



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

سمیه میرعزیزی<sup>۱</sup>، غلامحسین واعظی<sup>۲\*</sup>، علی حائری روحانی<sup>۱</sup>

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 پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۱۸

### 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 و آزمون زایلن می‌پردازد. در این پژوهش که روی ۳۶ موش کوچک آزمایشگاهی نر بالغ نژاد NMRI با وزن ۲۵ تا ۳۰ گرم انجام شد، حیوانات به طور تصادفی به ۶ گروه ۶ تایی 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 و گروه 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. همچنین 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 در آزمون 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

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، برادی‌کینین، 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

درد یک تجربه حسی است که به وسیله 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

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

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

التهاب یک مکانیسم پیچیده، هومئوستاتیک است که برای حفاظت از سلامتی موجود زنده در مقابل عوامل مضر اگزوزنی و اندوزنی به کار می رود. عوامل مشارکت کننده در التهاب، سلولها و فاکتورهای محلول هستند. عوامل ضدالتهاب در درمان واکنش های پاتولوژیکی مؤثر است. اثر بیشتر عوامل ضدالتهابی به دلیل توانایی آنها در مهار تشکیل پروستاگلاندینها به وسیله سیکلواکسیژناز است (۱۶).

اسفناج با نام علمی *Spinacia oleracea* یکی از سبزی های 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، لیسیتین، سکرترین، ساپونین (به خصوص در ریشه) پروویتامین و اسید فولیک است (۳). همچنین اخیراً پپتیدهای اویپوئیدی که به نام رویسکولین در اسفناج یافت شده و این ترکیبات اثراتی مشابه اویپوئید دارند و از این رو بر روی مغز تأثیر می گذارند (۱۱). از اسفناج به عنوان اشتها آور، ملین و تسکین دهنده 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 آنتی اکسیدان های قوی بوده و اعمال وسیع فارماکولوژیکی و بیوشیمیایی شامل: ضدالتهابی، ضدآلرژیک، ضدویروسی محافظت از سیستم اعصاب مرکزی ضدسرطان و ضدپیری دارد

(۴). در برخی از مطالعات کلینیکی اکسیدان های موجود در اسفناج در بهبود فعالیت سیستم اعصاب مرکزی و مهار روند پیری مفید می باشد. اسفناج از طریق کاهش استرس اکسیداتیو می تواند باعث بهبود رفتارهای شبه اضطرابی 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 می شود که بعد از این ماده دفع می شود (۲۱).

به طور مشخص برای بررسی اثر ضددردی و ضدالتهابی برگ اسفناج با روش و آزمایش ها 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 عصاره گیری 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 ۵۸/۶ درصد مایع غلیظ عصاره تشکیل می دهد. در ظرف در بسته و دور از نور نگهداری می کنیم از عصاره

**آزمون فرمالین:** برای انجام این آزمایش، از جعبه شیشه‌ای استفاده می‌شود. این جعبه شیشه‌ای به ابعاد  $12 \times 30 \times 30$  سانتی‌متر به صورتی ساخته شده که در فاصله‌ای از جعبه در سطح افق، آئینه‌ای با زاویه ۴۵ 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  $0/2$  میلی‌لیتر ماده مورد نظر به صورت درون صفاقی به حیوان تزریق شد و بعد از ۳۰ دقیقه فرمالین  $2/5$  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 هر یک 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

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

**حیوانات آزمایشگاهی:** در این مطالعه از موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر بالغ نژاد NMRI با محدوده وزن ۲۵-۳۰ گرم از انیستيو پاستور کرج خریداری شده و در شرایط آزمایشگاهی با درجه حرارت  $22 \pm 2$  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 و آب 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 ۲۵-۳۰ 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. آزمایش‌های نهایی 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 ۴، ۵ و ۶ (تجربی) دریافت‌کننده دوزهای ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره الکلی برگ اسفناج تزریق به صورت درون صفاقی انجام گرفت.



اسفناج تیمار شدند. گروه ۱ (کنترل): هیچ‌گونه تیماری دریافت نکردند. گروه ۲ (شاهد): موش‌هایی که ابتدا نرمال سالی (حلال عصاره) را دریافت کردند و سپس بر روی صفحه داغ قرار گرفتند.

گروه ۳ (گروه استاندارد): موش‌هایی که ابتدا مورفین (داروی استاندارد) را به میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند و سپس بر روی صفحه داغ قرار گرفتند.

