بررسی اثرات ضددردی و ضدالتهابی عصاره الکلی برگ اسفناج (*Spinacia oleraceal*) در موش کوچک آزمایشگاهی NMRI

سمیه میرعزیزی[۱]، غلامحسن واعظی[۲*]، علی حائری روحانی[۱]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

* مسئول مکاتبات: gh.vaezi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۳

چکیده

طبق تحقیقات انجام شده، عصاره اسفناج اثرات فارماکولوژیکی متنوعی از قبیل ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضداضطرابی دارد. مطالعه حاضر به بررسی اثر ضددردی و ضدالتهابی عصاره اتانولی برگ اسفناج در موش کوچک آزمایشگاهی نر بالغ با استفاده از آزمون فرمالین، صفحه داغ وآزمون زایلن می‌پردازد. در این پژوهش که روی ۳۶ موش کوچک آزمایشگاهی نر بالغ نژاد NMRI با وزن ۲۵ تا۳۰ گرم انجام شد، حیوانات به طور تصادفی به ۶ گروه ۶تایی شامل: گروه کنترل (سالم)، گروه شاهد (دریافت‌کننده نرمال سالین) و همچنین سه گروه دریافت‌کننده دوزهای ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره اتانولی برگ اسفناج وگروه استاندارد (دریافت‌کننده دگزامتازون با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم یا مورفین با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تقسیم شدند. پس از انجام تیمار حیوانات به وسیله آزمون فرمالین و هات پلیت از نظر واکنش به درد، مورد بررسی قرار گرفتند. همچنن فعالیت ضدالتهابی توسط آزمون زایلن یا التهاب گوش در حیوان بررسی گردید. تمامی داده‌ها از نظر آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و سپس آزمون توکی مقایسه و بررسی شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره اتانولی برگ اسفناج موجب کاهش معنی‌دار درد در فاز مزمن تست فرمالین و تست صفحه داغ می‌شود. همچنین عصاره اتانولی برگ اسفناج درآزمون ادم گوش دارای فعالیت معنادار ضدالتهابی است. تحقیق حاضر نشان داد عصاره اتانولی برگ اسفناج دارای خواص ضددردی و ضدالتهابی در موش کوچک آزمایشگاهی است.

کلمات کلیدی: ضدالتهاب، ضددردی، عصاره الکلی برگ اسفناج، موش کوچک آزمایشگاهی.

مقدمه

درد یک تجربه حسی است که به‌وسیله پاسخ‌های انگیزشی و تطابق‌های حرکتی اوتونومی و پیکری همراه است. درد به هنگام وقوع آسیب بافتی ایجاد شده و باعث می‌شود فرد واکنشی جهت حذف محرک دردآور انجام دهد (۱). سه نوع محرک مکانیکی، حرارتی و شیمیایی، رسپتورهای درد را تحریک می‌کنند. مکانیسم هدایت درد در اثر فعال شدن کانال‌های کاتیونی در پایانه آزاد عصبی یا به طور مستقیم توسط محرک دردزا و یا به طور غیرمستقیم توسط آزادسازی ترکیباتی مانند ماده P پروستاگلاندین، برادی کینین، سروتونین و هیستامین که در اثر آسیب بافتی رخ می‌دهد (۷). درد به دو نوع عمده درد سریع و آهسته تقسیم می‌شود. احساس درد شدید فیبرهای A دلتا را تحریک می‌کند در حالی که

احساس درد ملایم، باعث تحریک فیبرهای نوع C می‌شود (۲۳).

در حال حاضر کنترل درد با استفاده از داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی و داروهای ضددردی اوپیوئیدی انجام می‌گیرد، مصرف این داروها عوارض جانبی متعددی به همراه دارند. بنابراین تحقیق برای دستیابی به ترکیبات ضددرد با عوارض کمتر، ضروری به نظر می‌رسد (۱۵).

التهاب یک مکانیسم پیچیده، هومئوستاتیک است که برای حفاظت از سلامتی موجود زنده در مقابل عوامل مضر اگزوژنی و اندوژنی به کار می‌رود. عوامل مشارکت‌کننده در التهاب، سلول‌ها و فاکتورهای محلول هستند. عوامل ضدالتهاب در درمان واکنش‌های پاتولوژیکی مؤثر است. اثر بیشتر عوامل ضدالتهابی به دلیل توانایی آنها در مهار تشکیل پروستاگلاندین‌ها به وسیله سیکلواکسیژناز است (۱٦).

اسفناج با نام علمی *Spinacia oleracea* یکی از سبزی‌های مهم خانواده چغندریان است. اسفناج بومی مناطق آسیا و به احتمال قوی ایران است (۱۳).

