بررسی اثر ضددردی و مواد متشکله عصاره برگ گیاه دارویی بن سرخ (*Allium jesdanum*) و نقش احتمالی سیستم اوپیوئیدی در اثرات ضددردی آن

مجتبی خاکساریان[1]، دکتر محمد هادی مشکوه السادات[2]، رسول فرازی فرد[3]، فرزانه صفرپور[3]

1- مربی، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

2- دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان

3-کارشناس ارشد فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی لرستان کرمان

یافته / دوره نهم / شماره 4 / زمستان 86 / مسلسل 34

چکیده

دریافت مقاله: 86/7/1، ***پذیرش مقاله***: 86/10/3

Ø مقدمه : درگزارش های اخیر خواص ضددردی گیاه دارویی بن سرخ با استفاده از آزمونهای فرمالین و **Tail flick** نشان داده شده است. بر همین اساس هدف این تحقیق بررسی و آنالیز مواد موجود در عصاره گیاه، آزمون حسی حرکتی و اثرات اوپیوئیدی قرار گرفت.

Ø مواد و روش‌ها: گیاه دارویی بن سرخ در ارتفاع 2200 متری منطقه سفید کوه لرستان در اردیبهشت ماه جمع آوری گردید و در دانشکده کشاورزی لرستان کد گزاری گردید. عصاره گیری با استفاده از دستگاه سوکسله انجام و سپس توسط روتاری حلال خارج گردید. در این مطالعه از120 عدد موش صحرایی نر نژاد **Sprague-Dawely** در محدوده وزنی 180-220 گرم و 50 عدد موش سوری در محدوده وزنی 20-25 گرم استفاده گردید.

برای بررسی نقش سیستم اوپیوئیدی پیش تیمار با نالوکسان انجام شد و برای اندازه گیری درد از آزمون های **Tail flick** و**Hot-Plate** استفاده گردید. آزمون حسی حرکتی با استفاده از دستگاه روتارود انجام شد و آنالیز مواد متشکله با استفاده از دستگاه **GC/ GC Mass** انجام شد.

Ø یافته‌ها: نتایج نشان می دهد که تجویز داخل صفاقی عصاره هیدرواتانولی بن سرخ دارای اثرات ضد دردی می باشد که این اثرات با نالوکسان معکوس می شود. در دوزهای که عصاره دارای اثرات ضد دردی بود اثرات سمیت حرکتی از آن مشاهده نگردید. همچنین آنالیز مواد متشکله نشان داد که موادی نظیر مرفین سیلریت، اتیل سینامیت، ایزوکوینولین، نئومنتول و الکل های با زنجیر طولانی در عصاره وجود دارد.

Ø بحث و نتیجه‌گیری: به طور کلی می توان گفت بخشی از اثرات ضددردی عصاره مربوط به موادی است که بر سیستم اوپیوئیدی اثر می کند و این اثرات توسط نالوکسان از آنتاگونیست های مرفین معکوس می شود.

Ø کلید واژه‌ها: بن سرخ، **Hot-Plate**، **Tail-Flick**، نالوکسان و موش صحرایی

آدرس مکاتبه: خرم آباد، کمالوند، مجتمع آموزشی پردیس، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده پزشکی

پست الکترونیک: magkhaksar@yahoo.com

مقدمه

با روشن شدن عوارض جانبی و آثار زیان بخش شدید داروهای شیمیایی، مسئله بازگشت به استفاده از داروهای گیاهی و طبیعی مورد توجه واقع شد. همچنین به جای استفاده از یک ماده خالص جدا شده از گیاه استفاده از عصاره های تام گیاه مد نظر قرار گرفته شد (1). جستجو برای یافتن ترکیبات جدید ضد درد از دهه 1960در دنیا شروع شده است زیرا داروهای موجود هنوز طیف وسیعی از اثرات ناخواسته را در بر دارند که گاهی به نسل های بعدی نیز منتقل می شوند. همچنین از دید تجارت بین المللی میلیاردها دلار ارزش اقتصادی به دنبال دارند. عقیده بر این است که اغلب ترکیبات طبیعی و بخصوص گیاهان طبی می توانند منبع یافتن ترکیبات جدید باشند. زیرا برخی ترکیبات مشهور دارویی فعلی مثل آسپرین، آتروپین، مرفین و کوکائین از گیاهانی که به عنوان ضددرد استفاده می شده اند به دست آمده اند (2). گیاه بن سرخ[1] یک گیاه گلدار است که به طور وحشی می روید و متعلق به خانواده Lilaceae بود و بومی ایران است. این گیاه در ارتفاعات 1800-2600 متری رشد می کند(3 و4 و 5). یک گیاه پایا پیازدار است که به ارتفاع حدود 50 سانتی متر رشد می کند. از بخش هوازی گیاه برای درمان دردهای شکمی، روماتیسم، استفراغ، سنگ کلیه و سرماخوردگی استفاده می شود(6).

در مطالعه ای که به تازگی در دانشگاه علوم پزشکی لرستان انجام شد و مشخص گردید عصاره گیاه دارویی بن سرخ دارای اثرات ضددردی است (7). بر همین اساس پژوهش جاری در جهت انجام مطالعات تکمیلی برای تاییدی بر خواص ضددردی وآنالیز مواد موثره و یافتن مکانیسم های احتمالی در مورد خواص ضد دردی گیاه صورت پذیر است.

مواد وروشها

حیوانات مورد مطالعه: حیوانات مورد مطالعه شامل 120 عدد موش صحرایی نر نژاد Sprague-Dawely در محدوده وزنی200-250 گرم برای تمامی آزمایشات استفاده گردید. افزون بر این برای بررسی سمیت حرکتی از 50 عدد موش سوری در محدوده وزنی20-30 گرم استفاده گردید.

روش تهیه عصاره: گیاه بن سرخ از ارتفاع 2200 متری منطقه سفید کوه خرم آباد جمع آوری گردید. گیاه در هرباریوم دانشکده کشاورزی لرستان کد گذاری شد. برگهای گیاه جدا شد و با آب سردشسته شدند و سپس در درجه حرارت اتاق و سایه خشک شدند. 100 گرم از گیاه خشک در محلول آبی الکلی (1:3) خیسانده می شد. عصاره گیری با استفاده از دستگاه سوکسله انجام و سپس توسط روتاری حلال خارج گردید. آنگاه با استفاده از دستگاه روتاری عمل تقطیر حلال نیز صورت گرفت، عصاره بدست آمده در داخل یخچال نگهداری شد و قبل از تجویز به حیوان غلظت مورد نظر از عصاره درآب مقطر تهیه می گردید.

بررسی حسی حرکتی: به دلیل اینکه دارای آرام بخش می تواند بر روی واکنش به محرک های آسیب رسان و دردزا اثر بگذارد، اثرات عصاره با استفاده از آزمون حسی حرکتی[2] بر روی موش سوری با استفاده از دستگاه میله ای روتارود (n=16-24) برای هر گروه بررسی گردید. دستگاه روتارود دستگاهی است شامل میله ای به طول 25 سانتی متر، قطر 3 سانتی متر که به 6 قسمت تقسیم می شود، بوسیله دیسک های 20 سانتی متری، میله روتارود با یک سرعت ثابت 15 دور در دقیقه می چرخد. انجام آزمون 30 دقیقه بعد از از تزریق دوزهای متفاوت عصاره انجام می شد. نتایج به صورت درصدی از حیوانات که برای 45 ثانیه بر روی میله باقی می مانند که این زمان به عنوان Cut-off در نظر گرفته شده و ثبت گردید.

آزمون Hot-plate : در این آزمون موش روی یک صفحه داغ که دمای ثابت 1±55 قرار می گرفت. زمان تاخیر بروز رفتار هایی نظیر پریدن و لیسیدن پا اندازه گیری می شد. یک زمان Cut-off برابر 45 ثانیه برای جلوگیری از آسیب به

1. Allium Jesdianum 2. Rotarod

حیوان در نظر گرفته می شد. زمان قبل و بعد از استفاده دارو اندازه گیری می شد و این دو با هم مقایسه می شدند.

آزمون Tail-flick: برای اندازه گیری میزان تحمل درد حرارتی از آزمون Tail-flick نیزاستفاده گردید. این آزمون بر اساس روش D'Amor & Smith 1941 (8) انجام می شد. همه آزمون ها در فاصله 2 تا 6 عصر در درجه حرارت آزمایشگاه انجام می شدند، آزمایشات با دستگاه Tail-flick ساخت شرکت بهبود پرداز ایران انجام گرفت. حیوان درون محفظه مخصوص[1] به صورت افقی و با دم آویزان انجام می گرفت. پس از آرام گرفتن حیوان، از شدت نور 7 استفاده می شد و زمان 15 ثانیه به عنوان Cut –off به منظور جلوگیری از آسیب بافتی در نظر گرفته می شد. برای هر موش زمان عقب کشیدن دم پیش از تابش نور[2]، و بعد از از تزریق عصاره[3] اندازه گیری می شد پاسخ ها به عنوان زمان تاخیر ثبت می شد.

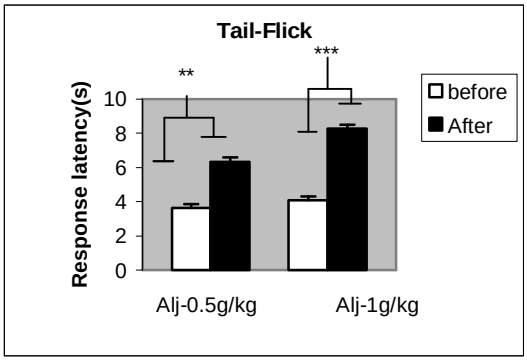
تزریق دارو: نالوکسان(0/5mg/kg, i.p)به طور داخل صفاقی 10 دقیقه قبل از تزریق عصاره تجویز می شد.

جداسازی و شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده عصاره: ابتدا عصاره تغلیظ شده و سپس برای مدت 48 ساعت در هگزان قرار داده تا مواد چرب آن خارج شود. از طرفی بوسیله حرارت مختصر و اضافه کردن اتانول مرک(Merck) و هم زدن آن ترکیباتی نظیر مومها و هیدروکربن های سنگین خارج شوند. سپس برای جداسازی بهتر به مدت یک شبانه روز در دمای 10 سانتی گراد قرار داده و سپس با سانتریفوژ رسوبات خارج شده است و محلول باقی مانده در شرایط زیر به دستگاه تزریق می شد. P5050 Shimadzu GC/MS، ستونBP 05 به طول 30 میلی لیتر، قطر 25 /0 میلی متر بود. برنامه ریزی ستون حرارتی GC/MS از 60 تا 300 سانتی گراد، دمای محفظه تزریق 5 سانتی گراد در دقیقه و گاز حامل He بوده است، انرژی یونیزاسیون در دستگاهGC/MS70 الکترون ولت و دتکتور دستگاه GC از نوع Shimadzu 70 بود.

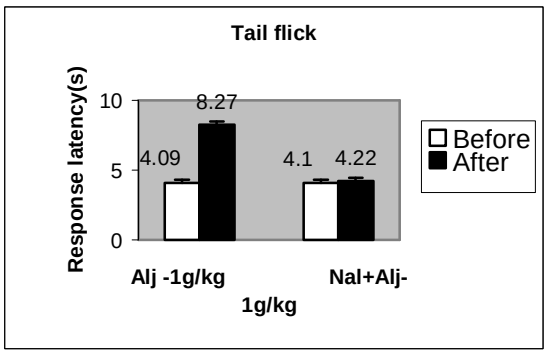
آزمون های آماری: نتایج به صورت Mean ± SEM بیان شده اند، محاسبا آماری با استفاده ازمون Paired t-test انجام گرفتند و $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

آزمون Tail –flick: مقایسه بین زمانهای قبل و بعد از تیمار با عصاره هیدروالکلی بن سرخ در دوزهایmg/kg 500 و 1gr/kg سبب افزایش زمان تاخیرآزمون Tail Flick گردید. (نمودار 1) تجویز نالوکسان کلراید(0.1 mg/kg, i.p) 10 دقیقه قبل از تجویز عصاره مانع افزایش زمان تاخیر آزمون گردید (نمودار 2)



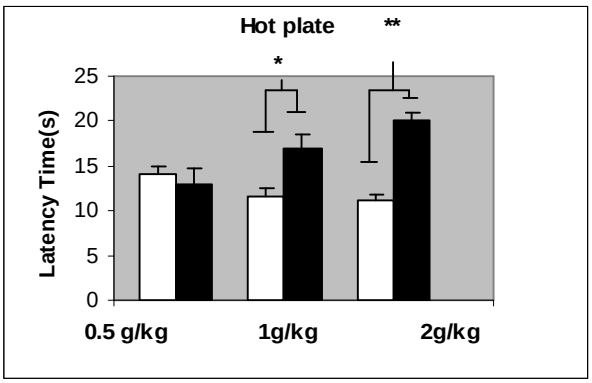
نمودار شماره 1- اثر تزریق داخل صفاقی دوزهای 0.5g/kg و 1g/kg عصاره هیدروالکلی بن سرخ بر زمان تاخیر آزمون Tail flick (n=10). P<0.01 و P<0.001***. مقایسه بین زمان قبل و بعد از تیمار با عصاره هیدروالکلی بن سرخ.**



نمودار شماره 2- پیش درمانی بوسیله تزریق داخل صفاقی نالوکسان درآزمون Tail Flick دوزmg/kg 0.5 بر روی بی دردی ناشی ازتزریق داخل صفاقی عصاره هیدروالکلی بن سرخ در دوز 1g/kg. نالوکسان اثرات ضد درد معنی دار بن سرخ را مهار کرد.

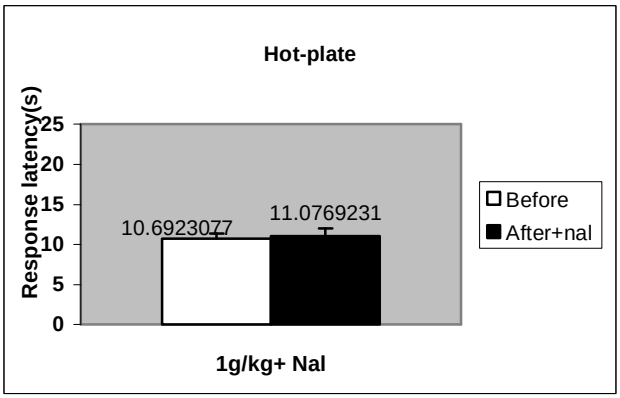
1. Restrainer
2. Pre-drug letency
3. Post drug latency

آزمون Hot plate: مقایسه بین زمانهای قبل و بعد از تیمار با عصاره هیدروالکلی بن سرخ در دوز500 mg/kg اثری بر زمان تاخیر آزمون نداشت. در حالیکه دوز 1g/kg و 2g/kg سبب افزایش زمان تاخیر آزمون Hot plate گردید (p<0/05) (نمودار 3).



نمودار شماره 3 - اثر تزریق داخل صفاقی دوزهای 0.5g/kg و 1g/kg و 2g/kg عصاره هیدروالکلی بن سرخ بر زمان تاخیر آزمون Hot Plate (n=10). P<0.05* و P<0.01. مقایسه بین زمان قبل و بعد از تیمار با عصاره هیدروالکلی بن سرخ.**

در حالیکه پیش درمانی با نالوکسان ((0.5mg/kg, i.p توانست اثرات ضد دردی عصاره هیدروالکلی بن سرخ با دوز 1g/kg را معکوس نماید(نمودار شماره 4).



نمودار شماره 4- پیش درمانی بوسیله تزریق داخل صفاقی نالوکسان در آزمون Hot Plate با دوز0.5 mg/kg بر روی بیدردی ناشی ازتزریق داخل صفاقی عصاره هیدروالکلی بن سرخ در دوز 1g/kg. نالوکسان اثرات ضد درد معنی دار بن سرخ را مهار کرد.

بررسی حسی حرکتی: آزمون حسی حرکتی برای موش های کنترل بود. تغییر معنی داری با تجویز عصاره در هیچیک از دوز های تجویز شده 500mg/kg تا 2g/kg مشاهده نگردید(P<0.05).

ترکیبات تشکیل دهنده عصاره گیاه بن سرخ تجزیه گردید که عمده ترکیبات متشکله آن عبارتند بودند از:

2,2,Bi-1,3 Dioxolane
1,2, 3, 4 Cyclohexanetetrol
Isoquinoline
Quinoline
Ethyl Cinamate
Morphine Silyliert
1,2- Bezenedicarboxylic acid (Diethyl Phtalate)

بحث

نتایج بدست آمده از مطالعات قبلی نشان داده است که تجویز محیطی عصاره هیدروالکلی بن سرخ فاز اول آزمون فرمالین که نشان دهنده درد حاد شیمیایی می باشد و نیز درک درد حاد حرارتی Tail flick را کاهش می دهد و همچنین عصاره توانسته است فاز دوم آزمون فرمالین که نشان دهنده درد مزمن می باشد را نیز کاهش دهد این خود نشان دهنده خواص ضد دردی و ضد التهابی عصاره بن سرخ را می باشد (8) در این مطالعه جهت تایید اثرات ضددری مرکزی عصاره با استفاده از آزمون های Hot Plate و Tail Flick مطالعات تکمیلی انجام شد.

داروهای ضددرد ضعیف مانند اسید استیل سالیسیلیک (ASA)، آسپرین و پاراستامول در آزمونهای با تحریک فازیک مانند Tail flick و Hot Plate بی اثر بوده و یا اثر اندکی دارند در حالیکه نسبت با داروهای با عمل مرکزی حساسیت بسیار زیادی دارند (9، 10) در این مطالعه مشاهده شد که عصاره بن سرخ دارای خواص ضد دردی مرکزی است. این اثر ضددردی با نالوکسان آنتاگونیست مرفین معکوس می شود. در مطالعه قبلی (7) با توجه به مهار فاز مرکزی و محیطی درد در

آزمونهای فرمالین و Tail Flick توسط عصاره بن سرخ بر انتظار می رفت که عصاره بن سرخ حاوی موادی باشد که نظیر مرفین عمل کنند. بر همین اساس در این مطالعه با استفاده از آنتاگونیست مرفین یعنی نالوکسان که عمدتاً باعث مهار درد های مرکزی می شود پیش تیمار با نالوکسان جهت معکوس نمودن این اثرات ضد دردی انجام شد که توانست اثرات ضددردی عصاره بن سرخ را مهار نماید.

پیاز بن سرخ دارای استروئید های گلیکوزیدی می باشد(11). بدلیل اینکه در این مطالعه اثرات برگ گیاه بن سرخ مورد استفاده قرار گرفت عصاره آن با روش GC/MASS آنالیز شد و نتایج مطالعه پیشنهاد دهنده مرفین سیلریت و اتیل سینامیت به عنوان مواد ضد درد (12 و13) موجود در عصاره برگ بن سرخمی باشند.

با توجه به اثر عصاره بر درد مرکزی آزمون Tail flick و Hot Plate در این مطالعه و اثرات عصاره بر درد حاد حرارتی آزمون Tail flick و درد فاز حاد آزمون فرمالین در مطالعه پیشین (8) می توان این احتمال را در نظر گرفت که دست کم بخشی از اثرات ضد دردی عصاره از طریق اثر موادی نظیر مرفین سیلیریت و یا اتیل سینامیت موجود در عصاره بن سرخ باشند، که اثر خود را از طریق رسپتورهای اوپیوئیدی اعمال می نمایند. ضرورت انجام مطالعات تکمیلی نظیر تخلیص و جداسازی عصاره و رسپتور بایندینگ ضروری به نظر می رسد. لازم بذکر است که در مطالعه پیشین دوز سمیت 4gr/kg و دوز کشنده 6gr/kg گزارش شده است. این دوزها فاصله حداقل دو برابری با دوز ضددردی دارند. در ضمن در دوزهای ضددرد اثر کاهش فعالیت حسی حرکتی مشاهده نشده است. یعنی اثر ضد دردی ناشی از عصاره نمی تواند ناشی از تضعیف سیستم حسی حرکتی حیوان باشد. آزمون های تکمیلی تر نظیر Activiting manitoring می تواند بر ارزش این اطلاعات بیفزاید.

به هرحال نتایج این مطالعه اثرات ضد دردی عصاره بن سرخ را با آزمون Tail Flick تایید می کند و ضمن اینکه در آزمون Hot Plate این اثر ضددرد مرکزی تایید شد، علاوه بر این دیده شد که با از استفاده یک آنتاگونیست رسپتورهای اوپیوئیدی یعنی نالوکسان این اثر ضد دردی عصار معکوس می شود که مطالعات شیمیایی تجزیه عصاره نشان دهنده وجود مواد ترکیبات اوپیوئیدی می باشد.

اطلاعات بدست آمده از این تحقیق که تاییدی بر اثرات ضد دردی عصاره بن سرخ می باشد. با توجه به اینکه جوشانده گیاه بن سرخ برای رفع دردهای نظیر کلیه درد استفاده می شود می توان در مطالعات انسانی از جوشانده عصاره با رعایت دوز های سمیت بدست آمده بهره گرفت هرچند که تکرار مطالعه روی گونه ای دیگر حیوانی بر مطالعات انسانی ارجح است.

References

1- معطر، ف. تاریخچه استفاده از گیاهان دارویی، دانشکده داروسازی و علو دارویی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان (1376) 5-3

2. Elisabetsky E, Amador TA, Albuquerque RR, Nunes DS, Carvalho ACT. Analegesic activity of psychotria colorata (wild. ExR. And S.) Muell. Arg. Alkaloids J. Ethnopharmacology, 1992; 48: 77-83

3- پارسا ا، فلورا ایرانیکا، کارل هینز رشینگر (آلیاسه)، 1383، جلد 3، ص: 84

4- Rechinger. K H: Flora Iranica Vol. 165, page 223.

5- ویسکرمی غ ح، مطالعه فلورسیتیک منطقه کوه سفید لرستان، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، به راهنمایی دکتر احمد قهرمان 1379.

6- شفیع زاده ف، گیاهان دارویی لرستان، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، چاپ اول، 1381، ص: 49

7- خاکساریان م، برسی اثرات ضددردی سه گیاه دارویی بن سرخ (Allium Jesdianum Boiss & Bushe)، بابونه (Matricaria Urea) و پونه کوهی (Ziziphora Clinopodoides) در موش صحرایی نر، طرح شماره 55 /82، سال 1383.

8. D'Amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensetion, J. Pharmacol. EXP Therap, 1941; 72: 74-79

9. Beaver WT. Mild Analgesic, a review of their clinical pharmacology. Am J Med Sci, 1965; 250: 577-604

10. Tjolsen A, Berge OG, Hunkaar Rosland J H, Hole K. The formalin test: an evaluation method Pain, 1992; 51: 5-17

11. Mimaki Y, Kuroda M, Fukasawa T, Sashida Y. Steroidal glycosides from the bulbs of Allium jesdianum. Journal Nat Prod. 1999; 62(1): 194-197

12. Ekaterina paleakov, Study on quinolini antagonists of immunostimulator CPG-oligodex- ynuclcotedis, Bioorganic and medicinal chemistry , 1999; 24: 87-94

13. Adams RP. Identification of essential oil Components by gas chromatography/ mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Illinoise. 1994: 235-237