گروه ۴، ۵ و ۶ (تجربی): موش‌هایی که ابتدا عصاره برگ اسفناج را با دوزهای ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ 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 ۰/۲ میلی‌لیتر به صورت درون صفاقی تیمار شدند. پس از گذشت ۳۰ دقیقه از تزریق درون صفاقی برای بیهوش کردن موش میزان ۰/۰۶ میلی‌لیتر کتامین به صورت درون صفاقی تزریق شد و پس از بیهوش شدن موش‌ها به میزان ۰/۰۳ میلی‌لیتر زایلن به سطح پشتی و میانی گوش سمت راست تزریق شد. دو ساعت بعد موش‌ها به وسیله کلروفورم کشته شدند. سپس هر دو گوش حیوان را جدا کرده و برش‌های ۷ 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 (۱۸). در آزمون زایلن حیوانات در ۶ گروه شش‌تایی زیر قرار گرفتند:

گروه ۱ (کنترل): هیچ‌گونه تیماری دریافت نکردند. گروه ۲ (شاهد): موش‌هایی که ابتدا سرم فیزیولوژیک (حلال عصاره) را به صورت درون صفاقی دریافت کردند و بعد تست زایلن روی آنها انجام شد.

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

گروه ۴، ۵ و ۶ (تجربی) حیوانات گروه‌های تجربی با دوزهای ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره دریافت نمودند و سپس 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 (۸).

**آزمون صفحه داغ:** در ابتدا این آزمون موش‌ها با ماده مورد نظر به حجم ۰/۲ میلی‌لیتر به صورت درون صفاقی تیمار شدند. موش‌ها بلافاصله بعد از تزریق در دقیقه ۰ و نیز در دقایق ۶۰، ۴۵، ۳۰ و ۱۵ بر روی صفحه داغ با دمای ۵۶ 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 (۱۷). در این آزمایش حیوانات در ۶ گروه شش‌تایی قرار گرفتند. حیوانات گروه‌های تجربی با دوز ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره برگ

اولیه آزمون فرمالین در مقایسه با گروه شاهد شد (نمودار ۱). تزریق درون صفاقی عصاره الکلی برگ اسفناج در دوز ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ 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 القاء شده در آزمون صفحه شد (نمودار ۳).

تزریق درون صفاقی عصاره الکلی برگ اسفناج در دوزهای ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و دگزامتازون در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب کاهش معنی‌داری بر التهاب القاء شده در آزمون زایلین 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 زایلین در موش نر بالغ ندارد (نمودار ۴).

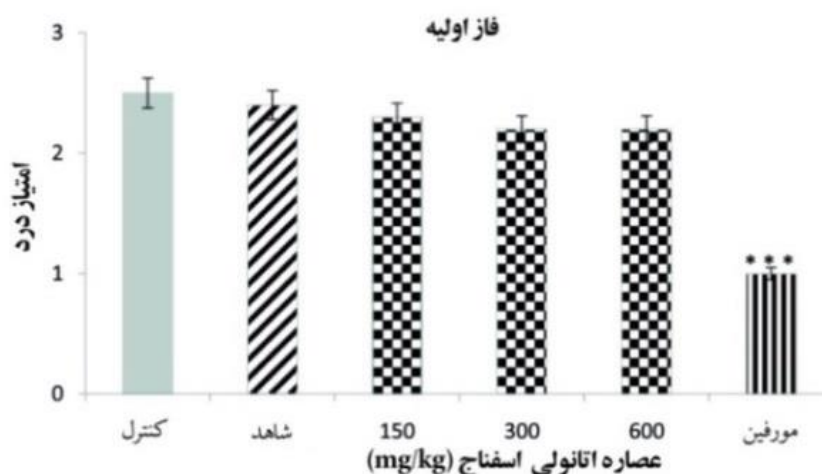
گروه ۳ (استاندارد): موش‌هایی که ابتدا دگزامتازون (داروی استاندارد) را با میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند و سپس تست زایلین روی آنها انجام شد.

گروه ۴، ۵ و ۶ (تجربی): موش‌هایی که ابتدا عصاره برگ اسفناج را با دوزهای ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند و سپس تست زایلین روی آنها انجام شد.