ترکیبات مؤثر در این گیاه عبارتند از: املاح کلسیم، سدیم، پتاسیم، مس، آرسنیک، منیزیم، آهن، لیسیتن، سکرتین، ساپونین (به خصوص در ریشه) پرووِیتامین و اسیدفولیک است (۳). همچنین اخیراً پپتیدهای اوپیوئیدی که به نام روبیسکولین در اسفناج یافت شده و این ترکیبات اثراتی مشابه اوپیوئید دارند و از این رو بر روی مغز تأثیر می‌گذارند (۱۱). از اسفناج به عنوان اشتهاآور، ملین و تسکین‌دهنده درد سر و کمر، ضدسرفه، رفع تشنج و تقویت اعصاب استفاده شده است. اسفناج در عین حال یکی از منابع غنی از فلاونوئیدها است. که از آنتی‌اکسیدان‌های قوی بوده و اعمال وسیع فارماکولوژیکی و بیوشیمیایی شامل: ضدالتهابی، ضدآلرژیک، ضدویروسی محافظت از سیستم اعصاب مرکزی ضدسرطان و ضدپیری دارد (٤). در برخی از مطالعات کلینیکی اکسیدان‌های موجود در اسفناج در بهبود فعالیت سیستم اعصاب مرکزی و مهار روند پیری مفید می‌باشد. اسفناج از طریق کاهش استرس اکسیداتیو می‌تواند باعث بهبود رفتارهای شبه‌اضطرابی شود (۲۹). همچنین در تحقیقاتی نشان داده شد که برگ پروتئین اسفناج در کاهش کلسترول خون در جانوران اثری زیاد دارد چرا که اسفناج موجب تبدیل کلسترول به کوپروستانول در بدن می‌شود که بعد از این ماده دفع می‌شود (۲۱).

به طور مشخص برای بررسی اثر ضددردی و ضدالتهابی برگ اسفناج با روش و آزمایش‌ها مورد استفاده در پژوهش حاضر پژوهشی صورت نگرفته است. بدین منظور بنا شده پژوهشی با هدف بررسی اثرات ضدالتهابی و ضددردی عصاره الکلی برگ اسفناج بر روی موش کوچک آزمایشگاهی انجام گیرد.

مواد و روش کار

تهیه عصاره: در این مطالعه تجربی، اسفناج خریداری شد و برای عصاره‌گیری ابتدا برگ اسفناج را خشک کرده و در آسیاب برقی در حد ملایم پودر شد. و سپس ۱۰۰ گرم از پودر حاصله را با الکل ۸۰ درجه مخلوط کرده و سپس روی دستگاه شیکر به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفته و بعد از آن با استفاده از پمپ خلاء محتویات داخل ظرف را صاف کرده و داخل بالن ریخته و در دستگاه روتاری در دمای ۷۵ درجه با دور متوسط قرار داده و بعد از خروج حلال مایع روتاری بر روی پلیت ریخته و داخل انکوباتور قرار داده شد تا خشک شود.

پس از خشک شدن پودر حاصله که حدود ۵۸/٦ درصد مایع غلیظ عصاره تشکیل می‌دهد. در ظرف دربسته و دور از نور نگهداری می‌کنیم از عصاره

خشک شده محلول‌هایی با دوز ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر گیلوگرم تهیه می‌کنیم (۲۲).

حیوانات آزمایشگاهی: در این مطالعه از موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر بالغ نژاد NMRI با محدوده وزن ۳۰-۲۵ گرم از انیستیو پاستور کرج خریداری شده و در شرایط آزمایشگاهی با درجه حرارت ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد و سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و نیز رطوبت نسبی ۴۰ تا ۶۰ درصد درون قفس‌های از جنس پلاکسی کلاس نگهداری شدند. در طول طرح موش‌ها دسترسی آزاد به غذای استاندارد وآب شهری سالم داشتند. تمامی مراحل آزمایش در آزمایشگاه تحقیقاتی فیزیولوژی جانوری دانشگاه علوم و تحقیقات تهران انجام شد و کلیه عملیات آزمایشگاهی روی حیوانات با رعایت مقررات بین‌المللی اخلاق علمی و حمایت از حیوانات آزمایشگاهی صورت پذیرفت.

معیار ورود نمونه‌ها در این پژوهش موش‌های سوری نر با وزن تقریبی ۳۰-۲۵ گرم از نژاد NMRI بوده که به صورت تصادفی به ۶ گروه تقسیم شده در نهایت ۳۶ سر موش در این آزمایش مورد بررسی قرار گرفتند. آزمایش التهابی زایلن و آزمایش ضددردی فرمالین و صفحه داغ بر روی آنها انجام شد. که در هر ۳ آزمایش گروه‌های زیر وجود داشتند.

گروه ۱ (کنترل): موش‌هایی که هیچ تیماری دریافت نمی‌کنند.

گروه ۲ (شاهد): دریافت‌کننده حلال (نرمال سالین) به صورت تزریق درون صفاقی

گروه ۳ (استاندارد): دریافت‌کننده دگزامتازون ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم یا مورفین با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تزریق به صورت درون صفاقی

گروه ٤، ٥ و ٦ (تجربی) دریافت‌کننده دوزهای ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره الکلی برگ اسفناج تزریق به صورت درون صفاقی انجام گرفت.

آزمون فرمالین: برای انجام این آزمایش، از جعبه شیشه‌ای استفاده می‌شود. این جعبه شیشه‌ای به ابعاد ۱۲×۳۰×۳۰ سانتی‌متر به صورتی ساخته شده که در فاصله‌ای از جعبه در سطح افق، آیینه‌ای با زاویه ٤٥ درجه قرار گرفته است تا مشاهدات را آسان‌تر کند. در روز آزمایش هر حیوان ۳۰ دقیقه قبل از شروع آزمایش در جعبه شیشه‌ای قرار داده شد تا به محیط عادت کند. ابتدا ۰/۲ میلی‌لیتر ماده مورد نظر به صورت درون صفاقی به حیوان تزریق شد و بعد از ۳۰ دقیقه فرمالین ۲/۵ به صورت زیرجلدی، به سطح پشتی پای راست حیوان تزریق شد. مدت زمانی که (برحسب ثانیه) صرف لیسیدن و گاز گرفتن پای تزریق می‌شود. در دوره‌ای زمانی ۵-۰ دقیقه (فاز حاد) و سپس ۳۰-۱۵ دقیقه (فاز مزمن) به عنوان شاخص درد اندازه‌گیری می‌شد و در هریک از دوره‌های زمانی در هر ۳۰ ثانیه امتیازی متناسب با حرکت غالب حیوان ثبت می‌شود. در تست فرمالین حیوانات پاسخ سریع و آهسته نسبت به درد نشان می‌دهند که ظاهراً دو مکانیسم مختلف دارد. پاسخ سریع به درد بلافاصله پس از تزریق فرمالین ایجاد می‌شود که به مدت ۵ دقیقه طول می‌کشد حیوان به مدت ۱۰ دقیقه رفتار خاصی نشان نداده و پس از ۱۵ دقیقه فاز دوم درد شروع می‌شود و حیوان دوباره شروع به لیسیدن کف پای عقبی و گاز گرفتن می‌کند و حدود ۳۰ دقیقه طول می‌کشد (۱۳). گروه‌های مورد بررسی در آزمون فرمالین شامل:

گروه ۱ (کنترل): موش‌هایی که هیچ‌گونه تیماری دریافت نکردند.

گروه ۲ (شاهد): موش‌هایی که ابتدا نرمال سالین (حلال عصاره) را دریافت کردند و سپس آزمون فرمالین بر روی آنها انجام شد.

گروه ۳ (گروه استاندارد): روش‌هایی که ابتدا مورفین (داروی استاندارد) را به میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم

وزن بدن دریافت نمودند و سپس آزمون فرمالین بر روی آنها انجام شد.

گروه ٤، ٥ و ٦ (تجربی) حیوانات گروه‌های تجربی با دوزهای ١٥٠، ٣٠٠ و ٦٠٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره دریافت نمودند وسپس آزمون فرمالین بر روی آنها انجام شد.

نحوه امتیازدهی در آزمون فرمالین به قرار زیر است:

امتیاز صفر: حیوان بر روی دو پنجه روی کف جعبه قرار گرفته است. وزن حیوان به طور مساوی روی دو پا قرار دارد. در واقع حیوان عکس‌العمل غیرطبیعی ندارد.

امتیاز یک: پای تزریق شده به آرامی روی کف یا بخشی از بدن حیوان قرار گرفته و فشار کمی روی آن اعمال می‌شود. حین حرکت لنگیدن به طور واضح دیده می‌شود.

امتیاز دو: پای تزریق شده کاملاً از کف جعبه برداشته می‌شود و تماس با سطح ندارد. پای مقابل محکم روی سطح قرار گرفته است.

امتیاز سه: حیوان پای تزریق شده را لیس می‌زند. گاز می‌گیرد یا به شدت می‌لرزاند. این حرکت به طور مشخصی با حرکات حیوان برای تمیز کردن خودش متفاوت است (٨).

آزمون صفحه داغ: در ابتدا این آزمون موش‌ها با ماده مورد نظر به حجم ٠/٢ میلی‌لیتر به صورت درون صفاقی تیمار شدند. موش‌ها بلافاصله بعد از تزریق در دقیقه ٠ و نیز در دقایق ٦٠، ٤٥، ٣٠ و ١٥ بر روی صفحه داغ با دمای ٥٦ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. و زمان واکنش بر روی صفحه داغ اندازه‌گیری شد. عکس‌العمل حیوان شامل: پریدن، لیسیدن یا لرزاندن یکی از پنجه‌های عقبی یا جلویی می‌باشد (١٧). در این آزمایش حیوانات در ٦ گروه شش‌تایی قرار گرفتند. حیوانات گروه‌های تجربی با دوز ١٥٠، ٣٠٠ و ٦٠٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره برگ اسفناج تیمار شدند. گروه ١ (کنترل): هیچ‌گونه تیماری دریافت نکردند. گروه ٢ (شاهد): موش‌هایی که ابتدا نرمال سالین (حلال عصاره) را دریافت کردند و سپس بر روی صفحه داغ قرار گرفتند.

گروه ٣ (گروه استاندارد): موش‌هایی که ابتدا مورفین (داروی استاندارد) را به میزان ١٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند و سپس بر روی صفحه داغ قرار گرفتند.

گروه ٤، ٥ و ٦ (تجربی): موش‌هایی که ابتدا عصاره برگ اسفناج را با دوزهای ١٥٠، ٣٠٠ و ٦٠٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند و سپس بر روی صفحه داغ قرار گرفتند.

آزمون التهاب گوش (زایلن): برای انجام این آزمون ابتدا موش‌ها با ماده مورد نظر به میزان ٠/٢ میلی‌لیتر به صورت درون صفاقی تیمار شدند. پس از گذشت ٣٠ دقیقه از تزریق درون صفاقی برای بیهوش کردن موش میزان ٠/٠٦ میلی‌لیتر کتامین به صورت درون صفاقی تزریق شد و پس از بیهوش شدن موش‌ها به میزان ٠/٠٣ میلی‌لیتر زایلن به سطح پشتی و میانی گوش سمت راست تزریق شد. دو ساعت بعد موش‌ها به وسیله کلروفرم کشته شدند. سپس هر دو گوش حیوان را جدا کرده و برش‌های ٧ میلی‌متری از دو گوش چپ و راست گرفته و قطعات با استفاده از ترازوی دیجیتالی وزن گردید. اختلاف وزن بین گوش راست و چپ هر موش به عنوان میزان التهاب ارزیابی می‌شود. زیرا تزریق زایلن باعث ادم و در نتیجه افزایش وزن گوش راست و در نتیجه التهاب می‌گردد (١٨). در آزمون زایلن حیوانات در ٦ گروه شش‌تایی زیر قرار گرفتند:

گروه ١ (کنترل): هیچ‌گونه تیماری دریافت نکردند.

گروه ٢ (شاهد): موش‌هایی که ابتدا سرم فیزیولوژیک (حلال عصاره) را به صورت درون صفاقی دریافت کردند و بعد تست زایلن روی آنها انجام شد.

گروه ۳ (استاندارد): موش‌هایی که ابتدا دگزامتازون (داروی استاندارد) را با میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند و سپس تست زایلن روی آنها انجام شد.

گروه ٤، ٥ و ٦ (تجربی): موش‌هایی که ابتدا عصاره برگ اسفناج را با دوزهای ۱۵۰، ۳۰۰ و ٦۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند و سپس تست زایلن روی آنها انجام شد.

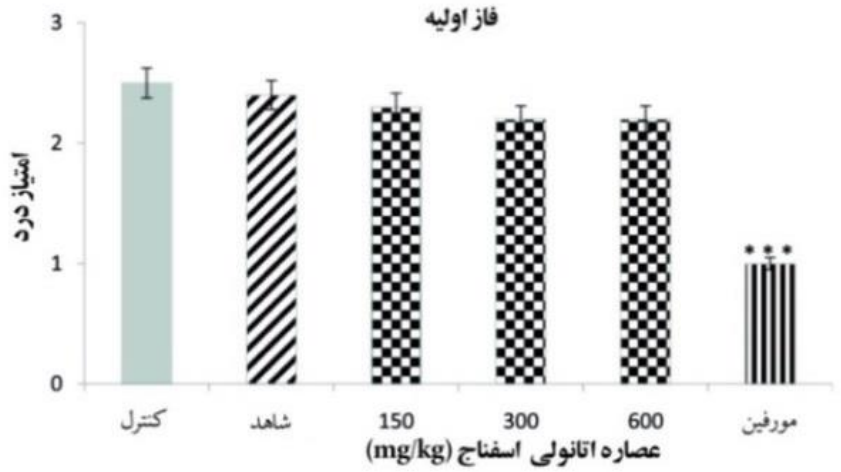
تحلیل آماری: در هر گروه از آزمایش‌ها، اثر دوزهای مختلف به صورت میانگین ± انحراف معیار ثبت گردید. به منظور تعیین تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها، از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تکمیلی توکی استفاده شد. سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته و محاسبات آماری با نرم‌افزار SPSS انجام شد.

نتایج

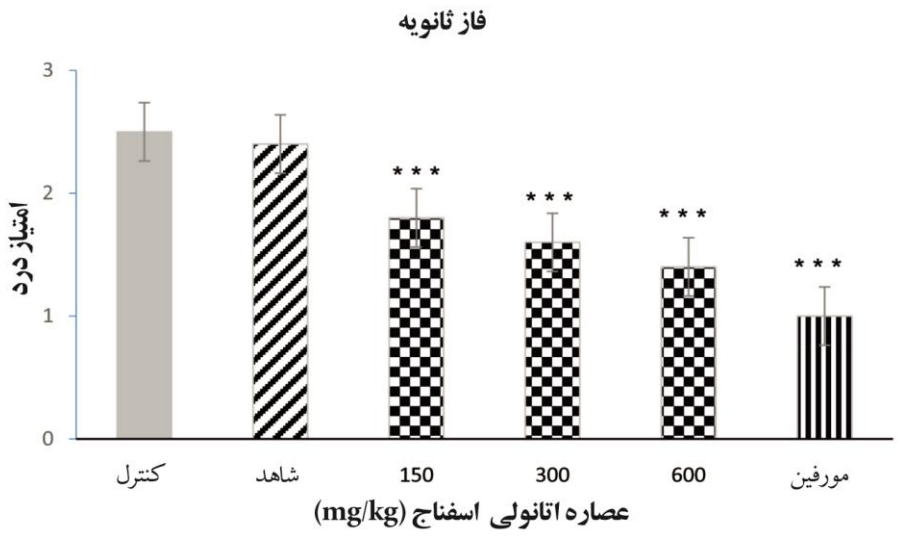
تزریق درون صفاقی عصاره الکلی برگ اسفناج در دوز ۱۵۰، ۳۰۰ و ٦۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب کاهش معنی‌داری در درد القاء شده در فاز اولیه آزمون فرمالین ایجاد نکرده در صورتی که مورفین در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب کاهش معنی‌داری در درد القاء شده در فاز اولیه آزمون فرمالین در مقایسه با گروه شاهد شد (نمودار ۱). تزریق درون صفاقی عصاره الکلی برگ اسفناج در دوز ۱۵۰، ۳۰۰ و ٦۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب کاهش معنی‌داری درد القاء شده در فاز ثانویه آزمون فرمالین شد. مورفین نیز در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب کاهش معنی‌دار درد القاء شده در فاز ثانویه آزمون فرمالین شد (نمودار ۲).

معنی‌داری در درد القاء شده در آزمون صفحه داغ شد. مورفین در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب کاهش معنی‌داری درد القا شده در آزمون صفحه شد (نمودار۳).

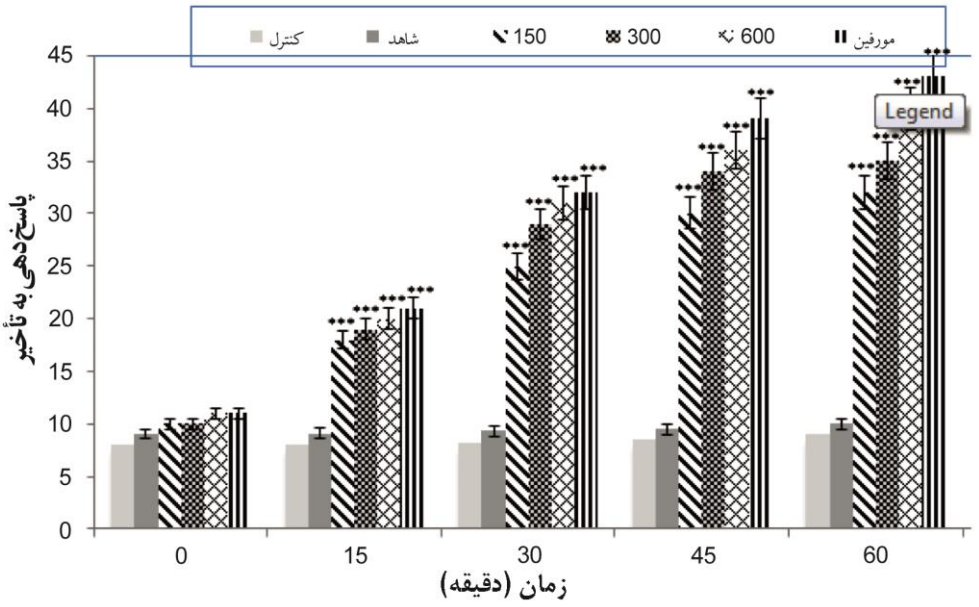
تزریق درون صفاقی عصاره الکلی برگ اسفناج در دوزهای ۱۵۰، ۳۰۰ و ٦۰۰ میلی‌گرم بر کیلو گرم وزن بدن و دگزامتازون در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب کاهش معنی‌داری بر التهاب القاء شده در آزمون زایلن در موش نر بالغ شد. همچنین تحقیق حاضر نشان داده که تزریق عصاره برگ اسفناج در دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تأثیری در کاهش التهاب القاء شده توسط زایلن در موش نر بالغ ندارد (نمودار٤).



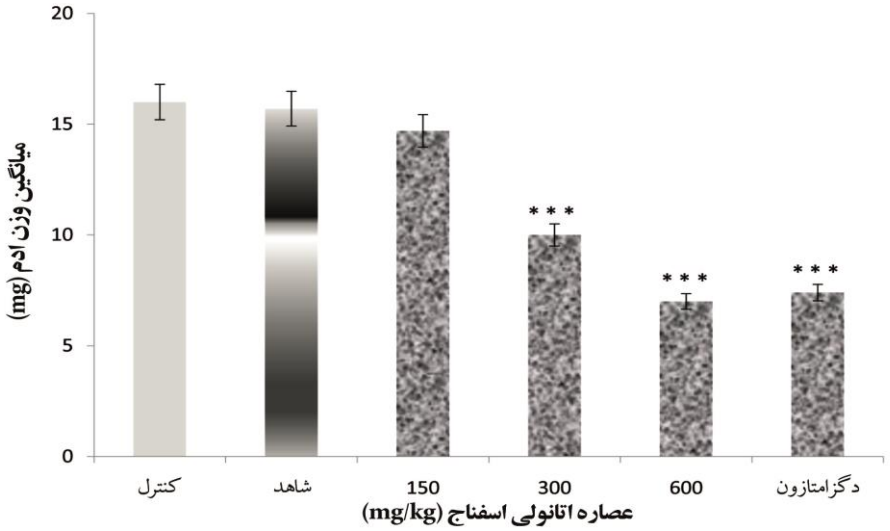
نمودار ۱– مقایسه اثرتزریق درون صفاقی عصاره الکلی برگ اسفناج در میانگین نمره درد القاء شده در فاز اولیه آزمون فرمالین در موش کوچک آزمایشگاهی نر بالغ



نمودار ۲- مقایسه اثر تزریق درون صفاقی عصاره الکلی برگ اسفناج در میانگین نمره درد القاء شده در فاز ثانویه آزمون فرمالین در موش کوچک آزمایشگاهی نر بالغ. تعداد حیوانات در هر گروه ٦ سر می‌باشد. ۰/۰۰۱ >p *** اختلاف با گروه شاهد را نشان می‌دهد.



نمودار ۳- مقایسه اثر تزریق درون صفاقی عصاره الکلی برگ اسفناج بر مدت زمان تأخیر در پاسخ القاء شده توسط آزمون صفحه داغ در موش کوچک آزمایشگاهی نر بالغ. تعداد حیوانات در هر گروه ٦ سر می‌باشد. ۰/۰۰۱>p *** اختلاف با گروه شاهد را نشان می‌دهد.



نمودار ٤- مقایسه اثر تزریق درون صفاقی عصاره الکلی برگ اسفناج برادم القاء شده توسط زایلن در موش کوچک آزمایشگاهی نر بالغ. تعداد حیوانات در هر گروه ٦ سر می‌باشد. دگزامتازون در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت درون صفاقی تزریق گردید. ***p<۰/۰۰۱ اختلاف با گروه شاهد را نشان می‌دهد.

بحث

آزمون فرمالین برای نخستین بار توسط دویویسون و دنیس در سال ۱۹۷۷ در گربه و رت مورد استفاده قرار گرفت و یک مدل بسیار پذیرفته شده برای بررسی اثرات ضددردی است. رفتارهای القاء شده توسط تزریق زیرجلدی فرمالین در دو فاز اولیه (۵-۰دقیقه) و ثانویه (٤٥-۱۵ دقیقه) بررسی می‌شود. فاز اول مربوط به درد نروپاتیک و در اثر تحریک مستقیم گیرنده‌های درد و انتقال آن توسط فیبرهای A دلتا ایجاد می‌شود. در حالی که در فاز ثانویه فیبرهای نوع C دخالت دارند و این فاز منعکس‌کننده یک درد التهابی است (۱۲). در تحقیق حاضر اثر عصاره برگ اسفناج بر درد ایجاد شده توسط فرمالین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره الکلی برگ اسفناج موجب کاهش معنی‌داری درد در فاز ثانویه گردیده است. به نظر می‌رسد اثرات ضددردی فوق از طریق مهار التهاب ایجاد شده باشد. در حالی که در فاز اولیه اثری ندارد. و مورفین هر دو فاز را به طور مساوی مهار می‌کند. و باعث کاهش معنی‌داری درد القاء شده در آزمون فرمالین می‌شود (۹). داروهایی مانند اوپیوئیدها که به صورت مرکزی عمل می‌کنند. هر دو فاز را مهار نموده در حالی که داروهایی که به صورت محیطی عمل می‌کنند مانند ایندومتاستین و دگزامتازون، تنها فاز ثانویه را مهار می‌کنند (٢٤).

این طور به نظر می‌رسد فاز ثانویه یک پاسخ التهابی همراه با درد، ناشی از التهاب است که می‌تواند توسط داروهای ضدالتهاب مهار شود (١٤). با توجه به این‌که ترکیبات شیمیایی موجود عصاره برگ اسفناج می‌تواند بیش از یک راه برای اعمال تأثیر خود داشته باشد به احتمال زیاد مکانیسم‌های دخالت‌کننده در مسیر ضددردی مانند مسیر گاباارژیک، کولینرژیک، گلوتامترژیک اثرات خود را اعمال می‌کند (۲۰).

مورفین یک داروی ضددرد اوپیوئیدی است که سیگنال‌های گیرنده درد را بدون اثر بر دیگر حس‌ها

بلوکه می‌کند. که به رسپتورهای اندورفین شامل: مو، کاپا و دلتا متصل می‌شود. این رسپتورها از طریق اثر بر G پروتئین اعمال خود را القاء می‌نماید (۲۶).

مطالعات مختلف نشان می‌دهد که ماده p و برادی کینین در فازاول نقش دارند و در حالی که در فاز ثانویه آزمون فرمالین پروستاگلاندین، هیستامین و سرتونین افزایش پیدا کرده (۲۸).

اسفناج حاوی ترکیبات پلی‌فنل طبیعی به نام فلاونوئید هستند که جلوی فعالیت گیرنده N–متیل D آسپارتات را گرفته و سبب کاهش کلسیم داخل سلول می‌شوند و نتیجه آن کاهش فعالیت سنتزکننده نیتریک اکساید و فسفولیپاز A_2 وابسته به کلسیم است که با کاهش No و سطح پروستاگلاندین‌ها اثرات ضددردی آشکار می‌شود. همچنین تحقیقات نشان می‌دهد فلاونوئیدها از طریق سیستم اوپیوئیدی و سیستم آدرنرژیکی نیز می‌توانند در تعدیل درد دخالت کنند (۲۵).

در تحقیق حاضر اثر عصاره برگ اسفناج در مدت زمان تأخیر در پاسخ القاء شده توسط آزمون صفحه داغ مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره برگ اسفناج مدت تأخیر در پاسخ ایجاد شده را توسط صفحه داغ افزایش می‌دهد. مورفین اثر ضددردی مشخصی را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. آزمون صفحه داغ یک یک مدل ضددرد مرکزی است و ترکیبات شبه اوپیوئیدی است، که در آن عوامل اوپیوئیدی از طریق گیرنده‌های فوق نخاعی و ستون فقرات اثرات ضددردشان را اعمال می‌کنند. درآزمون صفحه داغ پس از القای درد ماده P و برادی کینین آزاد می‌گردند. که اثر آنها توسط داروهای استروئیدی مهار می‌شود (۲).

سایر داروهایی که به صورت مرکزی عمل می‌نمایند مانند خواب‌آورها و شل‌کننده‌های عضلانی نیز در این آزمون اثرات مشابهی را نشان می‌دهند (۱۰). در آزمون صفحه داغ التهاب موضعی و تولید پروستاگلاندین‌های موضعی، نقش بارزی در ایجاد درد ندارد. و عصاره برگ اسفناج اثر ضددردی را نشان می‌دهد و این بدان مفهوم است که اثرات آنالژزیک آن از طریق سیستم‌های عصبی مرکزی مغز و نخاع اعمال شده است (۱۹).

به نظر می‌رسد که فعالیت ضددردی عصاره برگ اسفناج مرتبط با فلاونوئید موجود در آن باشد چراکه فلاونوئیدها توانایی مهار ماده P و برادی کینین را دارا می‌باشند. بنابراین موجب کاهش اثر درد القاء شده در تست صفحه داغ می‌گردد (۲۷). به نظر می‌رسد یکی از دلایل کاهش درد در آزمون صفحه داغ ترکیبات موجود در عصاره برگ اسفناج به نام روبیسکولین ٦ و ۵ است که به وسیله آنزیم ریبولوزبیس فسفات کربوکسیلاز اکسیژناز حاصل می‌شود. پروتئین اصلی در برگ‌های گیاه سبز است. این ترکیبات اثراتی مشابه اوپیوئیدها دارند. و مانند مورفین بر روی سیستم عصبی مرکزی (CNS) عمل می‌کنند و با اتصال و فعال کردن رسپتور اوپیوئیدی درد را تسکین می‌دهد (۱). تحقیق حاضر نشان داد که عصاره الکلی برگ اسفناج موجب مهار التهاب القاء شده در آزمون زایلن می‌گردد و این التهاب توسط پروتئین کیناز C، فسفولیپاز $A_۲$، فسفودی استرازها و نیز عوامل التهابی دیگر مثل پروستاگلاندین و هیستامین ایجاد می‌شود و توسط داروهای غیراستروئیدی ضدالتهاب مهار می‌شود (۵).

به نظر می‌رسد برگ اسفناج به دلیل حضور ترکیب فنولیک دار التهاب ناشی از لیپوساکاریدها شامل: مهاجرت سلولی، تولید No و اینترفرون گابا را مهار می‌کند. با استفاده ازآزمون زایلن مشخص شد که عصاره برگ اسفناج دارای اثرات ضدالتهابی نیز می‌باشد. می‌توان اثر ضدالتهابی عصاره برگ اسفناج ناشی از وجود کوارستین دانست. اثرات مهاری

کوارستین به دلیل اثر بر مسیرهای سیگنال‌کننده شامل فعالیت فاکتور هسته‌ای و فسفوریلاسیون MAP کیناز است. بنابراین کوارستین موجود در فلاونوئید با مهار تجمع گیرنده‌ها و آبشار سیگنالی التهاب حاد و مزمن را کم می‌کند (٦).

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که عصاره اتانولی برگ اسفناج باعث مهار درد و التهاب می‌گردد و باعث کاهش دردهای محیطی و مرکزی می‌شود. اما تحقیقات بیشتری برای تعیین مکانیسم‌های دقیق اثر آنها و مسیرهای احتمالی عملکرد ضددردی و ضدالتهابی لازم است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه برا ی اخذ درجه کارشناسی ارشد در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران بوده است. بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت‌های پژوهشی دانشگاه به سبب حمایت‌هایشان از این مطالعه را اعلام می‌داریم.

منابع

1. Almeida R., Navarro D., Barbosa-Filho J., 2001. Plants with central analgesic activity. *Phytomedicine*, 8(4): 310-322.

2. Anjaneyulu M., Chopra K., 2003. Quercetin, a bioflavonoid, attenuates thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27(6): 1001-1005.

3. Benavete-Garcia O., Castillo Marin F.R., Ortuno A., DeL Rio J.A.U., 2014. Sesand properties of citrus Flavonoids. *Plant Foods for Human Nutrition*, (59): 113-122.

4. Bergman M., varsharsky L.E., Gottieb H., Grossman S., 2001. The antioxidant activity of aqueous spinach extract: chemical identification of active fractions. *Phytochemistry*, (58): 143-152.

5. Calixto J.B., Cabrini D.A., Ferreia J., Campos M.M., 2000. Kinins in pain and inflammation. *Pain*, 87(1): 1-5.

6. Canterro G., Gampanella C., Mateos S., Cortes F., 2006. Topoisomerase II inhibition and high yield of endoreduplication induced by the Flavonoids Luteoline and quercetin. *Mutagenesis*, 21(5): 324-332.

7. Catrina M.J., 1991. The capsaicin receptor: a heat activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 66(53): 816-824.

8. Dubuisson D., Dennis S.G., 1977. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphin, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 4(2): 161-174.

9. Garica M.D., Fernandez M.Z., Alvarez A., Saenz M.T., 2004. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extract from leaves of Pimenta racemose varozua (Mirtaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 91(1): 69-73.

10. Hiruma-Lima C.A., Gracioso J.S., Bighetti E.J., Germonsen Robineou L., Souza Brito A.R., 2000. The juice of fresh leaves of *Boerhaavia diffusa* L. (Nyctaginaceae) markedly reduces pain in mice. *Journal of Ethnopharmacpology*, 71(1-2): 267-274.

11. Hirata H., Sonoda S., Agui S., Yoshida M., Ohinata K., Yoshikawa M., 2007. Rubiscolin-6, an opioid peptides derived from spinach Rubisco, has anxiolytic effect via activating and dopamine D_1 receptors. *Division of Food Science and Biotechnology*, 28: 1998-2003

12. Hunskaar S., Hole K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non–inflammatory pain. *Pain*, 30(1): 103-114.

13. Kawazu Okimura, Y.M., Ishii T., Yui S., 2003. Varietals and seasonal difference

technology: production, composition, storage and processing. Marcel Dekker Inc., New York, 721 pp.

22. Samsam Shariat H., 2008. Extracting effective materials of medicinal plants and ways of identify and evaluation them. 2nd ed., Tehran: Pub of Mani, p: 10-20.

23. Serpell M., 2006. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Surgery*, 24(10): 350-53.

24. Sevostianova N., Danysz W., Bespalov A.Y., 2005. Analgesic effects of morphine and loperamide in the rat formalin test: Interactions with NMDA receptor antagonists. *European Journal of Pharmacology*, 525(1): 83-90.

25. Toker G., Kupeli E., Memisoglu M., Yesilada E., 2004. Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden). *Journal of Ethnopharmaco logy*, 95(2-3): 393-397.

26. Walsh L.J., 2003. Mast cell and oral inflammation. *Critical reviews in oral biology and medicine: an official publication of the American Association of Oral Biologists*, 14(3): 188-198.

27. Yong S., Kawamura Y., Yoshikawa M., 2003. Effect of rubiscolin-6 delta opioid peptide derived from Rubisco on memory consolidation on. *Peptides*, (24): 325-328.

28. Zeashana H., Amresh G., Rao C.V., Singh S., 2009. Antinoceptive activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(3): 492-496.

29. Zhao H., Ohinata k., Yoshikawa M., 2008. Rubimetide (Met-Arg-Trp) derived from Rubisco exhibits anxidytic-like activity via the DPI receptor in male ddy mice. *Peptides*, 29(4): 629-632.

in oxalate content of spinach. *Scientia Horticulture*, 97: 203-210.

14. Kilpatric G.J., Smith T.W., 2005. Morphine-6-glueuronide, actions and mechanisms. *Medical Research Review*, 25(5): 521-544.

15. Law P., Loh H., Wei L.N., 2004. Insights into the receptor transcription and signaling: implications in opioid tolerance and dependence. *Neuropharmacology*, 47: 300-311.

16. Libert S., Chao Y., Chu X., Pletcher S.D., 2006. Trade-offs between longevity and pathogen resistance in Drosophila melanogaster are mediated by NFKB signaling. *Aging Cell*, 5(6): 533-543.

17. Paudel K.R., Das B.P., Rauniar G., Sangraula H., Deo S., Bhattacharya S., 2007. Anti-nociceptive effect of amitriptyline in mice of acute pain models. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45: 529-531.

18. Ramezani M., Naseri S., Yassa N., 2009. Antinociceptive and antinflammatory effects of isolated fraction from *Apium graveolens* seeds in mice. *Pharmaceutical Biology*, 47(8): 740-743.

19. Rosona Ramirez M., Guterres L., Dickel O.E., Castro M.R.D., Henriques A.T., Souzo M.M.D., Marti Barros D., 2010. Preliminary studies on the antinociceptive activity of *Vaccinium ashei* Berry in experimental animal models. *Journal of Medicinal Food*, 13(2): 336-342.

20. Rostom A., Dube C., lewin G., Testsvadze A., Barrowman N., Code C., 2007. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cycloxygenase-2 inhibitors for primary prevention of colorectal cancer: a systematic review prepared for the U.S. Preventive Services Task Force. *Annual of Internal Medicine*, 146(5): 376-389.

21. Salunkhe D.K., Kadam S.S., 1998. Handbook of vegetable science and