



## اثر ضد دردی عصاره متانولی میوه گیاه زرشک (*Berberis vulgaris* L.) در موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر بالغ نژاد NMRI

دکتر اکرم عیدی\*

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی، تهران، ایران

شبنم جولایی

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

دکتر جلال زرین قلم

دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی، تهران، ایران

دکتر شمسعلی رضا زاده

جهاد دانشگاهی، پژوهشکده گیاهان دارویی، تهران، ایران

محل انجام پژوهش: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۰/۱/۳۰

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۲۰

### چکیده

زرشک (*Berberis vulgaris* L.) گیاهی شناخته شده در طب سنتی ایران است که میوه آن به عنوان یک ماده تسکین‌دهنده درد معرفی شده است. در تحقیق حاضر، اثر ضد دردی عصاره متانولی میوه زرشک در موش‌های نر بالغ نژاد NMRI مورد بررسی و فعالیت ضد دردی عصاره میوه زرشک توسط آزمون اسید استیک و آزمون فرمالین مورد ارزیابی قرار گرفت. در این تحقیق، عصاره میوه زرشک، هر دو فاز اولیه و ثانویه درد القاء شده توسط آزمون فرمالین را کاهش داده و فعالیت ضد دردی علیه انقباضات شکمی القاء شده توسط اسید استیک نشان داد. براساس نتایج حاضر می‌توان چنین مطرح نمود که عصاره میوه زرشک دارای خصوصیات ضد دردی است و اثرات ضد دردی عصاره احتمالاً به واسطه مکانیسم‌های محیطی و مرکزی، میانجی‌گری می‌شود

واژه‌های کلیدی: ضد درد، آزمون فرمالین، زرشک (*Berberis vulgaris* L.)، آزمون انقباضات شکمی، موش

## مقدمه

انجمن بین‌المللی درد، آن را به عنوان یک احساس ناخوشایند تعریف می‌کند و همچنین تجربه‌ای حسی که با آسیب بالقوه یا بالفعل بافتی مرتبط شده است (۱). آنالژزی، غیاب درد در پاسخ به تحریکی است که به صورت عادی دردناک می‌باشد. مواد اندورژن که مکانیسم‌های آنالژژیک را فعال می‌کنند، اندورفین (*Endorphins*) نامیده می‌شوند. اندورفین‌ها شامل انکفالین، دینورفین و بتاندورفین هستند (۲). اپیات‌ها (مخدرها) اثرات ضد دردی خود را از طریق میان‌کنش با رسپتورهای اپیوئیدی واقع شده در سیستم عصبی مرکزی و محیطی ایجاد می‌نمایند (۳). به علت اثرات زیان آور داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی (NSAID) از قبیل آسپ‌های گوارشی و همچنین اثرات جانبی اپیات‌ها (مخدرها)، مانند وابستگی و تحمل (*Tolerance*)، استفاده از این داروها تحت عنوان عوامل ضد دردی و ضدالتهابی در کلیه موارد، نتیجه بخش نبوده است (۴).

زرشک (*Berberis vulgaris* L.) در ایران گیاه شناخته شده‌ای است و بخش‌های گوناگون آن شامل ریشه، پوست، برگ و میوه، در طب سنتی مورد استفاده بوده است (۵). ساقه، ریشه، پوست و میوه گیاه زرشک شامل آلکالوئیدهای ایزوکینولینی از جمله بربرین (*Berberine*) است که فعال‌ترین ترکیب تشکیل دهنده میوه زرشک به شمار می‌آید (۶). از دیگر ترکیبات شیمیایی این گیاه می‌توان *Berbamine*، *Bervulcine*، *Palmatine*، *Berlambine* و نیسز فلاونوئید را نام برد (۷).

تا کنون گزارشی در ارتباط با اثرات ضد دردی عصاره میوه زرشک ارائه نشده است، لذا در تحقیق حاضر، اثرات ضد دردی عصاره میوه زرشک، با استفاده از آزمون فرمالین و آزمون انقباضات شکمی در موش کوچک آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت و اثرات ضد دردی آن با داروهای ضد درد رایج، یعنی مرفین و ایندومتاسین، مقایسه گردید.

## مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر، ابتدا میوه گیاه زرشک که از مزرعه‌ای در خرم‌آباد جمع‌آوری و پس از خشک کردن،

هسته‌گیری شد و سپس پوسته میوه‌ها جمع‌آوری و توسط آسیاب مکانیکی به صورت پودر درآمد. پودر حاصله در دستگاه پرکولاتور ریخته شد و مقدار ۱۰ لیتر متانول ۷۰ درصد به آن اضافه گردید و پس از گذشت ۴۸ ساعت، محتویات دستگاه صاف شد. جهت استخراج حلال، از دستگاه روتاری و جهت خروج کامل آب و متانول، از دستگاه آون استفاده شد.

در این تحقیق، موش‌های نر بالغ نژاد NMRI با محدوده وزنی ۳۰-۲۵ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند و در اتاق حیوانات با درجه حرارت کنترل شده  $23 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در رطوبت نسبی ۴۰ تا ۶۰ درصد نگهداری شدند. موش‌ها در ۷ گروه قرار گرفتند:

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

گروه ۲ (شاهد): موش‌هایی که سرم فیزیولوژیک (حلال عصاره) را دریافت کردند.

گروه ۳: موش‌هایی که ابتدا داروی استاندارد (ایندومتاسین، مرفین) را دریافت نمودند.

گروه‌های ۴، ۵، ۶ و ۷: موش‌هایی که ابتدا عصاره متانولی زرشک را در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت درون صفاقی دریافت کردند. تعداد حیوانات در هر گروه، ۵ سر است.

## آزمون اسیداستیک

در این آزمایش، ابتدا موش‌ها با ماده مورد نظر به حجم ۰/۲ میلی‌لیتر به صورت درون صفاقی تیمار شدند. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه، ۰/۲ میلی‌لیتر اسیداستیک یک درصد به صورت درون صفاقی تزریق شد. تزریق درون صفاقی اسیداستیک القاء کننده *writhing* (انقباض شکمی توأم با کشیدن پاهای عقبی است. ۵ دقیقه پس از تزریق اسیداستیک، تعداد انقباضات شکمی در مدت زمان ۲۰ دقیقه شمارش شد. عصاره متانولی زرشک در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت درون صفاقی تزریق شد و ایندومتاسین به عنوان داروی استاندارد به میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تزریق گردید.

## آزمون فرمالین

جهت انجام این آزمایش، از جعبه شیشه‌ای استفاده می‌شود. این جعبه به ابعاد  $13 \times 12 \times 30$  سانتی‌متر طوری ساخته شده که در فاصله‌ای از جعبه و سطح افق، آینه‌ای با زاویه ۴۵ درجه قرار گرفته است که مشاهدات را آسان‌تر می‌کند. در روز آزمایش، هر حیوان ۳۰ دقیقه قبل از شروع آزمایش در جعبه قرار داده می‌شود 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، مقدار  $50$  میکرولیتر فرمالین  $2/5$  درصد به صورت زیر جلدی به سطح پشتی پای راست حیوان تزریق گردید. مدت زمانی که صرف لیسیدن و گاز گرفتن پای تزریق شده می‌شود، در دوره‌های زمانی  $5-0$  دقیقه و سپس  $45-15$  دقیقه به عنوان شاخص درد، اندازه‌گیری می‌شود. در تست فرمالین حیوانات دو پاسخ سریع و آهسته به درد نشان می‌دهند که ظاهراً دو مکانیسم مختلف دارد. پاسخ سریع به درد، بلافاصله بعد از تزریق فرمالین ایجاد می‌شود که به مدت ۵ دقیقه طول می‌کشد. پس از ۵ دقیقه اول در فاصله ۱۰ دقیقه بعدی، حرکات حیوان همچنان ادامه دارد، اما امتیازی به آن تعلق نمی‌گیرد و ۱۵ دقیقه بعد از تزریق، فاز دوم شروع می‌شود و حدود ۳۰ دقیقه طول می‌کشد.