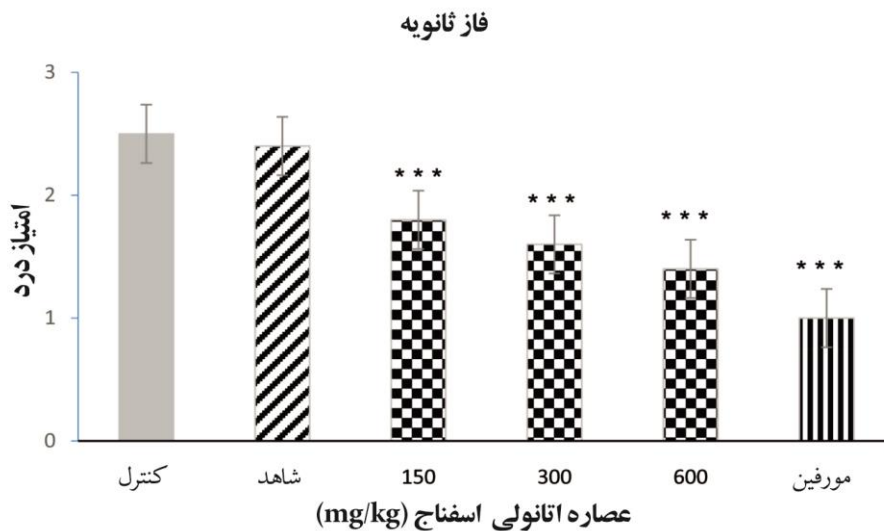
**تحلیل آماری:** در هر گروه از آزمایش‌ها، اثر دوزهای مختلف به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ثبت گردید. به منظور تعیین تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها، از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تک‌میلی توکی استفاده شد. سطح معنی‌داری  $p < 0/05$  در نظر گرفته و محاسبات آماری با نرم‌افزار SPSS انجام شد.

### نتایج

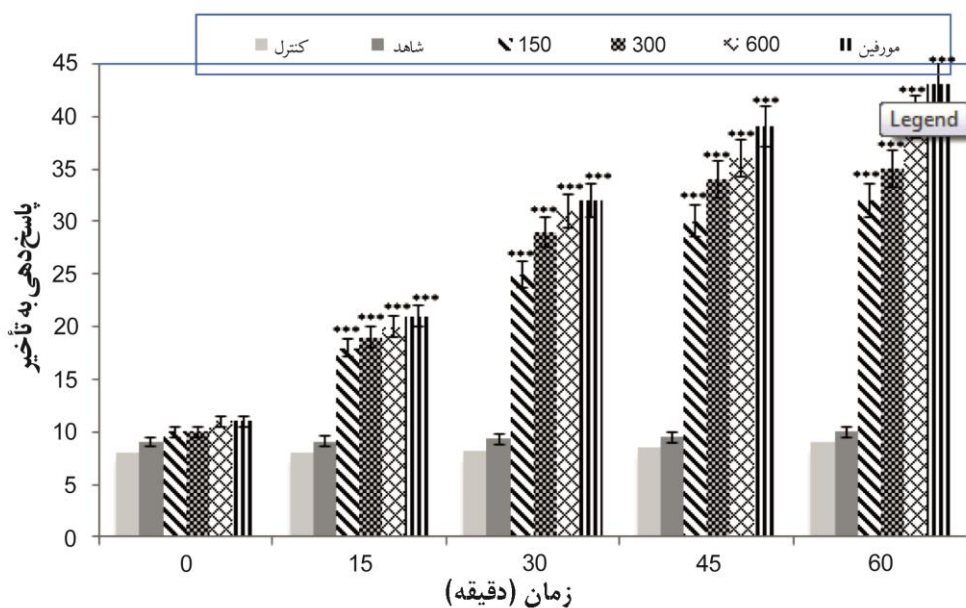
تزریق درون صفاقی عصاره الکلی برگ اسفناج در دوز ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب کاهش معنی‌داری در درد القاء شده در فاز اولیه آزمون فرمالین ایجاد نکرده در صورتی که مورفین در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب کاهش معنی‌داری در درد القاء شده در فاز



