

اثر ضد التهابی عصاره الکلی بذر گیاه داتوره در موش‌های صحرایی نر

دکتر محسن خلیلی* دکتر محسن ناصری** مسعود اطمیابی*** ساناز جوانبختی***

Anti-inflammatory effect of alcoholic extract of *Datura stramonium* seeds in male rats

M Khalili☆ M Naseri M Atyabi S Javanbakhti

دریافت: ۸۳/۱۱/۲۹ پذیرش: ۸۴/۹/۱۳

*Abstract

Background: Regarding the incomplete treatment and occurrence of side effects by chemotherapeutic agents in patients suffering from inflammation, new effective strategies are strongly needed.

Objective: To investigate the anti-inflammatory effect of alcoholic extract of *Datura stramonium* seeds on inflammation.

Methods: This was an experimental study carried out in medical school of Shahed university. Induction of acute inflammation was achieved by injecting formalin, xylene and acetic acid into hind paw, ear, and peritoneum of male mice, respectively. The light absorption values of solution (Evince blue dye in circulation) collected from segments with inflammation, considered as data. In chronic inflammation, the data was obtained by weighing of cotton plate implanted into groin region after 7 days. In treatment group the extract (50 mg/kg) was injected (i.p) 20 minutes before the experiments.

Findings: The size of inflammation produced by formalin and acetic acid was significantly reduced ($52.28 \pm 2.2\%$ and $28.8 \pm 3.6\%$), respectively. Comparing the data associated with the weight of implanted cotton plates, the extract showed to have little effect on decreasing the size of chronic inflammation, yet statistically significant ($p < 0.05$).

Conclusion: The data of present study showed that the alcoholic extract of *Ds* seed is of ability to markedly reduce the amount of inflammation in particular the acute form.

Keywords: Inflammation, *Datura*, Medicinal Plant

*چکیده

زمینه: عدم درمان قطعی و کامل التهاب توسط داروهای شیمیایی، نیاز به تحقیق در این زمینه را با روش‌ها و داروهای جدید اجتناب‌ناپذیر کرده است.

هدف: مطالعه به منظور تعیین اثر ضد التهابی عصاره الکلی بذر گیاه داتوره بر التهاب حاد و مزمن در موش انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۸۳ در دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد انجام شد، التهاب با سه روش تزریق فرمالین، گزین یا اسید استیک به کف پا، گوش یا داخل صفاق موش‌ها ایجاد شد. اندازه‌گیری میزان التهاب با تعیین جذب نوری محلول جدا شده از این اعضا (محلول آبی ایوانس که قبلاً به داخل گردش خون تزریق شد) انجام گرفت. برای التهاب مزمن وزن پلیت پنبه‌ای کاشته شده در ناحیه کشاله ران حیوان پس از ۷ روز اندازه‌گیری شد. در گروه درمان ۲۰ دقیقه قبل از آزمون عصاره گیاه با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تزریق می‌شد.

یافته‌ها: عصاره الکلی گیاه داتوره، التهاب پا و صفاق را به شکل معنی‌داری به ترتیب به میزان $52.28 \pm 2.2\%$ و $28.8 \pm 3.6\%$ کاهش داد. مقایسه داده‌های حاصل از وزن پنبه کاشته شده در ناحیه کشاله ران موش‌ها نشان داد که التهاب مزمن به میزان کم ولی معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌ها، عصاره بذر گیاه داتوره به میزان مشخصی در کاهش التهاب مزمن و به میزان بیش‌تر در کاهش التهاب حاد مؤثر است.

کلیدواژه‌ها: التهاب حاد، داتوره، گیاهان دارویی

* دانشیار فیزیولوژی دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد تهران

*** دانشجوی پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد تهران

** استادیار فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد تهران

آدرس مکاتبه: تهران، بلوار کشاورز، خیابان دهکده، دانشکده پزشکی شاهد، گروه فیزیولوژی، صندوق پستی ۱۴۱۵۵-۷۴۳۵

☆E.mail: najafabady@yahoo.com

*** مقدمه :**

التهاب به خصوص نوع مزمن آن از عوارض شایع بسیاری از بیماری‌هاست که در آن سیستم ایمنی بدن تضعیف می‌شود. این فرایند علاوه بر ایجاد مشکلات عفونی، روند بهبود بیماری را هم به تعویق می‌اندازد. اگر چه امروزه با استفاده از داروهای شیمیایی رایج مانند انواع گلوکوکورتیکوئیدها گام‌های مؤثری در کاهش میزان التهاب برداشته شده است، اما عوارض شدید این داروها و اجتناب ناپذیرند. از این‌رو تحقیقات جدید، استفاده از طب مکمل به خصوص گیاه درمانی را به عنوان درمان کم هزینه و با حد اقل عوارض جانبی معرفی می‌نماید.^(۱)

گیاه داتوره (*Datura stramonium, D.s*) از جمله گیاهان دارویی است که در طب قدیم ایران به عنوان گیاه ضد آماس معرفی شده است.^(۱) تحقیقات اخیر، اثرات ضد درد، ضد اسپاسم و ضد باکتریایی این گیاه را نشان داده‌اند.^(۲و۳و۴و۵) همچنین کاربرد این گیاه در درمان بسیاری از انواع بیماری‌های عفونی ذکر شده است.^(۶) در بعضی از جوامع از این گیاه به عنوان یک ماده مخدر به خصوص جهت ایجاد توهم استفاده می‌شود.^(۷و۸) اگرچه سوء استفاده از این گیاه می‌تواند عوارض آنتی‌کولینرژیکی ایجاد نماید، اما مرگ ناشی از مصرف زیاد این گیاه هنوز گزارش نشده است.^(۸) بروز عوارض ناشی از مصرف زیاد این گیاه بیش‌تر به علت وجود آکالوئیدهای آنتی‌موسکارینیک موجود در گیاه است.^(۹) از سوی دیگر اثرات ضد التهابی داروهای آنتی‌کولینرژیک در بعضی از موارد گزارش شده است.^(۱۰و۱۱و۱۲) لذا با توجه به مشکل درمان التهاب به خصوص نوع مزمن آن و بر اساس گزارش‌های ضد آماسی موجود از گیاه داتوره، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثرات ضد التهابی (حاد و مزمن) عصاره الکلی بذر گیاه داتوره انجام شد.

*** مواد و روش‌ها :**

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۳ در دانشکده پزشکی شاهد بر روی ۱۲۰ موش صحرایی نر از جنس NMRI در محدوده وزنی ۳۰۰ تا ۳۵۰ گرم انجام شد. حیوانات در شرایط دمایی و طول شب و روز یکسان با دسترسی آزاد به یک نوع آب و غذا نگهداری می‌شدند. در هر یک از آزمون‌های التهابی سه گروه موش وجود داشتند: (۱) شاهد بدون التهاب (فقط تزریق آبی ایوانس)، (۲) شاهد التهاب (ایجاد التهاب و قرائت جذب نوری) و (۳) درمان (به دنبال ایجاد التهاب عصاره گیاه را هم دریافت می‌کردند). در هر یک از گروه‌ها بین ۱۰ تا ۱۵ عدد موش آزمایش می‌شد.

برای تهیه عصاره، بذر گیاه داتوره پس از جدا کردن ناخالصی‌ها آسیاب شد. سپس پودر گیاه با نسبت وزنی ۱ با الکل متانول ۷۰ درصد با نسبت حجمی ۴ به مدت ۲۴ ساعت در محیط آزمایشگاه نگهداری و بعد به وسیله کاغذهای صافی بزرگ و کوچک، فیلتراسیون دقیق انجام شد. عصاره خالص در حمام بافتی ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا الکل آن به‌طور کامل تبخیر شود. عصاره خشک به صورت پودر در آمده و به وسیله نرمال‌سالین غلظت‌های متفاوت بر حسب میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم تهیه شد.

در تحقیق حاضر از چندین روش جهت ایجاد و بررسی التهاب حاد و مزمن استفاده شد. در یک روش فرمالین ۲/۵ درصد با حجم ۵۰ میکرولیتر به کف پای موش‌ها تزریق می‌شد. سپس حیوانات با تزریق کتامین (۷۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بی‌هوش شده و در ادامه، عمل کانول‌گذاری در نای حیوان صورت گرفته و تنفس حیوان توسط دستگاه تنفس مصنوعی برقرار می‌شد. در مرحله بعد حیوان وارد مراحل جراحی شده، با باز کردن ناحیه قفسه سینه و آشکار شدن قلب از طریق بطن چپ عمل تزریق ایوانس بلو با دوز ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلو انجام می‌شد^(۱۳) (این ماده متناسب با میزان التهاب از عروق ناحیه ملتهب می‌گذرد و وارد فضای بین بافتی

مایع صفاق جمع‌آوری و جذب نوری آن قرائت می‌شد.^(۱۳)

برای سنجش التهاب مزمن از کاشت پنبه در ناحیه کشاله ران استفاده شد. برای انجام این آزمون در ابتدا موش‌ها با داروی کتامین بی‌هوش می‌شدند. بعد از آن با ایجاد یک شکاف کوچک در ناحیه کشاله ران (در دو طرف)، قطعه‌ای از پنبه رول (دندان پزشکی) با وزن ۳۰ میلی‌گرم آغشته به آمپی‌سیلین (ویال ۱ گرمی آمپی‌سیلین در ۵ سی‌سی آب مقطر حل می‌شد) در این ناحیه کاشته می‌شد. پس از بخیه کردن ناحیه برش خورده و به هوش آمدن، حیوان به مدت ۷ روز در حیوان‌خانه نگهداری می‌شد و پس از آن با بی‌هوشی مجدد و برش ناحیه کشاله ران پنبه‌های کاشته شده بیرون آورده می‌شدند. پس از خشک شدن پنبه‌ها در درجه حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت هر یک وزن شده، تفاوت وزن پنبه قبل و بعد از کاشت به عنوان میزان التهاب در نظر گرفته می‌شد. در گروه درمان، بهترین مقدار مؤثر عصاره گیاه داتوره (۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلو) هر دو روز یک مرتبه به حیوان تجویز می‌شد.^(۱۳)

در نهایت نتایج هر یک از گروه‌ها بر حسب میانگین به اضافه انحراف معیار از میانگین (Mean±SEM) تعریف شد. سپس مقایسه بین دو گروه شاهد و آزمون در هر یک از آزمون‌ها به کمک Student t-test انجام شد. $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری داده‌ها در نظر گرفته شد.

* یافته‌ها :

مقایسه داده‌های جذب نوری محلول جدا شده از اعضای حیوان‌های گروه شاهد، شاهد بدون التهاب و گروه آزمون نشان داد که عصاره گیاه داتوره به مقدار معنی‌داری میزان التهاب فرمالینی را در پا کاهش داد. این عصاره در کاهش التهاب ناشی از گزین در گوش فاقد اثر مشخص بود، ولی التهاب ناحیه صفاق را به مقدار معنی‌داری کاهش داد (جدول شماره ۱).

می‌شود). حدود نیم ساعت بعد از تزریق ایوانس بلو، پای حیوان از ناحیه مچ جدا شده، با قیچی به قطعه‌های کوچک‌تر تبدیل و در ظرف حاوی استون + سولفات سدیم (۱ درصد) به ترتیب به نسبت ۳/۵ به ۱/۵ قرار می‌گرفت. ظرف محتوی پا به همراه محلول‌های مربوطه به مدت ۲۴ ساعت بر روی دستگاه شیکر افقی (شرکت Ika-vibrax) قرار می‌گرفت (در این مدت ایوانس بلو از داخل پا وارد محلول استون + سولفات سدیم می‌شد). ظروف حاوی پا و محلول‌های مربوطه به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفوژ شده (سانتریفوژ Sigma 4-10) و در نهایت جذب نوری مایع سانتریفوژ شده در ۶۲۰ نانومتر قرائت می‌شد. میزان جذب نوری با توجه به میزان ماده رنگی نشان‌دهنده میزان التهاب بود. در گروه درمان، عصاره گیاه داتوره به مقدار ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلو حدود ۲۰ دقیقه قبل از تزریق ایوانس آبی به صورت داخل صفاقی تزریق می‌شد.

در روش دوم که التهاب حاد گوش بود از گزین (۰/۳ میلی‌لیتر) استفاده می‌شد. به دنبال بی‌هوشی و برقراری تنفس مصنوعی از طریق نای گزین به صورت زیرپوستی بر روی لاله گوش حیوان تزریق می‌شد. حدود یک ساعت بعد از تزریق گزین (حداکثر مدت بروز التهاب) ایوانس آبی با روش به کار برده شده در آزمون فرمالین تزریق می‌شد. مشابه روش توضیح داده شده قبلی گوش‌ها از نقطه مشخصی بریده، تکه تکه شده و در محلول استون + سولفات سدیم قرار گرفته و در نهایت جذب نوری محلول به دست آمده سنجیده می‌شد. در حیوان‌های گروه درمان، عصاره گیاه داتوره (۵۰ میلی‌گرم برای هر کیلو) حدود ۲۰ دقیقه قبل از تزریق ماده رنگی به حیوان‌ها تزریق می‌شد.^(۱۳)

در روش سوم یعنی التهاب صفاق، اسید استیک ۰/۰۷ درصد با مقدار ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلو به صورت داخل صفاقی تزریق می‌شد. پس از گذشت حدود ۲۰ دقیقه مطابق روش توضیح داده شده قبلی، ماده رنگی آبی ایوانس تزریق، سپس

جدول ۱- مقایسه میانگین جذب نوری آبی ایوانس مستخرج از قطعات پا (التهاب فرمالینی)، گوش (التهاب با گزین) و مایع صفاقی (التهاب با اسید استیک)

گروه	داتوره (التهاب + درمان)	شاهد (دارای التهاب)	شاهد (بدون التهاب)
پا	۰/۱۶۵±۰/۰۳۵ ***	۰/۲۱۷±۰/۰۳۸ +++	۰/۱۴۶±۰/۰۲۲
گوش	۱/۷۸±۰/۰۵۶	۱/۸۹±۰/۰۵۶ +	۱/۵۱±۰/۰۲۳
صفاقی	۰/۷۷±۰/۰۵۶ **	۱/۰۹±۰/۰۵۶ +++	۰/۶۵±۰/۰۴۵

$p < 0.05$ +, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ *** و $+++ p < 0.001$

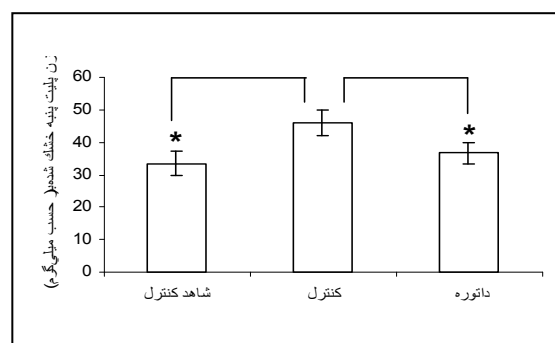
* سطح معنی داری بین گروه درمان و شاهد التهاب + سطح معنی داری بین گروه شاهد التهاب و شاهد بدون التهاب

می توان گفت این نوع التهاب در مرحله دوم درد فرمالین قرار گرفته است (زمان صفر تا ۱۵ دقیقه بعد از تزریق فرمالین به عنوان مرحله اول و زمان ۱۵ تا ۶۰ مرحله دوم درد فرمالینی هستند). حال با توجه به این که در مرحله دوم بیش تر مواد واسطه التهابی محیطی هستند که عامل ایجاد درد هم می شوند می توان نتیجه گرفت که به احتمال زیاد روند آزادسازی این واسطه ها کاهش چشمگیری داشته است. (۱۶ و ۱۴) از طرفی با توجه به آزاد شدن این واسطه ها به دنبال مرحله اول فرمالینی یا مرحله حاد که در آن گیرنده های درد تحریک می شوند و همچنین محتوای غنی بذر گیاه از آلکالوئیدهای تقویت کننده سیستم اویپوئیدی (که موجب اثرات ضد دردی قوی این گیاه می شود) و اثبات آزمون فرمالین به عنوان یک آزمون استاندارد ایجاد درد و التهاب؛ به نظر می رسد مهار یا کاهش رهاسازی واسطه های التهابی ناشی از تزریق فرمالین عامل اصلی کاهش التهاب توسط این گیاه باشد. (۱۷ و ۱۸ و ۱۹)

با توجه به این که در التهاب ناشی از تزریق اسید استیک، اسید به طور مستقیم باعث افزایش نفوذ پذیری غشای مویرگی می شود، گیاه توانسته است از میزان افزایش نفوذ پذیری عروق صفاق به دنبال تزریق اسید استیک بکاهد. با مقایسه داده های التهاب فرمالینی و التهاب ناشی از تزریق اسید استیک می توان نتیجه گرفت که به احتمال زیاد کاهش نفوذ پذیری عروقی یکی از آثار عصاره در کاهش میزان التهاب است. در مورد التهاب

وزن پنبه کاشته شده در ناحیه کشاله ران موش های گروه شاهد التهابی نسبت به گروه شاهد بدون التهاب حدود ۳۸/۰۵ درصد افزایش نشان داد که این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود ($p < 0.001$). همچنین به کارگیری عصاره گیاه سبب کاهش التهاب به میزان ۲۰/۶۲ درصد شد ($p < 0.01$) (نمودار شماره ۱).

نمودار ۱- مقایسه میزان التهاب مزمن ناشی از کاشت صفحه در ناحیه کشاله ران در گروه های مورد مطالعه



* بحث و نتیجه گیری :

این مطالعه نشان داد عصاره الکلی بذر گیاه داتوره قادر است التهاب حاد ناشی از تزریق فرمالین در کف پا و اسید استیک در ناحیه صفاق را به طور معنی داری کاهش دهد. همچنین التهاب مزمن ناشی از کاشت پنبه در ناحیه کشاله ران هم به مقدار مشخص توسط این عصاره کاهش یافت.

با توجه به این که التهاب ناشی از تزریق فرمالین حدود یک ساعت بعد از اعمال فرمالین ارزیابی می شود،

4. Young P. Nurs mirror (NM) goes to China. *Nurs Mirror* 1977; 145 (25): 6-8
5. Borruat FX, Piguat B, Herbort CP. Acute posterior multifocal placoid pigment epitheliopathy following mumps. *Ocul Immunol Inflamm* 1998; 6:189-93
6. Andrew A, Chevallier MN. The encyclopedia of medicinal plant. London, Dorling Kindersley book, 1996, 171
7. Schulman ML, Bolton LA. Datura seed intoxicification in two horses. *J SAfr Vet Assoc* 1998; 69 (1): 27-9
8. Piva G, Piva A. Anti-nutritional factors of Datura in feedstuffs. *Plant Toxin* 1995; (4) 238-41
9. Hasan SS, Kushwaha Ak. Chronic effect of datura (seed) extract on the brain of albino rats. *Jpn J Pharmacol* 1987; (44) 1-6
10. Dethloff LA, Chang T, Courtney CL. Toxicological comparison of a muscarinic agonist given to rats by gavage or in the diet. *Food Chem Toxicol* 1996; 34:407-22
11. Bhattacharya SK, Sen AP, Das Gupta G, Seth K, Seth PK. Central muscarinic receptor subtypes and carrageenin-induced paw oedema in rats. *Res Exp Med* 1991;191: 65-76
12. Balestrieri B, Capasso L, Masiello S, Castaldo S, Capasso F. Scopolamine and its pharmacological effect on some experimental inflammation tests. *Clin Ter* 1980; 31: 127-36
13. Hoesinzadeh H, Ramezani M, Salmani G. Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of Zataria multifera Boiss extract in mice and rat. *J Ethnopharmacol* 200; 73: 379-85
14. Murray MD, Brater DC. Renal toxicity of the nonsteroidal anti inflammatory drugs. *An Rev Pharmacol Toxicol* 1993; 33: 435-65

مزمّن در ناحیه کشاله ران حیوان، عصاره گیاه اثری جزئی اما معنی‌دار داشت. به نظر می‌رسد فرایندهای التهابی مزمّن به حدی قوی هستند که باعث می‌شوند اثر عصاره گیاه در این نوع التهاب کم‌تر از التهاب حاد باشد.

با توجه به عدم تأثیر عصاره در التهاب ناشی از تزریق گزین در گوش (اگرچه این نوع التهاب از نوع حاد است)، احتمال می‌رود میزان التهاب ایجاد شده در گوش توسط گزین برای اعمال اثر عصاره ناچیز بوده است. اگرچه خون‌رسانی کم‌تر در ناحیه گوش را هم نمی‌توان از نظر دور داشت.

به طور کلی این مطالعه نشان داد که عصاره الکلی بذر گیاه داتوره قادر است انواع التهاب حاد و مزمّن به خصوص نوع حاد آن را کاهش دهد. احتمالاً با توجه به کاهش میزان التهاب صفاق می‌توان کاهش نفوذپذیری عروقی را یکی از علت‌های مهم در کاهش میزان التهاب توسط عصاره بذر گیاه داتوره دانست. در مورد میزان و مقدار رهائش واسطه‌های التهابی درگیر در پدیده التهاب باید تحقیق‌های ایمنی‌شناسی تکمیلی انجام شود.

* سپاسگزاری :

بدین وسیله از همکاری خانم فریبا انصاری قدردانی می‌شود.

* مراجع :

۱. خراسانی ع. مخزن الادویه. تهران، انتشارات آموزش انقلاب اسلامی، ۱۳۷۱، ۵-۳۲۴
2. Abena AA, Miguel LM, Mouanga A, Hondi Assah T. Evaluation of analgesic effect of Datura Fastuosa leaves and seed extracts. *Fitoterapia* 2003, 74(5): 486-8
3. Muller MJ, Huizinga JD, Collins SM. Altered smooth muscle contraction and sodium pump activity in the inflamed rat intestine. *Am J Physiol* 1989; 257:570-7

18. Lewis JW, Cannon JT, Liebeskind JC. Involvement of central muscarinic cholinergic mechanisms in opiate stress analgesia. *Brain Res* 1983; (270) 289-93
19. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989; 38: 347-52
- 20.Coderre TJ, Grimes W, Melzack R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res* 1990; 535: 155-8
15. Attiso MA. Medicinal plant make a comeback. *Unesco Cour* 1979; 7: 7-8
16. Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992; 51: 5-17
17. Pert A, Maxey G. Asymmetrical cross-tolerance between morphine and scopolamine induced antinociception in the primate: differential sites of action. *Psychopharmacologia* 1975; 44: 139-45