## اساس نمره‌گذاری در تست فرمالین

امتیاز صفر - هر دو پنجه حیوان روی کف جعبه قرار گرفته‌اند؛ وزن حیوان به طور مساوی روی آن‌ها قرار دارد و حین حرکت نیز ترجیح اختیاری جهت استفاده از پنجه مقابل وجود 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 وضوح دیده می‌شود.

امتیاز دو - پای تزریق شده، کاملاً از کف جعبه برداشته می‌شود و تماسی با سطح ندارد و پای مقابل نیز 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 جهت تمیز کردن خودش متفاوت است.

## آنالیز آماری داده‌ها

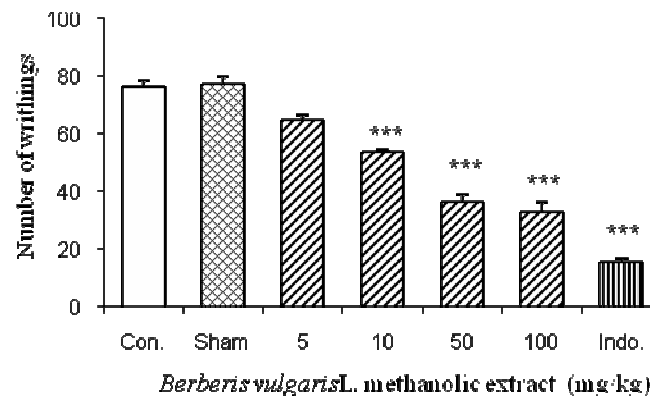
تمامی داده‌ها از نظر آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (one - way ANOVA)، بررسی و نتایج به صورت  $Mean \pm S.E.M$  ارائه گردید. ملاک استنتاج آماری  $P < 0/05$  است.

## یافته‌ها

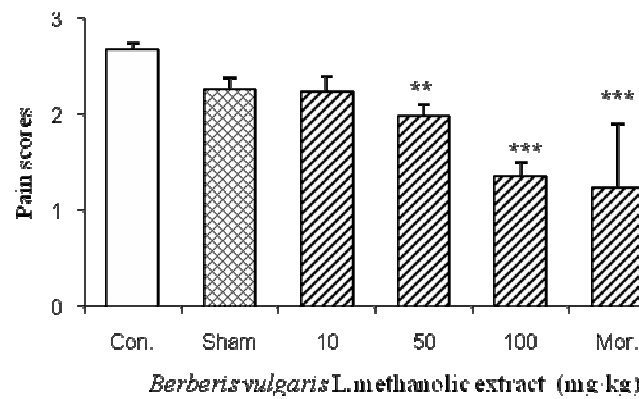
تزریق درون صفاقی عصاره متانولی زرشک در غلظت‌های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت وابسته به دوز، باعث کاهش معنی‌داری در تعداد انقباضات شکمی القاء شده توسط اسید استیک در موش نر بالغ گردید. ایندومتاسین نیز در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، باعث کاهش معنی‌داری بر تعداد انقباضات شکمی القاء شده توسط اسیداستیک گردید (نمودار ۱).

تزریق درون صفاقی عصاره متانولی زرشک در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت وابسته به دوز، موجب کاهش معنی‌دار فاز اولیه درد القاء شده توسط فرمالین گردید. مرفین در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، موجب کاهش معنی‌دار فاز اولیه درد القا شده توسط فرمالین شد (نمودار ۲).

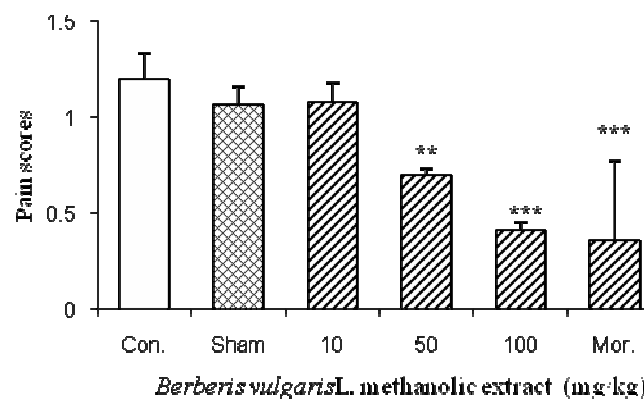
تزریق درون صفاقی عصاره متانولی زرشک در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت وابسته به دوز، موجب کاهش معنی‌دار فاز ثانویه درد القاء شده توسط فرمالین گردید، مرفین در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، موجب کاهش معنی‌داری بر فاز ثانویه درد القا شده توسط فرمالین شد (نمودار ۳).



نمودار ۱- اثر تزریق درون صفاقی عصاره متانولی زرشک در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر تعداد انقباض شکمی القاء شده توسط اسیداستیک در موش کوچک آزمایشگاهی نر بالغ. (\*\*\*) $P < 0.001$  اختلاف با گروه شاهد را نشان می‌دهد.



نمودار ۲- اثر تزریق درون صفاقی عصاره متانولی زرشک در غلظت‌های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر درد القاء شده در فاز اولیه درد القا شده توسط فرمالین در موش کوچک آزمایشگاهی نر بالغ. (\*\*\*) $P < 0.001$ ، (\*\*) $P < 0.01$  اختلاف با گروه شاهد را نشان می‌دهد.



نمودار ۳- اثر تزریق درون صفاقی عصاره متانولی زرشک در غلظت‌های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر درد القاء شده در فاز ثانویه درد القا شده توسط فرمالین در موش کوچک آزمایشگاهی نر بالغ. (\*\*\*) $P < 0.001$ ، (\*\*) $P < 0.01$  اختلاف با گروه شاهد را نشان می‌دهد.

## بحث

زرشک دارای فلاونوئید (Flavonoid) است و فلاونوئیدها دارای اثرات ضدالتهاب و ضد دردی هستند و از طرفی، بر هم کنش مستقیم فلاونوئیدها و سنتز پروستاگلاندین‌ها به طور قطعی مشخص شده است (۱۴). همچنین عصاره زرشک دارای آلکالوئیدهای ایزوکینولینی از جمله بربرین است که به عنوان اصلی‌ترین ترکیب شیمیایی گیاه زرشک محسوب می‌شود و دارای اثر ضدالتهابی و ضد دردی است. اثر ضدالتهابی بربرین ممکن است بر پایه مکانیسم جلوگیری از بیوسنتز پروستاگلاندین باشد (۱۵). اثرات ضدالتهابی و ضد دردی فلاونوئیدها احتمالاً به واسطه جلوگیری از فعالیت آنزیم سیکلواکسیژناز اعمال می‌شود (۱۶).

## نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که عصاره متانولی میوه زرشک دارای خاصیت ضد دردی است و اثرات ضد دردی خود را احتمالاً به واسطه ترکیب فلاونوئیدها و بربرین و از طریق مکانیسم‌های محیطی و مرکزی و با تأثیر بر آنزیم سیکلواکسیژناز در بیوسنتز پروستاگلاندین اعمال می‌کند.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی به دلیل حمایت مالی و ارائه امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی جهت انجام این پژوهش در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد سپاس‌گزاری می‌شود.

## منابع

1. Vitor A, Daponte E, Patrocínio M, Vasconcelos S. 2008. The psychophysiology of pain. *Electronical Journal of communication information and innovation in health* 2, 85-94.
2. Serpell M. 2006. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Surgery (oxford)* 24(10), 350-353.

در تحقیق حاضر، اثر عصاره متانولی زرشک بر درد القاء شده توسط اسیداستیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره متانولی زرشک، به طور معنی‌داری باعث کاهش تعداد انقباضات شکمی القاء شده توسط اسیداستیک می‌گردد و تأثیر آن بر کاهش درد التهابی آشکار شد. تزریق اسیداستیک به صورت درون صفاقی القاء کننده writhing (انقباض شکمی توأم با کشیدن پاهای عقبی) است و جهت ارزیابی داروهای دارای اثرات ضد دردی محیطی و مرکزی به کار می‌رود (۸). این آزمایش، یک مدل درد احشایی است و گزارش شده است که اسیداستیک از طریق آزادسازی مواد اندوژنی مانند پروستاگلاندین‌ها، لوکوترین‌ها، سروتونین، کینین‌ها و غیره که در میانجی‌گری ادراک درد نقش دارند، سبب ایجاد هایپرآلژزی می‌گردد (۹).

در تحقیق حاضر، اثر عصاره متانولی زرشک بر درد ناشی از تزریق فرمالین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاضر نشان داد که عصاره متانولی زرشک، موجب کاهش معنی‌داری بر فاز اولیه و فاز ثانویه القاء شده توسط فرمالین می‌شود. تست فرمالین، یک مدل بسیار معتبر تحریک دردآور و حساس برای مطالعه اثر انواع متعدد داروهای ضد دردی است (۱۰). تحریک آزار دهنده، تزریق محلول فرمالین در زیر پوست سطح پشتی پای راست است و دو دوره زمانی مجزا از فعالیت لیسیدن یا گاز گرفتن شناسایی شده است؛ به طوری که فاز اولیه ناشی از اثر مستقیم بر نوسی‌سپتورهاست، اما در فاز ثانویه پاسخ التهابی همراه با درد التهابی وجود دارد (۱۱). داروهای مانند مرفین که غالباً مرکزی عمل می‌کنند، هر دو فاز را به طور یکسان مهار می‌کنند (۱۲)، اما داروهای که به صورت محیطی عمل می‌کنند تنها قادر به مهار فاز دوم درد ناشی از فرمالین هستند (۱۳). با توجه به این‌که عصاره متانولی زرشک، هر دو فاز درد فرمالین را تقریباً به طور یکسان مهار می‌کند، می‌توان برای آن، عملکرد مرکزی را پیشنهاد نمود و چون عصاره، اثر ضدالتهابی نیز دارد و التهاب به عنوان یک فرایند محیطی مولد در فاز دوم فرمالین شناخته شده است می‌توان نتیجه گرفت که عصاره زرشک، عملکرد ضد درد محیطی را نیز دارد.

آزمایش‌های فیتوشیمیایی نشان می‌دهد که عصاره

3. Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Williams S, Hall W. 2004. Neuroscience. Sunderland, Massachusetts U.S.A, 209.
4. Gutstein H.BI. 1988. Mu and Kappa receptors in periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. Neuroreport 9(81) 777-81.
5. Imanshadidi M, Hosseinzadeh H. 2008. Pharmacological and therapeutic effect of *Berberis vulgaris* and its active constituent, Berberine. Phytother 22, 999-1005.
6. Zargari A. 1990. Medicinal plants, Vol 4. Tehran University press, 72-82.
7. Arayne S, Sultana N, Sherbahadur S. 2007. The Berberis story: *Berberis vulgaris* in therapeutics. Pak. J. Pharm. Sci 20, 83-92.
8. Viana GSB, Vale TG, Pinho RSN, Matos FJA. 2000. Anti-nociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. J. Ethnopharmacol 70, 323-327.
9. Forth W, Martin, Peter K. 1986. The relief of pain. Hoechst medication Up-Date. Hoechst, Munich, pp. 6-107.
10. Sevostianova N, Danysy W, Bepalov AY. 2005. Analgesic effects of morphine and loperamide in the rat formalin of morphine and loperamide in the rat formalin test: Interaction with NMDA receptor antagonists. Eur J pharmacol 525(1-3), 83-90.
11. Hunskaar S, Hole K. 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. Pain 30, 103-114.
12. Vaccarino AL, Tasker RA, Melzak R. 1989. Analgesia produced by normal doses of opioid antagonists alone in combination with morphine. Pain 36, 103-9.
13. Chen YT, Tsai H. 1995. Anti inflammatory and analgesic activity from roots of *Angelica pybescens*. Planta Med 61, 2-8.
14. Alcaraz MG, Hoult RS. 1985. Actions of flavonoids and the novel anti-inflammatory flavones, Hypolaetin-8-Glucoside, on prostaglandin biosynthesis and inactivation. Bio. Pharmacol 34(14), 2477-82.
15. Kupeli E, Kosar M, Yesilada E, Husna K, Baser C. 2002. A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of *Turkish Berberis species*. Life Sci 72645-657.
16. Tanko Y, Kamba B, Musa KY. 2008. Antinociceptive and anti inflammatory activities of ethanolic flower extract of *Newbouldia laevis* in mice and rats. International Journal of Applied Research in Natural products 1(3), 13-19.

