 710-715.

12- Gheytasi I, Nikbakht MR, Sadeghi H, Sabzali V, Sabzali S, Shahrani M. The hypoglycemic effect of a hydro-alcoholic extract from Securigera securidaca seeds on induced diabetic in male rats. Shahrekord Univercity of Medical Sciences Journal 2007; 8(4): 68-73. [In Persian]

13- Azarmi Y, Zakheri A. The effect of total extract of Securigera securidaca L. seed on Thoracic aorta function high-fat fed. Pharmacutical Sciences 2009; 15(1): 83-92. [In Persian]

14- Mard SA, Bahari Z, Eshaghi N, Farbood Y. Antiulcerogenic effect of Securigera securidaca L. seed extract on various experimental gastric ulcer models in rats. Pak J Biol Sci 2008; 11(23): 2619-23.

15- Zahedi-Asl S, Marahel H, Zare B. Study on the effect of chloroformic extract of Securigera securidaca on serum glucose level and liver glycogen content of mice. Journal of Kerman University of medical sciences 2005; 12(1): 32-38. [In Persian]

16- Hajhashemi V, Abbasi N. Hypolipidemic activity of Anethum graveolens in rats. Phytoth Res 2007; 22(3): 375-372. [In Persian]

17- Samsaam Sh H. Extraction and exploitation of herbal plant effective components and methods of their recognition. 2nd ed. Tehran: Mani; 2007: 10-20. [In Persian]

18- Nasri S, Oryan SH, Rohani AH, Amin GHR, Yahyavi H. The effects of vitex agnus castus L. extract on gonadotrophines and testosterone in male mice. Iranian International Journal of Science 2004; 5(1): 25-31. [In Persian]

19- Hosseinzadeh H, Younesi MH. Antinociceptive and antiinflammatory effects of crocus sativus L. stigma and petal extracts in mice. BMC Pharmacology 2002; 2(7): 1-8.

20- Ramezani M, Nasri S, Yassa N. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of isolated fractions from Apium graveolens seeds in mice. Parmaceutical biology 2009; 47(8): 740-743.

21- Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, mepridine and brain stem stimulation in rat and cats. Pain 1977; 4(2): 161-174.

22- Shibata M, Okhubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. Pain 1989; 38(3): 347-352.

23- Hunskaar S, Hol K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. Pain 1987; 30(1): 103-114.

24- Abbott F V, Franklin K B, Westbrook R F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. Pain 1995; 60(1): 91-102.

25- Tjolsen A, Berge O-G, Hunskaar S, Rosland H J, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. Pain 1992; 51(1): 5-17.

26- Chapman V H, Dickenson A. The spinal and peripheral roles of bradykinin and prostaglandins in nociceptive processing in the rat. European Journal of Pharmacology 1992; 219(3-4): 427-433.

27- Sadeghi H, Ghaitasi I, Mazrooghi N, Sabzali S. The Hepatoprotective effects of Dorema auchri on carbon tetrachelorid induced liver toxicity in rats. Shahrekord Medical Sciences University Journal 2007; 6(1): 38-43. [In Persian]

28- Alreja M, Mutalik P, Nayar U, Manchanda S K. The formalin test: a tonic pain model in the primate. Pain 1984; 20(1): 97-105.

29- Zare Z, Eimani H, Mohammadi M. The effect of orally administered L- carnitine on testis tissue, sperm parameters and daily sperm production in adult mice. Yakhteh Med J 2010; 11(4): 382-389. [In Persian]

30- Sabudak T, Guler N, Trifolium L. A review on its phytochemical and pharmacological profile. Phytoth Res 2008; 23 (3): 439–446.

31- Huang XY, Zeng YY, Yang Z. Effects of red clover extract on the activation and proliferation of mouse T lymphocytes and the NO secretion of mouse macrophages. Yao Xue Bao 2008; 43(10): 1019-24.

32- Lam AN, Demasi M, James MJ, Husband AJ, Walker C. The effect of red clover isoflavones on cox-2 activity in murine and human monocyte/macrophage cells. Nutr Cancer 2004; 49(1): 89-93.

