

مقایسه اثرات ضد دردی و ضد التهابی عصاره‌های گیاه بومادران زرد و سنبله بر روی التهاب کوتاه‌مدت ناشی از ادجوانت کامل فروند در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار

الهه تکیه^۱ (M.Sc.)، اختر اکبری^۱ (M.Sc.)، هما مناہجی^۱ (Ph.D.)، شمس‌علی رضازاده^۲ (Ph.D.)، جلال زرین‌قلم^{۱*} (Ph.D.)

۱- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، گروه فیزیولوژی

۲- پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی

چکیده

سابقه و هدف: سیستم ایمنی یکی از عوامل مهم دخیل در اتیولوژی و پاتوفیزیولوژی التهاب است. گیاهان دارویی یکی از عوامل غیراختصاصی تعدیل‌کننده‌ی فعالیت سیستم ایمنی می‌باشند. بر همین اساس و با توجه به نقش مهم سایتوکاین IL-6 در القا التهاب و هایپرآلرژی، طی این مطالعه اثرات عصاره‌های متانولیک و چربی‌زدایی شده گیاهان بومادران زرد (*Achillea Santolina*) و سنبله (*Stachys Athorecalyx*) بر روی التهاب کوتاه‌مدت ناشی از تزریق ادجوانت کامل فروند (Complete Freund's adjuvant, CFA) در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: التهاب در روز صفر با تزریق کف‌پایی CFA القاء شد. عصاره‌های متانولیک و چربی‌زدایی شده‌ی هر دو گیاه از بخش‌های هوازی آن‌ها تهیه شده و به صورت روزانه تا ۶ روز پس از تزریق CFA به صورت داخل صفاقی مورد استفاده قرار گرفت. دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای یک گیلوگرم از عصاره‌های هر گیاه برای تزریق استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه بیان‌گر اثرات وابسته به دوز عصاره گیاهان بومادران زرد و سنبله بر روی ادم-هایپرآلرژی و سطوح سرمی IL-6 در طی التهاب بود. تجویز عصاره‌های متانولیک و چربی‌زدایی شده‌ی گیاه سنبله به طور معنی‌داری باعث کاهش علائم التهابی شد و تفاوت مشخصی در تأثیر این دو نوع عصاره وجود نداشت. در مورد گیاه بومادران زرد تنها عصاره متانولیک آن دارای اثرات ضد التهابی معنی‌داری طی این مطالعه بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد که از یک سو عصاره‌های گیاهان سنبله و بومادران در کاهش وابسته به دوز علائم التهابی به‌ویژه هایپرآلرژی، ادم و IL-6 سرمی طی التهاب کوتاه‌مدت ناشی از تزریق CFA موثر بوده و از سوی دیگر دوز و عوامل موثر ضد التهابی عصاره‌های این دو گیاه با هم متفاوت می‌باشد که نیاز به بررسی‌های پیش‌تری دارد.

واژه‌های کلیدی: هایپرآلرژی، التهاب، عصاره، بومادران زرد، سنبله، رت

مقدمه

می‌کند [۱]. التهاب را می‌توان نتیجه‌ای از افزایش سریع ترشح میانجی‌های التهابی دانست که منجر به ایجاد علائمی مثل درد و ادم می‌شود [۲]. برای درمان التهاب درمان‌های متعددی از

التهاب مجموعه‌ای از فرآیندهای پیچیده است که بسیاری از سیستم‌های بدن از جمله سیستم ایمنی و عصبی را درگیر

مثل: آرتريت، گاستريت، آسم و انواع بیماری‌های کبدی مورد استفاده قرار می‌گرفته است [۲۱،۲۰].

بومادران زرد (*A. Santalina*)، با گل‌های زرد رنگ کوچک که در ایران به طور سنتی با عنوان بومادران شناخته می‌شود برای درمان التهاب و بیماری‌های باکتریایی مورد استفاده قرار می‌گرفته است. برخی مطالعات اثرات ضد التهابی بومادران را بر روی فاز حاد التهاب (در ۲۴ ساعت نخست پس از تجویز کاراژینان) نشان داده‌اند [۲۳،۲۲].

التهاب ناشی از ادجوانت کامل فروند (Complete Freund's adjuvant, CFA) به طور معمول برای ایجاد مدل‌های حاد و مزمن التهاب در حیوانات آزمایشگاهی و مطالعه اثرات داروهای مختلف بر روند التهاب و علائم التهابی استفاده می‌شود. نتایج مطالعات بیانگر القاء ادم، هایپرآلرژی و افزایش سطوح سرمی IL-6 طی هفته اول پس از تزریق کف پایی CFA است [۲۴]. مطالعات قبلی اثرات ضد التهابی حاد (چند ساعته) و پیش‌درمانی هر دو نوع عصاره گیاهان بومادران زرد و سنبله را نشان داده شده‌اند ولی با توجه به این‌که طی بیماری‌های التهابی عموماً مصرف دارو توسط افراد بعد از بروز علائم می‌باشد، بنابراین هدف از این مطالعه بررسی تاثیر تجویز کوتاه مدت (۶ روزه) عصاره‌های متانولیک و چربی‌زدایی شده گیاهان بومادران زرد و سنبله در تغییرات ادم، هایپرآلرژی و مقادیر IL-6 سرمی طی التهاب ناشی از CFA در موش‌های صحرایی نر و مقایسه اثرات آن‌ها باهم‌دیگر در نظر گرفته شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و عصاره‌گیری گیاهان. قسمت‌های هوازی هر دو گیاه بومادران زرد و سنبله در طی زمان گل‌دهی جمع‌آوری شده، در سایه خشک شده و در پژوهش‌کده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی شناسایی شدند. قسمت‌های هوازی تمییز و خشک شد و به صورت پودر ذخیره شدند. بخش‌های هوازی خشک شده (۵۰ گرم از بومادران زرد و ۲۰۰ گرم از سنبله) به مدت ۷۲ ساعت در متانول ۹۹/۹٪ خیسانده شده و

جمله داروهای سنتتیک و گیاهان دارویی پیشنهاد می‌گردد [۳].

حدود ۸۰٪ از مردم جهان در کشورهای در حال توسعه زندگی می‌کنند که به دلیل گران بودن داروهای سنتتیک، عدم دسترسی و وجود عوارض جانبی این داروها گرایش زیادی به گیاهان دارویی دارند. این امر باعث شده در سال‌های اخیر استفاده از گیاهان دارویی رواج بسیار زیادی در جهان پیدا کرده و تحقیقات بسیار گسترده‌ای بر روی گونه‌های ویژه‌ای از گیاهان دارویی که دارای اثرات مناسبی بر روی بسیاری از بیماری‌های بشر دارند صورت گیرد [۴]. از جمله گیاهان دارویی که به طور سنتی در بسیاری از کشورها مانند چین، هند، ترکیه و ایران برای درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شده است *Stachys Athorecalyx* و *Achiella santolina* می‌باشند [۷،۶،۵].

گیاه *S. Athorecalyx* در ایران با نام سنبله شناخته شده و متعلق به گونه *Stachys* است. تاکنون بیش از ۳۰۰ گونه از این گیاه در جهان شناسایی شده که ۳۴ گونه آن در ایران موجود می‌باشد. به طور سنتی دم کرده قسمت‌های هوازی این گیاه برای درمان عفونت‌ها، آرتريت و بیماری‌های التهاب تنفسی مورد استفاده قرار می‌گرفته است [۹،۸]. مطالعات فارماکولوژیکی اولیه نشان داده‌اند که عصاره یا ترکیبات متعلق به گونه *Stachys* دارای اثرات ضد باکتریایی [۱۰]، آنتی‌اکسیداتیو [۱۱]، آنتی‌نفرتیک، ضد اضطراب، ضد استرس و ضد دردی است [۱۳،۱۲]. تحقیقات فیتوشیمیایی چندین گروه از ترکیبات موجود در این گیاه را شناسایی کرده‌اند که شامل: فنیل اتانئوئیدها [۱۴]، گلیکوزیدها، تربنئوئیدها، استروئیدها، دی‌ترین‌ها و فلاونوئیدها هستند [۱۷،۱۶،۱۵].

گونه *Achiellea (Asteraceae)* شامل بیش از ۱۰۰ رده می‌باشد که به طور عمده در نیمکره شمالی گسترده شده است. این گیاه شامل ترکیباتی از جمله گلیکو فلاونوئیدها است که در قسمت‌های هوازی گیاه شامل گل‌ها، برگ‌ها و ساقه آن همراه دیگر مواد لیپوفیلیک، تجمع پیدا کرده است [۱۹،۱۸]. در طب سنتی ایران دم کرده این گیاه برای درمان بیماری‌هایی

آزمایشگاهی نیز برطبق استانداردهای Zimmerman عمل شد.

ایجاد التهاب ناشی از CFA. التهاب به‌وسیله‌ی تزریق زیر جلدی $100 \mu\text{l}$ از *Mycobacterium tuberculosis* ضعیف شده حل شده در روغن معدنی استریل (Sigma, St Louis, MO, USA 10 mg/ml) در کف پای راست حیوانات در روز صفر ایجاد شد. در رت‌های کنترل تنها روغن معدنی استریل ($100 \mu\text{l}$) تزریق شد. روز اول بعد از تزریق CFA به کف پا ادم غیر دوطرفه ایجاد می‌گردد و این شرایط طی هفته اول بعد از تزریق نیز ادامه پیدا می‌کند.

سنجش ادم پا. برای تایید سنجش تزریق صحیح CFA، حجم هر پا قبل و بعد از تزریق در طی زمان‌های متفاوت مورد سنجش قرار گرفت. سنجش حجم پا به‌وسیله‌ی جابه‌جایی یک محلول الکترولیتی در پلتیسوموتر (model7141; Ugo Basile; Comerio VA, Italy) انجام شد. به‌طور خلاصه، پای رت‌ها درون یک محفظه‌ی شفاف حاوی محلول الکترولیتی شفاف فرو برده شد و حجم مایع جابه‌جا شده که با حجم پا برابر است به‌وسیله‌ی یک نشانگر دیجیتال نمایش داده شد. اندازه‌گیری حجم پا برای هر پا دو بار انجام و میانگین آن‌ها محاسبه شد. مقدار ادم به‌وسیله سنجش تفاوت حجم پا بین روز صفر و زمان‌های مختلف محاسبه شد. حجم اندازه‌گیری شده به‌وسیله‌ی درصد حجم نسبت به روز صفر گزارش شد.

سنجش هایپرآلژزی حرارتی. پس کشیدن پا (Paw withdrawal latency, PWL) در اثر حرارت به‌وسیله‌ی تست‌های کف‌پایی (Ugo Basile, Verse, Italy) در گروه‌های کنترل و آزمایش انجام شد. رت‌ها در اتاقک‌های پلکسی گلاس به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه قبل از آزمایش قرار داده شدند تا به محیط آزمایش عادت کنند. عقب کشیدن پا به‌طور اتوماتیک به‌وسیله‌ی تایمر دیجیتال که به یک منبع حرارتی متصل است ثبت شد PWL ۳ بار برای هر پا در یک فاصله زمانی ۵-۱۰ دقیقه سنجیده و مقدار میانگین محاسبه شد. مقدار محاسبه شده پای تزریق شده از مقدار محاسبه شده

عصاره متانولیک آن‌ها فیلتر شد. به منظور تهیه عصاره چربی‌زدایی شده، عصاره متانولیک به دو حجم مساوی تقسیم شده و یک قسمت آن به وسیله پترولیوم اتر (۴۰-۶۰) ۳ بار عصاره‌گیری شد. عصاره‌های متانولی و چربی‌زدایی شده به‌دست آمده پس از تغلیظ توسط دستگاه تقطیر (دمای دستگاه روتاری بین ۳۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود) در خلا در ظروف شیشه‌ای رنگی تا زمان انجام آزمایش نگهداری شدند.

بررسی فیتوشیمیایی. تست‌های فیتوشیمیایی نرمال به روش‌های استاندارد موجود به منظور شناسایی ساپونین، آلکالوئید و ترپنوئیدها انجام شد.

فرمولاسیون. عصاره‌های خشک شده در آب استریل تقطیر شده حاوی Tween80، به عنوان ماده حلال، حل شده، سپس به‌وسیله‌ی کاغذ صافی فیلتر شدن دو در نهایت محلول‌های فیلتر شده به منظور تزریق داخل صفاقی (ip) مورد استفاده قرار گرفتند. برای تعیین مقدار واقعی غلظت ذرات فیلتر شده کاغذهای صافی خشک شده و غلظت ذرات موجود بر روی آن محاسبه شد. عصاره گیاه *Achillea* با غلظت‌های 100 mg/m ، 150 و 200 و عصاره گیاه *Stachys* با غلظت‌های 50 mg/m ، 100 و 200 با توجه به مطالعات قبلی به صورت داخل صفاقی در حجمی کم‌تر از 1 ml استفاده شدند [۱۲-۲۲]. ایندومتاسین نیز به عنوان داروی استاندارد ضد التهابی غیر استروئیدی به روش بالا و در دوز 15 mg/m تزریق شد. حجم تزریق دارو در حدی بود که اندازه پا به دنبال تزریق دارو تغییری نشان نداد.

حیوانات آزمایشگاهی. در این آزمایش از رت‌های ویستار نر با میانگین وزنی $180-200$ گرم استفاده شد. رت‌ها در قفس‌های پلی‌پروپیلن در شرایط استاندارد (22 ± 2 درجه سانتی‌گراد - رطوبت ۶۰-۷۰٪ و سیکل زمانی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری شدند. غذا و آب کافی هم در اختیار همه حیوانات قرار گرفت. روش استفاده از حیوانات آزمایشگاهی براساس قوانین کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی بوده و برای ایجاد درد در حیوانات

گروهی از طریق Unpaired t-test برای تعیین اختلافات معنی دار مقادیر IL-6، ادم و هایپرآلرژی انجام شد. فاصله معنی داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

تست‌های فیتوشیمیایی. بررسی‌های فیتوشیمیایی عصاره‌ها وجود گلیکوزید ساپونین‌ها، تربنوییدها و فلاونوییدها را نشان داد. وجود آلکالوئیدها اثبات نشد. عصاره متانولی خشک شده دارای $16/1\%$ (w/w) از فلاونوییدها در عصاره بومادران و $68/0\%$ (w/w) در عصاره سنبله بود.

اثرات درمان کوتاه مدت (۶ روزه) با عصاره‌های متانولیک و چربی‌زدایی شده‌ی گیاه بومادران زرد بر روی التهاب ناشی از CFA. حجم پای راست بعد از تزریق CFA افزایش معنی‌داری را در روزهای ۳ و ۶ در مقایسه با روز صفر و گروه کنترل نشان داد ($P < 0.001$). تزریق سالی‌ن تاثیر معنی‌داری در تغییرات حجم پا در بررسی‌های plethysmometric نشان نداد. بررسی اثرات عصاره‌های متانولیک و چربی‌زدایی شده گیاه بومادران زرد نشان داد که: حجم پا در طی درمان کوتاه مدت (۶ روزه) با دوزهای عصاره متانولیک (۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ mg/kg) این گیاه کاهش مشخص و معنی‌دار وابسته به دوزی را در روزهای ۳ و ۶ نشان داد. تزریق عصاره متانولیک با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg این گیاه در مقایسه با گروه کنترل مثبت (تزریق CFA) تفاوت معنی‌داری را در حجم پا ایجاد نکرد در حالی که دوز ۲۰۰ mg/kg آن باعث کاهش معنی‌دار حجم پا در روزهای ۳ و ۶ بعد از تزریق CFA شد (به ترتیب $p < 0.05$ و $p < 0.001$). تزریق عصاره چربی‌زدایی شده گیاه بومادران با دوزهای فوق تغییر مشخصی را در حجم پا ایجاد نکرد. گروه تیمار شده با دوز موثر عصاره متانولیک گیاه بومادران زرد (۲۰۰ mg/kg) کاهش مشخص حجم پا را در روز ۶ بعد از تزریق CFA در مقایسه با گروه تیمار شده با ایندومتاسین (۵ mg/kg) نشان داد ($p < 0.001$)، اما در روز ۳ تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۱).

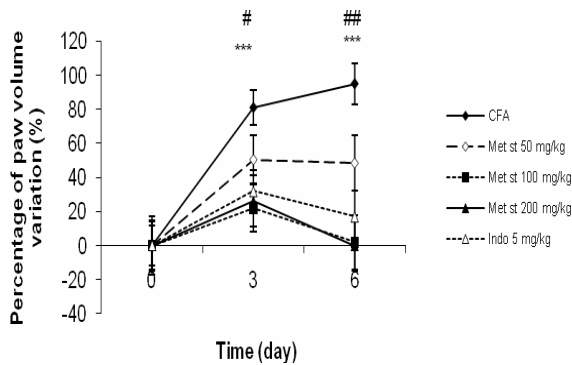
مربوط به پای دیگر کم شده و مقدار به‌دست آمده در صورت منفی بودن نشان‌دهنده هایپرآلرژی در پای مورد نظر است.

سنجش سطوح IL-6 سرمی در نمونه‌های خونی. نمونه خونی از عروق رتر و اوربیتال گوشه چشم رت‌هایی که به‌وسیله‌ی ایزوفلوران بی‌هوش شده بودند به‌وسیله‌ی لوله موین هپارینه تهیه شد. نمونه‌های خونی سانتریفیوژ شده و سرم حاصل در دمای -70°C درجه سانتی‌گراد ذخیره شد (تلاش شد نمونه‌گیری برای همه گروه‌ها در حدود $8-15:8$ دقیقه صبح انجام شود). سطوح سرمی IL-6 به‌وسیله‌ی کیت ELISA استاندارد رت (Bender Med System, Uk) سنجیده شد. محدوده‌ی سنجش حدود $13/2$ pg/ml بود. واکنش متقابل کیت با IL-6 سرم رت‌ها بر اساس دستورالعمل کیت سنجیده شد.

روش‌های آزمایشگاهی. برای تعیین اثرات عصاره‌ی گیاهان بومادران زرد و سنبله بر روی روند التهاب دوزهای مختلف از هر دو نوع عصاره متانولیک و چربی‌زدایی شده‌ی هردو نوع گیاه مورد آزمایش قرار گرفت. التهاب به‌وسیله‌ی تزریق CFA در کف پای رت‌ها ایجاد شد. حیوانات به دو گروه تحت درمان با عصاره بومادران زرد و سنبله تقسیم شدند. هر کدام از این گروه‌ها نیز به دو زیرگروه تحت درمان با عصاره چربی‌زدایی شده و متانولیک یک نوع گیاه تقسیم شدند که در سه گروه جداگانه دوزهای ۲۰۰، ۱۰۰ و ۵۰ mg/kg هر کدام از عصاره‌ها را به صورت داخل صفاقی به مدت ۶ روز بعد از تزریق CFA دریافت کردند. ($n=6/\text{group}$) هایپرآلرژی، ادم و سطوح IL-6 سرمی در روزهای صفر (قبل از تزریق CFA)، ۳ و ۶ (۳۰-۴۵ دقیقه بعد از تزریق عصاره) سنجیده شدند. ایندومتاسین به عنوان داروی ضد التهابی غیر استروئیدی استاندارد به صورت داخل صفاقی (ip) در گروه گروه کنترل مثبت تزریق شد (۵ mg/kg).

آنالیزهای آماری. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف از معیار استاندارد (SEM) گزارش شدند. آنالیزهای داخل گروهی با استفاده از ANOVA یک‌طرفه و بررسی‌های تکمیلی با استفاده از post hoc Tukey's و مطالعات بین

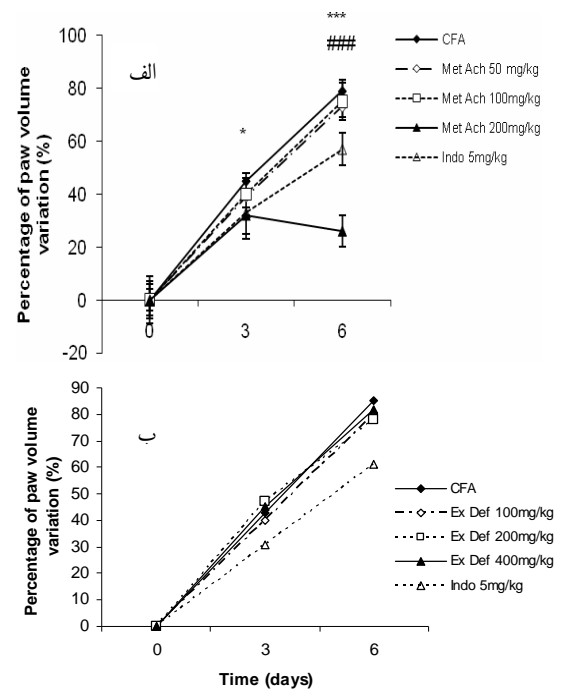
تیمار شده با ایندومتاسین (5 mg/kg) کاهش معنی‌دار حجم پا را در روز ۳ و ۶ بعد از تزریق CFA نشان داد (به ترتیب $p < 0.05$ و $p < 0.01$) (شکل ۲).



شکل ۲. اثرات عصاره‌های متانولیک گیاه سنبله (50، 100، 200 mg/kg) و ایندومتاسین (5 mg/kg) بر افزایش حجم پا ناشی از تزریق CFA. نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ بیان شده و $n = 6$ است.

$p < 0.001$ ***: مقایسه تاثیر تزریق دوزهای موثر عصاره متانولیک و چربی زدایی شده (200 و 100 mg/kg) گیاه سنبله بر روی کاهش حجم پا با گروه کنترل مثبت. $P < 0.05$ # و $p < 0.001$ ###: مقایسه تاثیر تزریق دوزهای موثر عصاره متانولیک و چربی زدایی شده گیاه سنبله با تزریق ایندومتاسین بر روی کاهش حجم Ex Met st. عصاره متانولیک سنبله.

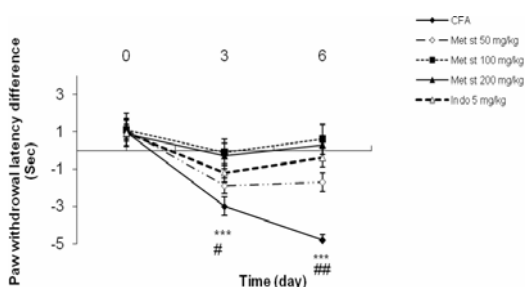
اثر درمان کوتاه مدت (6 روزه) با عصاره‌های متانولیک و چربی‌زدایی شده گیاه بومادران زرد بر روی هایپراآلژزی ناشی از CFA. هایپراآلژزی در روزهای ۳ و ۶ بعد از تزریق CFA در مقایسه با روز صفر و گروه کنترل افزایش مشخص و معنی‌داری را نشان داد درمان کوتاه مدت (6 روزه) با عصاره متانولیک گیاه بومادران زرد در دوزهای (50، 100، 200 mg/kg) باعث کاهش وابسته به دوز میزان هایپراآلژزی در مقایسه با گروه کنترل شد. تجویز دوز 200 mg/kg عصاره متانولیک آن باعث کاهش مشخص و معنی‌دار هایپراآلژزی در روزهای ۳ و ۶ بعد از تزریق CFA شد (به ترتیب $p < 0.01$ و $p < 0.001$) در حالی که دوزهای 50 mg/kg و 100 mg/kg اثر معنی‌داری را نشان نداد. مقایسه گروه تیمار شده با دوز موثر عصاره متانولیک گیاه بومادران زرد (200 mg/kg) با گروه تیمار شده با ایندومتاسین (5 mg/kg) کاهش مشخص هایپراآلژزی را در روز ۶ بعد از



شکل ۱. اثرات عصاره‌های متانولیک (الف) و چربی‌زدایی شده (ب) گیاه بومادران زرد (50، 100، 200 mg/kg) و ایندومتاسین (5 mg/kg) بر روی تغییرات حجم پا ناشی از تزریق CFA. نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ بیان شده و $n = 6$ است. $p < 0.05$ *، $p < 0.001$ ***: مقایسه تاثیر دوز موثر عصاره متانولیک (200 mg/kg) بر روی کاهش حجم پا با گروه کنترل مثبت و روز صفر در روزهای ۳ و ۶ بعد از تزریق CFA. $p < 0.001$ ####: مقایسه میزان تاثیر تزریق دوز موثر عصاره متانولیک گیاه بومادران زرد با تزریق ایندومتاسین بر روی کاهش حجم Ex Met. Achi: عصاره متانولیک بومادران Ex def Achi: عصاره چربی‌زدایی شده بومادران.

اثرات درمان کوتاه مدت (6 روزه) با عصاره‌های متانولیک و چربی‌زدایی شده گیاه سنبله بر روی التهاب ناشی از CFA. عصاره‌های چربی‌زدایی شده و متانولیک گیاه سنبله با دوزهای (50، 100، 200 mg/kg) تزریق شد و نتایج نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار در حجم پا بعد از تزریق دوزهای 100 و 200 mg/kg عصاره‌های چربی‌زدایی شده و متانولیک گیاه در روزهای ۳ و ۶ بود ($p < 0.01$). تفاوت معنی‌داری در میزان اثرگذاری دوزهای 100 و 200 mg/kg این گیاه وجود نداشت و دوز 100 mg/kg به عنوان دوز موثر این گیاه در نظر گرفته شد. دوز 50 mg/kg از این گیاه تاثیر معنی‌داری را در کاهش حجم پا نشان نداد. تزریق عصاره متانولیک و چربی‌زدایی شده گیاه سنبله در مقایسه با گروه

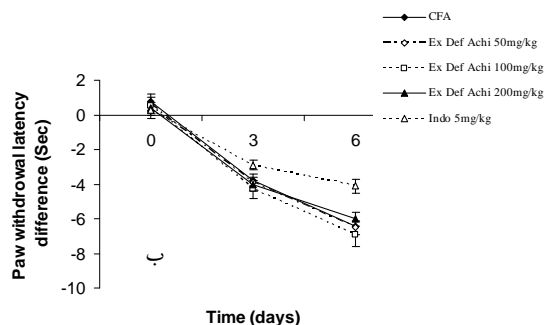
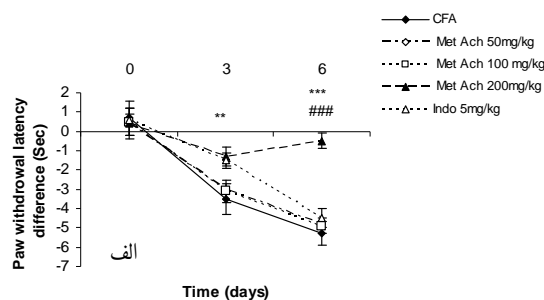
نداد. تفاوت مشخصی در میزان اثرگذاری دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg این گیاه بر روی وجود نداشت و دوز ۱۰۰ mg/kg به عنوان دوز موثر این گیاه در نظر گرفته شد. تزریق عصاره متانولیک و چربی‌زدایی شده گیاه سنبله در مقایسه با گروه تیمار شده با ایندومتاسین (۵ mg/kg) کاهش معنی‌دار هاپیرآلژی را در روز ۳ و ۶ بعد از تزریق CFA نشان داد (به ترتیب $p < 0.05$ و $p < 0.01$) (شکل ۴).



شکل ۴. اثرات عصاره‌های متانولیک گیاه سنبله (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ mg/kg) و ایندومتاسین (۵ mg/kg) بر روی افزایش هاپیرآلژی ناشی از تزریق CFA. نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ بیان شده و $n=6$ است. $p < 0.001$ ؛ مقایسه تاثیر دوزهای موثر عصاره متانولیک و چربی‌زدایی شده (۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg) بر روی کاهش هاپیرآلژی با گروه کنترل مثبت. $\# P < 0.05$ و $\## p < 0.001$ ؛ مقایسه تاثیر تزریق دوزهای موثر عصاره متانولیک و چربی‌زدایی شده گیاه سنبله با تزریق ایندومتاسین بر روی کاهش هاپیرآلژی Ex Met. st: عصاره متانولیک سنبله.

اثرات درمان کوتاه مدت (۶ روزه) با عصاره‌های متانولیک و چربی‌زدایی شده گیاه بومادران زرد بر روی سطح IL-6 سرمی در طی التهاب ایجاد شده به وسیله CFA. سطح IL-6 سرمی در روزهای ۳ و ۶ بعد از تزریق CFA در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد. تزریق عصاره متانولیک گیاهان بومادران و سنبله باعث کاهش وابسته به دوز سطح IL-6 سرمی شد. رت‌هایی که دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg عصاره متانولیک بومادران زرد و همچنین عصاره چربی‌زدایی شده آن را دریافت کردند تفاوت مشخصی را در سطح IL-6 در مقایسه با گروه کنترل طی ۶ روز مطالعه نشان ندادند. درمان با دوزهای ۲۰۰ mg/kg از عصاره متانولیک بومادران زرد باعث کاهش مشخص در میزان

تزریق CFA در گروه تیمار شده با بومادران نشان داد ($p < 0.001$)، اما در روز ۳ تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.



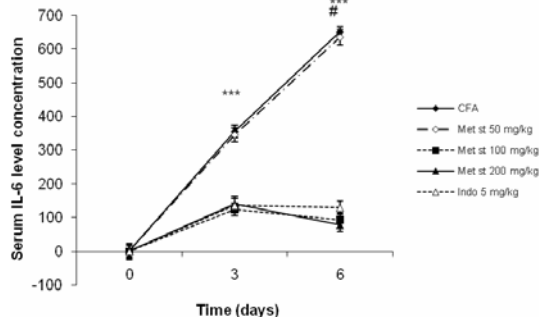
دوزهای متفاوت عصاره چربی‌زدایی شده گیاه بومادران زرد اثر مشخص و معناداری را بر روی هاپیرآلژی ناشی از CFA نداشت (شکل ۳).

شکل ۳. اثرات عصاره‌های متانولیک (الف) و چربی‌زدایی شده (ب) گیاه بومادران زرد (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ mg/kg) و ایندومتاسین (۵ mg/kg) بر روی هاپیرآلژی ناشی از تزریق CFA. نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ بیان شده و $n=6$ است.

$p < 0.001$ ، $* p < 0.01$ ؛ مقایسه تاثیر دوز موثر عصاره متانولیک (۲۰۰ mg/kg) بر روی کاهش هاپیرآلژی با گروه کنترل مثبت. $\### p < 0.001$ ؛ مقایسه تاثیر تزریق دوز موثر عصاره متانولیک گیاه بومادران زرد با تزریق ایندومتاسین بر روی کاهش هاپیرآلژی. Ex Met Achi: عصاره متانولیک بومادران Ex def Achi: عصاره چربی‌زدایی شده بومادران.

اثر درمان کوتاه مدت (۶ روزه) با عصاره‌های متانولیک و چربی‌زدایی شده گیاه سنبله بر روی هاپیرآلژی ناشی از تزریق عصاره‌های متانولیک و چربی‌زدایی شده گیاه سنبله با دوزهای (۱۰۰ و ۲۰۰) باعث کاهش مشخص هاپیرآلژی در روزهای ۳ و ۶ در مقایسه با روز صفر و گروه کنترل مثبت (تزریق CFA) شد (به ترتیب $p < 0.05$ و $p < 0.001$)، ولی دوز ۵۰ mg/kg آن اثر معنی‌داری را نشان

چربی‌زدایی شده‌ی گیاه سنبله (دوز موثر 100 mg/kg) در روز 6 بود ($p < 0.05$)، ولی در روز 3 تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (شکل 6).



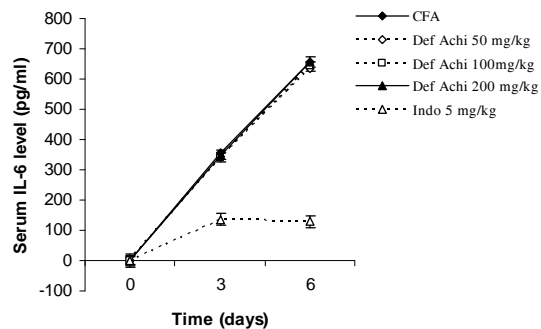
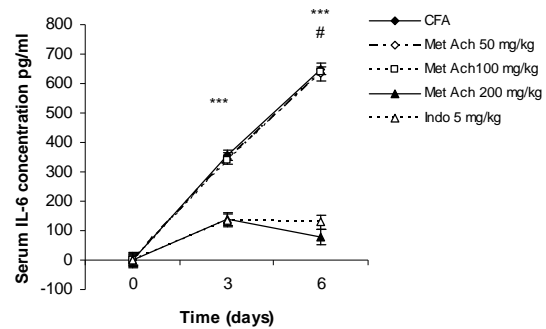
شکل 6. اثرات عصاره‌های متانولیک و چربی‌زدایی شده‌ی گیاه سنبله (50، 100، 200 mg/kg) و ایندومتاسین (5mg/kg) بر روی کاهش سطوح سرمی IL-6. نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ بیان شده و $n=6$ است. $p < 0.001$: مقایسه تاثیر دوزهای موثر عصاره متانولیک و چربی‌زدایی شده (100 و 200 mg/kg) بر روی کاهش سطوح سرمی IL-6 با گروه کنترل مثبت. $\#p < 0.05$: مقایسه میزان تاثیر تزریق دوزهای موثر عصاره متانولیک و چربی‌زدایی شده گیاه سنبله با تزریق ایندومتاسین بر روی کاهش سطوح سرمی IL-6. Ex Met st. عصاره متانولیک سنبله.

اثر ضد التهابی، ضد درد (آنتی‌هایپرآلژزیک) و تاثیر در مقادیر IL-6 سرمی عصاره‌های چربی‌زدایی شده و متانولیک سنبله در زمان‌های متفاوت تفاوتی با هم نداشتند (شکل نشان داده نشده است).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان داد که درمان کوتاه مدت (6 روزه) با عصاره گیاهان بومادران و سنبله باعث کاهش معنی‌دار و وابسته به دوز علائم التهاب ناشی از تزریق CFA به‌ویژه هایپرآلژزی و ادم می‌شود. طی این مطالعه تزریق روزانه داخل صفاقی عصاره متانولیک گیاه بومادران و عصاره متانولیک و چربی‌زدایی شده گیاه سنبله (دوزهای 50، 100 و 200 mg/kg) باعث کاهش معنی‌دار ادم، هایپرآلژزی و سطوح سرمی IL-6 طی التهاب کوتاه مدت (6 روزه) ناشی از CFA گردید.

سطوح IL-6 سرمی در روز 3 و 6 بعد از تزریق CFA در گروه آزمایش در مقایسه با گروه کنترل (تزریق CFA) شد ($p < 0.001$) (شکل 5).



شکل 5. اثرات عصاره‌های متانولیک (الف) و چربی‌زدایی شده‌ی (ب) گیاه بومادران زرد (50، 100، 200 mg/kg) و ایندومتاسین (5mg/kg) بر روی کاهش سطوح سرمی IL-6. نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ بیان شده و $n=6$ است.

$p < 0.001$: مقایسه تاثیر دوز موثر عصاره متانولیک (200 mg/kg) بر روی کاهش سطوح سرمی IL-6 با گروه کنترل مثبت. $\#p < 0.05$: مقایسه میزان تاثیر تزریق دوز موثر عصاره متانولیک گیاه بومادران با تزریق ایندومتاسین بر روی کاهش سطوح سرمی IL-6. Ex Met Achi: عصاره متانولیک بومادران Ex def Achi: عصاره چربی‌زدایی شده بومادران.

اثرات درمان کوتاه مدت (6 روزه) با عصاره‌های متانولیک و چربی‌زدایی شده‌ی گیاه سنبله بر روی سطوح IL-6 سرمی در طی التهاب ایجاد شده به‌وسیله CFA. تزریق عصاره‌های متانولیک و چربی‌زدایی شده‌ی گیاه سنبله با دوزهای (100 و 200 mg/kg) باعث کاهش مشخص سطوح IL-6 سرمی در روزهای 3 و 6 در مقایسه با روز صفر و گروه کنترل شد ($p < 0.001$) و دوز 50 mg/kg آن اثر معنی‌داری را نشان نداد (شکل 6). اثرات ایندومتاسین (5mg/kg) بر روی سطوح IL-6 سرمی کم‌تر از عصاره متانولیک گیاه بومادران (دوز 200 mg/kg) ($p < 0.05$) و عصاره متانولیک و

مطالعه‌ای که توسط اردستانی و همکارانش انجام شد فعالیت آنتی‌اکسیداتیو و حفاظتی عصاره متانولیک گیاه بومادران را در برابر رادیکال‌های آزاد طی فاز حاد التهاب ناشی از کارآزینان نشان داد [۲۱]. به نظر می‌رسد که از محدودیت‌های این مطالعه عدم امکان جداسازی کامل اجزا موثر هر کدام از عصاره‌ها و بررسی تاثیر جداگانه آن‌ها بر روند التهاب بود که شاید در بهبود کیفیت نتایج حائز اهمیت باشد.

از سوی دیگر نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق عصاره‌های متانولیک و چربی‌زدایی شده گیاه سنبله با دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg باعث کاهش معنی‌دار سطوح سرمی IL-6، ادم و هایپرآلرژی شد در حالی که در مورد گیاه بومادران فقط دوز ۲۰۰ mg/kg عصاره متانولیک آن موثر بود و دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg آن تاثیر معنی‌داری نداشت.

با توجه به نتایج این بخش از مطالعه چنین می‌توان استنباط کرد که اولاً عوامل ضد التهابی عصاره گیاه بومادران عمدتاً در بخش غیر قطبی عصاره (متانولیک) واقع شده‌اند ولی در مورد گیاه سنبله عوامل قطبی و غیر قطبی هر دو به یک میزان در تعدیل التهاب موثر می‌باشند. هم‌چنین به نظر می‌رسد عوامل موثر عصاره متانولیک گیاه سنبله از نظر اثرات ضد التهابی و ضد دردی نسبت به عصاره بومادران در دوزهای یکسان موثرتر بوده و یا غلظت بالاتری داشته باشند که هر دو این موارد نیاز به مطالعات تکمیلی دارد.

هم‌چنین نتایج این مطالعه بیانگر پاسخ بهتر دوزهای موثر هر دو گیاه در مقایسه با دوز ضد التهابی ایندومتاسین (۵mg/kg) در روز ۶ مطالعه بود. حضور عوامل مختلف آنتی‌اکسیدان و ضد التهابی در عصاره‌های این دو گیاه [۲۸] که می‌توانند روند التهاب را از مسیرهای متعدد تحت تاثیر قرار دهند می‌تواند دلیلی بر موثرتر بودن این عصاره‌ها در مقایسه با داروی شیمیایی ایندومتاسین باشد که عملاً از یک مسیر مشخص اثرات ضد التهابی خود را اعمال می‌کند.

بنابراین چنین می‌توان استنباط کرد که از یک سو عصاره‌های گیاهان سنبله و بومادران در کاهش وابسته به دوز علائم التهابی به‌ویژه هایپرآلرژی، ادم و IL-6 سرمی طی

التهاب بخش‌های مختلف بدن یکی از مشکلات شایع بسیاری از جوامع از جمله ایران است [۳]. برای کاهش و بهبود علائم التهاب روش‌های درمانی متعددی وجود دارد که استفاده از گیاهان دارویی یکی از این روش‌ها می‌باشد. استفاده از گیاهان دارویی به‌ویژه گیاه سنبله و بومادران از دیرباز جهت بهبود علائم بیماری‌های التهابی مانند آرتريت روماتوئید (RA) رایج بوده است [۵،۴].

التهاب ایجاد شده به‌وسیله تزریق کف‌پایی CFA یکی از مدل‌های رایج حیوانی برای مطالعات مختلف دارویی و رفتاری طی بیماری‌های التهابی انسان است [۲۴]. در مراحل نخست این نوع التهاب علائمی مانند هایپرآلرژی و ادم عمدتاً توسط آزاد شدن میانجی‌های مختلفی مانند هیستامین، سروتونین و کینین‌ها، که توسط لکوسیت‌های مهاجرت کرده به دورن بافت آسیب دیده ترشح می‌شوند، واسطه‌گری می‌شوند. از طرف دیگر برخی از مطالعات عواملی چون رادیکال‌های آزاد و سیتوکین‌ها را در ایجاد علائم این نوع التهاب موثر می‌دانند. برخی مطالعات نقش سایتوکاین‌هایی مانند IL-1، IL-6 و TNF α را در تداوم ادم و درد ناشی از تزریق CFA حائز اهمیت می‌دانند. در مطالعات قبلی نشان داده شده که IL-6 یکی از مهم‌ترین سایتوکاین‌های موثر در ایجاد علائم التهابی بوده و تغییر در میزان سطوح سرمی آن می‌تواند باعث ایجاد تغییر در روند التهاب گردد [۲۷،۲۶،۲۵].

مطالعات فیتوشیمیایی حضور عوامل شیمیایی و فلاونوئیدی متفاوتی را در ترکیب هر دو گیاه بومادران و سنبله نشان می‌دهد که در گیاه سنبله شامل: ترپنوئیدها- ساپونین‌ها- گلیکوزیدها و فلاونوئیدها و در گیاه بومادران شامل ترکیبات Quercetin (نوعی فلاونوئید) است [۲۸].

فلاونوئیدها دارای اثرات مشخص در کاهش علائم التهابی حاد هستند. آن‌ها اثرات بازدارندگی مشخصی بر روی فعالیت آنزیم‌های مختلف مثل پروتئین کیناز C، فسفولیپاز A₂ و فسفودی استراز دارند که از عوامل مهم دخیل در القاء علائم التهابی در نظر گرفته می‌شوند [۲۹]. هم‌چنین مطالعات متفاوتی اثرات ضد دردی ترپنوئیدها را اثبات کرده‌اند [۳۱،۳۰].

inflammatory activities of hydroalcoholic extract from aerial parts of *Stachys inflata* on rats. *J Ethnopharmacol* 2001; 75: 213-218.

[13] Khanavi M, Sharifzadeh M, Hadjakhondi A, Shafiee A. Photochemical investigation and anti-inflammatory activity of aerial parts of *stachys byzantina* C.Koch. *J Ethnopharmacol* 2005; 97: 463-468.

[14] Nishimura H, Sasaki H, Inagaki, N, Chin M, Mitsushashi H. Nine phenethyl alcohol glycosides from *stachys sieboldii*. *Phytochemistry* 1991; 30: 965-969.

[15] Ross SA, Zinchenko TV. Study of the triterpenoids and steroids of the marsh hedge nettle. *Farm Zh* 1975; 30: 91-92.

[16] Yamamoto R, Miyase T, Ueno A. *Stachys saponins I – VIII*, new oleanane-type triterpene saponins from *Stachys riederi* Chamisso. *Chem. Pharma. Bullet* 1994;42: 1291-1296.

[17] El-ansari MA, Barron D, Abdalla MF, Saleh NAM, LE-Quere, JL. Flavonoid constituents of *Stachys aegyptica*. *Phytochemistry* 1991; 30: 1169-1173.

[18] Saeidnia S, Moradi-Afrapoli F, Gohari AR, Malmir M. Cytotoxic flavonoid from *achillea talagonica* bioss. *J Med Plants* 2009; 8: 52-56.

[19] Wollenweber E, Valant- Vetschera KM, Ivancheva S and Kusmanov B. Flavonoids aglycones from the leaf surfaces of some *achillea* species. *Phytochemistry* 1987; 26: 181- 2.

[20] Demirci F, Demirci B, Gorboz L, Yesilada E, Hosmo Can Baser K. Characterization and biological activity of *Achillea teretifolia* willd. *And A. nobilis* L. subsp. *Neilreichi* (kerner) *formanek* essential oils. *Turk J Biol* 2009; 33: 129-36.

[21] Ardestani A, Yazdanparast R. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chemistry* 2007;104: 21-29.

[22] Gomez MA, Saenz MT, Garcia MD. and Fenandez MA. Study of the topical anti-inflammatory activity of *Achillea ageratum* on chronic and acute inflammation models. *Z Naturforsch C* 1999; 54: 937-9841.

[23] Okunrobo L, Usifoh C, Ching P, Bariweni M. Anti-inflammatory evaluation of methanol extract and aqueous fraction of the leaves of *Anthocleista djalonensis* A. Chev. (*Gentianaceae*). *Int J Pharmacol* 2009; 7.

[24] Zaringhalam J, Manaheji H, Mghsoodi N, Farokhi B, Mirzaiee V. Spinal μ -opioid receptor expression and hyperalgesia with dexamethasone in chronic adjuvant-induced arthritis in rats. *Clinical and experimental pharmacology and physiology* 2008; 35: 1309-1315. (Persian).

[25] Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain on conscious animals. *Pain* 1983; 16: 109-110.

[26] Fonseca JE, Santos MJ, Canhão H, Choy E. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmun Rev* 2009; 8: 538-542.

[27] De Jongh RF, Vissers KC, Meert TF, Booij LH, De Deyne CS, Heylen RJ. The Role of Interleukin-6 in Nociception and Pain. *Anesth Analg* 2003; 96: 1096-1103.

[28] Rajnarayana K, Reddy MS, Chaluvadi MR, Krishna DR. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J Pharmacol* 2001; 33: 2-16.

[29] Middleton E Jr. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol* 1998; 439: 175-182.

[30] De Araújo PF, Coelho-de-Souza AN, Morais SM, Ferreira SC, Leal-Cardoso JH. Antinociceptive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* on mice. *Phytomedicine* 2005; 12: 482-486.

[31] Reanmongkol W, Subhadhiraakul S, Thienmontree S, Thanyapanit K, Kalnaowakul J, Sengsui S. Antinociceptive activity of the alkaloid extract from *Kopsia macrophylla* leaves in mice. *Songklanakaraj J Sci Technol* 2005; 27 : 509-516.

التهاب کوتاه مدت ناشی از تزریق CFA موثر بوده و از سوی دیگر دوز و عوامل موثر ضد التهابی عصاره‌های این دو گیاه با هم متفاوت می‌باشند. می‌توان بررسی‌های بیشتر و دقیق‌تری را بر روی مواد موثره هر دو نوع عصاره گیاهان بومادران زرد و سنبله انجام داد و تاثیر هر کدام از مواد موثره را به صورت جداگانه بر روی روند التهاب بررسی کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در اجرای این طرح قدردانی می‌شود.

منابع

[1] Kang HS, Kim YH, Lee CS, Lee JJ, Choi I, Pyun KH. anti inflammatory effects of *stephania tetrandia* S. Moore on interleukin- 6 production and experimental inflammatory disease models. *Mediators Inflamm* 1996; 5: 280-291.

[2] Nishimoto N, Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2: 619-626.

[3] Lipsky Peter E. Interleukin-6 and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: S4.

[4] Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 564-582.

[5] Magaji MG, Anuka JA, Abdu-Aguye I, Yaro AH, Hussaini IM. Preliminary studies on anti-inflammatory and analgesic activities of *Securinega virosa* (*Euphorbiaceae*) in experimental animal models. *JMPR* 2008; 2: 39- 44.

[6] el-Shazly AM, Hafez SS, Wink M. Comparative study of the essential oils and extracts of *Achillea fragrantissima* (Forssk.) Sch. Bip. and *Achillea santolina* L. (*Asteraceae*) from Egypt. *Pharmazie* 2004; 59: 226-230.

[7] Datta SC. *Systematic Botany*. 4th ed. Wiley Eastern, New Delhi. 1991, pp: 428- 433.

[8] Mozaffarian V. *A Dictionary of iranian plant names*. Tehran: Farhang Moaser 1996; pp: 522-523. (Persian).

[9] Rechinger KH. *Flora iranica*, No: 150, LBIATAE. Akademische Druck-u, Verlagsanstalt, Graz., 1982: pp: 354-396.

[10] Skaltsa HD, Lazari DM, Chinou IB. and Loukis AE. Composition and antibacterial activity of the essential oils of *stachys candida* and *S.chrysantha* from southern Greece. *Planta Med* 1999; 65: 255-256.

[11] Zinchenko TV. Flavonoid glycosides of *Stachys neglecta*. *Farm ZH* 1970; 25: 81-82.

[12] Maleki N, Garjani A, Nazemiyeh H, Nilfouroushan N, Eftekhar Sadat AT, Allameh Z, Hasannia N. Potent anti-

Anti-hyperalgesic and anti-inflammatory effects of *Achillea santolina* and *Stachys athorecalyx* extracts on complete Freund's adjuvant–induced short-term inflammation in male wistar rats

Elaheh Tekieh (M.Sc)¹, Akhtar Akbari (M.Sc)¹, Homa Manaheji (Ph.D)¹, Shamsali Rezazadeh(Ph.D)², Jalal Zaringhalam (Ph.D)^{1*}

1 – Dept. of Physiology, Neuroscience Research Centre, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2 - Institute of Medicinal Plants, ACECR, Tehran, Iran

(Received: 20 Aug 2010 Accepted: 9 Nov 2010)

Introduction: Immune system is involved in the etiology and path physiologic mechanisms of inflammation. Medicinal plants are an important source of substances which are claimed to induce non-specific immune modulator effects. Given the above information and the role of IL-6 in inflammation and pain induction, this study investigated the effects of *Achillea santolina* and *Stachys athorecalyx* methanolic and defatted extracts on complete Freund's adjuvant (CFA) -induced short term inflammation in male Wistar rats

Materials and Methods: Inflammation was induced on day zero by CFA injection in hind paw of rats. Methanolic and defatted extractions were prepared from aerial parts of both plants. 50, 100 and 200 mg/kg doses of extracts were selected for IP treatment during 6 days after CFA injection.

Results: Results indicated dose related effects of *A. santolina* and *S. athorecalyx* extracts on edema, hyperalgesia and serum IL-6 level during inflammation. Although, both methanolic and defatted extracts of *S. athorecalyx* showed a significant reduction in the inflammatory symptoms, no significant differences was observed between these two kinds of extracts of *S.athorecalyx* with respect to their anti inflammatory effects. Only methanolic extract of *A. santolina* was effective during CFA-induced inflammation.

Conclusion: These results could suggest that short-term administration of *A. santolina* and *S. athorecalyx* extracts possess potent anti-inflammatory effects and modulate paw edema, hyperalgesia and serum IL-6 level during CFA–induced inflammation. In addition, these dose-dependent effects may mediate via different extract supplements which need more investigations.

Keywords: Hyperalgesia, Inflammation, *Stachys athorecalyx*, *Achillea santolina*, Rat

* Corresponding author: Fax: +98 21 22439971 ; Tel: +98 9125168313
jzaringhalam@yahoo.com