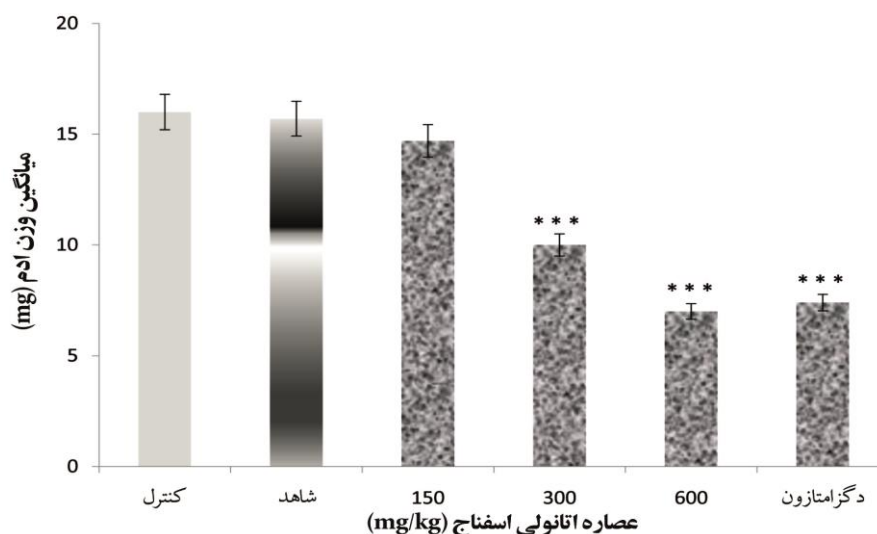
نمودار ۱- مقایسه اثر تزریق درون صفاقی عصاره الکلی برگ اسفناج در میانگین نمره درد القاء شده در فاز اولیه آزمون فرمالین در موش کوچک آزمایشگاهی نر بالغ



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 ۶ سر می‌باشد.  $p < 0/001$  \*\*\* 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 ۶ سر می‌باشد.  $p < 0/001$  \*\*\* اختلاف با گروه شاهد را نشان می‌دهد.



نمودار ۴- مقایسه اثر تزریق درون صفاقی عصاره الکلی برگ اسفناج برادم القاء شده توسط زایلین در موش کوچک آزمایشگاهی نر بالغ. تعداد حیوانات در هر گروه ۶ سر می‌باشد. دگزامتازون در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت درون صفاقی تزریق گردید.  $p < 0.001$  \*\*\* اختلاف با گروه شاهد را نشان می‌دهد.

#### بحث

فاز را به طور مساوی مهار می‌کند. و باعث کاهش معنی‌داری درد القاء شده در آزمون فرمالین می‌شود (۹). داروهایی مانند اوپیئوئیدها 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 (۲۴).

این طور به نظر می‌رسد فاز ثانویه یک پاسخ التهابی همراه با درد، ناشی از التهاب است که می‌تواند توسط داروهای ضدالتهاب مهار شود (۱۴). با توجه به این که 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 گاباژژیک، کولینرژیک، گلوتامترژیک اثرات خود را اعمال می‌کند (۲۰).

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

آزمون فرمالین برای نخستین بار توسط دویوسون 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 (۵-۱۰ دقیقه) و ثانویه (۴۵-۱۵ دقیقه) بررسی می‌شود. فاز اول مربوط به درد نروپاتییک 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





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 ۶ و ۵ است که به وسیله آنزیم ریبولوزیسی 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<sub>2</sub>، فسفودی استرازاها 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 از آزمون 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

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 فاز اول نقش دارند و در حالی که در فاز ثانویه آزمون فرمالین پروستاگلاندین، هیستامین و سرتونین افزایش پیدا کرده (۲۸).

اسفناج حاوی ترکیبات پلی فنل طبیعی به نام فلاونوئید هستند که جلوی فعالیت گیرنده N-متیل D آسپاراتات را گرفته و سبب کاهش کلسیم داخل سلول می‌شوند و نتیجه آن کاهش فعالیت سنتزکننده نیتریک اکساید و فسفولیپاز A<sub>2</sub> 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 آدرنژیکی 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 مدل ضددرد مرکزی است و ترکیبات شبه اوپیوئیدی است، که در آن عوامل اوپیوئیدی از طریق گیرنده‌های فوق نخاعی و ستون فقرات اثرات ضددرشان را اعمال می‌کنند. در آزمون 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





chemical identification of active fractions. *Phytochemistry*, (58): 143-152.

5. Calixto J.B., Cabrini D.A., Ferreira 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 racemosa varozua* (Mirtaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 91(1): 69-73.

10. Hiruma-Lima C.A., Gracioso J.S., Bighetti E.J., Germonsén Robineou L., Souza Brito A.R., 2000. The juice of fresh leaves of *Boerhaavia diffusa* L. (Nyctaginaceae) markedly reduces pain in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 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<sub>1</sub> 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

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 (۶).

#### 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 برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات 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., Gottlieb H., Grossman S., 2001. The antioxidant activity of aqueous spinach extract:



- 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. 2<sup>nd</sup> 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 Ethnopharmacology*, 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 rubisco-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. Antinociceptive 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 anxiolytic-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-glucuronide, 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 anti-inflammatory 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., Souza 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 cyclooxygenase-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