33- Oomah BD, Corbe A, Balasubramanian P. Antioxidant and anti-inflammatory activities of bean (Phaseolus vulgaris L) hulls. J Agric Food Chem 2010; 58(14): 8225-30.

34- Hong Y H, Chao W W, Chen M L, Lin B F. Ethyl acetate extracts of alfalfa (Medicago sativa L) sprouts inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. J Biomed Sci 2009; 16: 64.

35- Balasubramanian S, Zhu L, Eckert R. Apigenine inhibition of involucrin gene expression is associated with a specific reduction in phosphorylation of protein kinas C Tyr 311. J Biol Chem 2006; 281(47): 36162-72.

36- Mehmet O, Yagiz U, Mehmet G. Comparison of the effects of specific and nonspecific inhibition of nitric oxide synthase on morphine analgesia, tolerance and dependence in mice. Life Sci 2003; 72(17): 1943-51.

37- Rang HO, Date MM, Ritter JM. Text book of pharmacology, 3rd ed. New York: Churchill & Livingstone; 1999: 148-76, 609-33.

38- Davidson EM, Coggeshal RE, Carlton SM. Peripheral NMDA and non-NMDA glutamate receptors contribute to nociceptive behaviors in the rat formalin test. Neuroreport 1997; 8(4): 641-6.

39- Kupeli E, Tatli LL, Akdemir ZS, Yesilada E. Estimation of antinociceptive and anti-inflammatory activity *Geranium pretense* subsp. finitinum and its phenolic compounds. J Ethno pharmacology 2007; 114(2): 234-40.

40- Richardson JD, Vasko MR. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. J Pharmcol Exp Ther 2002; 302(3): 839-45.

41- Zeashan H, Amresh G, Venkateswara Rao C, Singh S. Antinociceptive activity of amaranthus spinosus in experimental animals. J Ethnopharmacol 2009; 122(3): 492-6.

Investigation of Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of Hydro-alcoholic Extract of Securigera Securidaca L.

Fahimeh Hoodgar[1], Sima Nasri[2] and Gholamreza Amin[3]

Abstract

Background and Aim: The application of herbal plants instead of synthetic drugs is increasing in recent years because of their lower side-effects and high varieties of efficient components. The study of anti-inflammatory and antinociceptive effects of hydroalcoholic extract of *Securigera securidaca* L. seems to be necessary due to the existence of its anti-inflammatory and antinociceptive components.

Materials and Methods: This study has been done on 156 NMRI male mice of 20-25 g in weight. After determining Lethal dose (LD50) of the extract, we used Xylene-induced ear edema and Formalin Test for demonstrating its anti-inflammatory and antinociceptive effects. In each of these two tests, the animals were divided into 6 groups (each group consisting of 8 mice): Sham, Positive Control (receiving dexamethasone at dose of 15 mg/kg in inflammatory test, and receiving morphine at dose of 10 mg/kg in formalin test), experimental groups receiving hydroalchoholic extract at doses of 42, 85, 170 and 340 mg/kg.

Results: LD50 was obtained 1.7 gr/kg. This study shows that the seed of *Securigera securidaca* L. has anti-inflammatory effect at all doses, particularly at dose of 340 mg/kg. In addition, the extract decreased nociception meaningfully in both acute and chronic phases. Dose of 340 mg/kg had the most antinociceptive effect especially in chronic phase.

Conclusion: The hydroalcoholic extract of *Securigera securidaca* L. has antinociceptive and anti-inflammatory effect in both phases (especially inflammatory phase) which is caused by formalin, and this effect may be flavonoid and tannin components in plants, which have anti-inflammation and antinociceptive properties. Flavonoid and tannin components in this plant may be the reason of these effects.

Keywords: Anti-inflammation, anti-nociception, lethal dose, male mice, seed of *Securigera securidaca*

Ofogh-e-Danesh. GMUHS Journal. 2011; Vol. 17, No. 2

1- MSc, Department of Biology, Faculty of Science, Payam-e Noor University of Tehran, Tehran, Iran

2- **Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Payam-e Noor University of Tehran, Tehran, Iran.

Tel: +98 21 88907265 **Fax:** +98 21 88913475 **E-mail:** s_nasri2000@yahoo.com

3- Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran