

فصلنامه علمی - پژوهشی طب مکمل، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸

بررسی آثار ضدالتهاب، ضددرد و ضدتب عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز در موش‌های آزمایشگاهی

رحمت‌اله پرن‌دین*

۱. استادیار، دکترای فیزیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۹

چکیده

مقدمه: در طب سنتی گزارش‌هایی در مورد آثار ضدالتهاب، ضددرد و ضدتب گیاه شبدر قرمز وجود دارد. هدف از این تحقیق، تجویز عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز و بررسی آثار آن بر التهاب، درد و تب موش‌های سوری نر بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۱۲۰ سر موش سوری نر به ۲۰ گروه ۶ تایی (۴ تست و هر تست ۵ گروه) طبقه‌بندی شدند. موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی در این مطالعه رعایت شد. عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز به ترتیب با دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ mg/kg با روش داخل صفاقی تزریق گردید. برای ارزیابی فعالیت ضدالتهاب و ضدتب عصاره به ترتیب از تست گزین به عنوان القاکننده ادم گوش و تست مخمر آب‌جو به عنوان القاکننده تب استفاده شد. برای ارزیابی درد از تست‌های کشش شکمی با اسیداستیک و آزمون فرمالین استفاده شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS و آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح معنی‌داری $p < 5\%$ تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: دوزهای ۵۰۰ ($p = 0.003$) و ۷۵۰ mg/kg ($p < 0.001$) عصاره به‌طور معنی‌داری التهاب را کاهش دادند. همه دوزهای عصاره، درد را در آزمون کشش شکمی و مرحله درد مزمن در آزمون فرمالین و دوزهای ۵۰۰ و ۷۵۰ mg/kg درد را در مرحله درد حاد آزمون فرمالین به‌طور معنی‌داری ($p < 0.001$) کاهش دادند. همین‌طور تزریق دوز ۷۵۰ mg/kg ($p < 0.001$) عصاره تب را به‌طور معنی‌داری کاهش داد.

نتیجه‌گیری: گیاه شبدر قرمز دارای آثار ضدالتهاب، ضددرد و ضدتب است که به احتمال زیاد به ترکیبات ایزوفلاونوئیدی و فلاونوئیدی آن مربوط است. نیاز به تحقیقات بیشتر در این زمینه وجود دارد.

کلیدواژه‌ها: التهاب، درد، تب، موش.

*نویسنده مسئول: E.mail: rahmatparandin@pnu.ac.ir

مقدمه

ماکروفایزها را در پاسخ به لیپوپولی ساکارید کاهش می‌دهد و موجب افزایش ترشح فاکتور ضدالتهابی اینترکولین ۱۰ و کاهش سنتز نیتریک اکسید و لیپواکسیژناز می‌شود (۷). همچنین گیاه شبدر قرمز آثار سودمندی بر فشارخون و عملکرد آندوتلیوم در زنان منوپوز مبتلا به دیابت نوع ۲ دارد (۸).

به‌رغم پیشینه جالب توجه شبدر قرمز، تاکنون مطالعه‌ای در ارتباط با تأثیر آن بر التهاب، درد و تب انجام نشده است؛ بنابراین هدف مطالعه حاضر بررسی تأثیر این گیاه بر التهاب، درد و تب در موش‌های صحرایی است.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره شبدر قرمز

جهت تهیه عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز، ابتدا این گیاه از مزارع اطراف کرمانشاه جمع‌آوری شد. سپس توسط متخصص بیوسیستماتیک گیاهی دانشگاه پیام نور کرمانشاه شناسایی شده و با کد هرباریومی: ۱۳۹۶/۱۱ ثبت گردید. در ادامه گیاه در سایه خشک شده و سپس آسیاب شد و در مرحله بعد در الکل ۷۰٪ قرار داده شد و به مدت یک هفته در دمای اتاق نگه داشته شد. سپس محتویات آن صاف شد و محلول صاف‌شده در دمای ۳۷ درجه نگه داشته شد تا آب و الکل آن بخار شود و عصاره هیدروالکلی آن خشک شود. از دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ mg/kg عصاره که بر اساس تحقیق قبلی انتخاب شده بود استفاده شد (۹).

حیوانات و گروه‌بندی

۱۲۰ سر موش سوری نر از نژاد NMRI با وزن تقریبی ۲۳ تا ۲۸ گرم از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه رازی کرمانشاه تهیه شد. در طول انجام آزمایش موش‌ها در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد و میزان رطوبت ۵۰ تا ۵۵٪ در قفس‌های پلاستیکی نگهداری شدند. در طول آزمایش، غذا و آب کافی در اختیار آن‌ها قرار گرفت. کلیه مراحل آزمایش مطابق آیین‌نامه کمیته اخلاق زیستی دانشگاه پیام نور انجام شد. در مجموع، موش‌ها به‌طور

گیاهان دارویی به‌عنوان منابع غنی از ترکیبات زیستی فعال، تاریخچه طولانی مدت درمانی دارند. تحقیقات مبتنی بر شواهد آزمایشگاهی، مزایای پزشکی و دارویی ترکیبات گیاهی را نشان داده‌اند. در طی قرن‌های گذشته استفاده از گیاهان دارویی در درمان التهاب، درد و تب بسیار متداول بوده است. در حال حاضر استفاده از داروهای شیمیایی از جمله داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی (NSAIDs) کاربرد فراوانی در درمان عوارض درد، التهاب و تب از جمله آرتريت روماتوئید، پوکی استخوان و غیره دارد. باوجود این، اغلب این داروها آثار جانبی زیادی از قبیل اختلالات و خون‌ریزی گوارشی و سرکوب سیستم ایمنی دارند. با توجه به اینکه اغلب داروهای ضدالتهاب، ضددرد و ضدتب از جمله آسپیرین و مورفین از محصولات گیاهی مشتق شده‌اند تحقیقات بیشتر در ارتباط با کشف داروهای گیاهی مؤثرتر و بی‌خطر به‌عنوان یک راهبرد مهم همچنان ادامه دارد (۱، ۲، ۳).

شبدر قرمز (*Trifolium pratense*) گیاهی علفی و چندساله است که در طب سنتی ایران از آن به‌عنوان خلط‌آور، ضدعفونی‌کننده، ضددرد، ضدسرفه، تب‌بر، بهبوددهنده ذات‌الریه و مننژیت استفاده می‌شود و همچنین درمان‌کننده بیماری‌های پوستی، ریه و اختلالات سیستم عصبی و باروری است. آنالیز شیمیایی شبدر قرمز در مطالعات مختلف نشان داد این گیاه حاوی ایزوفلاونوئیدها، فلاونوئیدها، مشتقات کومارین، گلیکوزیدهای سیانوژنیک، ساپونین، روغن‌های فرار، ویتامین‌ها و مواد معدنی است. از خواص دیگر این گیاه درمان و کاهش گرگرفتگی به‌خصوص در زنان یائسه، کاهش کلسترول، بهبود سیستم گردش خون و جلوگیری از شکل‌گیری لخته‌های خون و پلاک‌های سرخرگی و ابتلا به سرطان خوش‌خیم پروستات است. تا به حال عوارض خاصی از این گیاه گزارش نشده است (۴ - ۶). در تحقیقات قبلی نشان داده شد ایزوفلاون‌های این گیاه، ترشح سیتوکین‌های التهابی اینترلوکین ۶ و فاکتور نکروز توموری آلفا به‌وسیله

منفی (نرمال سالین)، ۲. گروه کنترل مثبت (مورفین با دوز ۱۰ mg/kg)، ۳، ۴ و ۵- گروه‌های تجربی که به ترتیب با دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ mg/kg عصاره به صورت تک‌دوز و قبل از تست فرمالین با روش داخل صفاقی تزریق شدند. تزریقات پس از قرارگیری موش‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در زیر قیف شیشه‌ای و روی جعبه درد انجام شد؛ طول و عرض و ارتفاع جعبه ۳۰ سانتی‌متر بود که برای مشاهده بهتر حرکات موش‌ها، آینه‌ای با زاویه ۴۵ درجه زیر آن و روبه‌روی فرد شمارشگر قرار گرفت. پس از این تزریقات موش‌ها برای مدت ۳۰ دقیقه در این محیط قرار گرفتند. سپس مقدار ۲٪ میلی‌لیتر فرمالین ۲/۵٪ به زیر پوست کف پای راست حیوان به صورت زیرجلدی تزریق و موش مجدداً به داخل جعبه بازگردانده شد. حرکات حیوان در اینجا در دو مرحله برای مدت ۶۰ دقیقه بررسی شد. زمانی که موش پای راست را می‌لیسید یا به شدت تکان می‌داد به عنوان زمان لیسیدن در نظر گرفته می‌شد. میانگین زمان لیسیدن در فاصله زمانی بین ۰ تا ۵ دقیقه ابتدایی به عنوان فاز اول درد (درد حاد) و میانگین دقایق ۱۵ تا ۶۰ به عنوان فاز دوم (درد مزمن) در نظر گرفته شد (۱۰).

۴. آزمون ضدتب

در این روش ابتدا دمای ناحیه رکتال (rectal) کلیه موش‌ها با دماسنج دیجیتال بیورر، ساخت چین، اندازه‌گیری و ثبت شد. سپس با تزریق درون‌صفاقی ۱۰ mg/kg سوسپانسیون مخمر آبجو (Brewer's yeast suspension) ۱۰٪، ساخت شرکت تاپ لور، فرانسه، به موش‌ها القای تب شد. افزایش حداقل ۰/۵ درجه سانتی‌گراد به دمای رکتال نشانه القای تب در موش‌ها بود. سپس موش‌های تبار به‌طور تصادفی مطابق زیر به ۵ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. ۱. گروه شاهد یا کنترل منفی (نرمال سالین)، ۲. گروه کنترل مثبت (پاراستامول با دوز ۱۵۰ mg/kg)، ۳، ۴ و ۵. گروه‌های تجربی که به صورت تک‌دوز درون‌صفاقی تجویز شدند. دمای رکتال در ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴ و ۱۶ ساعت پس از تزریقات نیز اندازه‌گیری و ثبت شد (۱۲).

تصادفی به ۲۰ گروه ۶ تایی جهت ۴ آزمون زیر تقسیم شدند.

۱. آزمون التهاب با استفاده از تست گزین

در این آزمون تعداد ۳۰ موش به‌طور تصادفی به ۵ گروه به‌صورت زیر تقسیم شدند. ۱. گروه شاهد یا کنترل منفی (نرمال سالین)، ۲. گروه کنترل مثبت (دگزامتازون با دوز ۱۵ mg/kg) و ۳، ۴ و ۵. گروه‌های تجربی که به ترتیب با دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ mg/kg عصاره به صورت تک‌دوز و ۱۵ دقیقه قبل از تزریق گزین با روش داخل صفاقی تزریق شدند. ۱۵ دقیقه پس از تزریق، مقدار ۳٪ میلی‌لیتر گزین - ساخت شرکت مرک آلمان - در سطح جلویی گوش راست حیوان تزریق شد. دو ساعت بعد حیوان کشته شد و بلافاصله هر دو گوش او بریده شد و با استفاده از چوب‌پنبه‌سوراخ‌کن، برش‌های ۷ میلی‌متری به صورت دایره‌ای از هر دو گوش او در موقعیت مشابه جدا و وزن شد. اختلاف وزن برش‌های دو گوش راست و چپ میزان التهاب را نشان می‌داد (۱۰).

آزمون‌های ضد درد

۲. آزمون کشش شکمی با استفاده از اسیداستیک

در این آزمون، تعداد ۳۰ موش به‌طور تصادفی به ۵ گروه ۶ تایی به‌صورت زیر تقسیم شدند. ۱. گروه شاهد یا کنترل منفی (نرمال سالین)، ۲. گروه کنترل مثبت (ایندومتاسین با دوز ۵ mg/kg)، ۳، ۴ و ۵- گروه‌های تجربی که به ترتیب با دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ mg/kg عصاره به‌صورت تک‌دوز و ۳۰ دقیقه قبل از تزریق اسیداستیک با روش داخل صفاقی تزریق شدند. بلافاصله پس از تزریق اسیداستیک ۰/۶ درصد با دوز ۱۰ ml/kg، تعداد کشیدگی‌ها یا رایت‌هایی که با انقباضات شکمی و کشیدن حداقل یکی از اندام‌های خلفی مشخص می‌شد و معرف ایجاد درد احشایی بود برای مدت ۳۰ دقیقه شمارش و ثبت شد (۱۱).

۳. آزمون فرمالین

در این آزمون، تعداد ۳۰ موش به‌طور تصادفی به ۵ گروه ۶ تایی به‌صورت زیر تقسیم شدند. ۱. گروه شاهد یا کنترل

آنالیز آماری

داده‌های خام در نرم‌افزار SPSS و آنالیز واریانس یک‌طرفه تجزیه و تحلیل شد و میانگین آن‌ها با آزمون توکی با سطح احتمال $p < 5\%$ مقایسه شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی التهاب با استفاده از تست گزین طبق نمودار شماره ۱ مقایسه اثر دگزامتازون ($p < 0/001$) و عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز با دوزهای ۵۰۰ ($p = 0/003$) و ۷۵۰ mg/kg ($p < 0/001$) با گروه کنترل نشان داد آن‌ها به‌طور معنی‌داری اثر ضدالتهاب دارند ولی دوز ۲۵۰ mg/kg ($p = 0/985$) تغییر معنی‌داری ایجاد نکرد. مقایسه اثر دگزامتازون با دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز نشان داد اثر ضدالتهاب دگزامتازون به‌طور معنی‌داری ($p < 0/001$) بیشتر از عصاره الکی شبدر قرمز است. همین‌طور مقایسه عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز با دوزهای ۵۰۰ ($p = 0/010$) و ۷۵۰ mg/kg ($p < 0/001$) با گروه با دوز ۲۵۰ mg/kg نشان‌دهنده اثر معنی‌دار ضدالتهاب آن بود (نمودار شماره ۱).

نتایج حاصل از آزمون کشش شکمی

بر اساس نمودار شماره ۲ مقایسه اثر ایندومتاسین و همه دوزهای عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز با گروه کنترل نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار تعداد رایت‌ها بود ($p < 0/001$). مقایسه اثر ایندومتاسین با دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز نشان داد کاهش تعداد رایت‌ها در گروه دگزامتازون به‌طور معنی‌داری ($p < 0/001$) بیشتر از عصاره‌های الکی شبدر قرمز بود. همین‌طور مقایسه عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز با دوز ۷۵۰ mg/kg با گروه‌های با دوز ۲۵۰ و ۵۰۰ mg/kg نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار تعداد رایت‌ها بود ($p < 0/001$) (نمودار شماره ۲).

نتایج حاصل از آزمون فرمالین

همان‌طور که در نمودار شماره ۳-الف مشاهده می‌شود مقایسه گروه مورفین و عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز با دوزهای ۵۰۰ و ۷۵۰ mg/kg با گروه کنترل نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار درد حاد بود ($p < 0/001$). باین‌حال دوز

۲۵۰ mg/kg تغییر معنی‌داری ($p = 0/081$) در کاهش درد حاد ایجاد نکرد. مقایسه اثر مورفین با دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز نشان داد اثر ضددرد حاد مورفین به‌طور معنی‌داری ($p < 0/001$) بیشتر از عصاره الکی شبدر قرمز بود. عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز با دوزهای ۵۰۰ ($p < 5\%$) و ۷۵۰ mg/kg در مقایسه با گروه با دوز ۲۵۰ mg/kg موجب کاهش معنی‌دار درد حاد شد ($p < 0/001$). همین‌طور عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز با دوز ۷۵۰ mg/kg در مقایسه با گروه با دوز ۲۵۰ mg/kg در مقایسه با گروه ۵۰۰ موجب کاهش معنی‌دار ($p = 15\%$) درد حاد شد.

به‌علاوه، چنانچه در نمودار ۳-ب مشاهده می‌شود مقایسه گروه‌های مورفین و عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز با کلیه دوزها نشان داد که آن‌ها در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری درد مزمن ($p < 0/001$) را کاهش دادند. مقایسه اثر مورفین با دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز نشان داد اثر ضددرد مورفین به‌طور معنی‌داری ($p < 0/001$) بیشتر از عصاره الکی شبدر قرمز است. عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز با دوزهای ۵۰۰ ($p = 0/006$) و ۷۵۰ mg/kg ($p < 0/001$) در مقایسه با گروه با دوز ۲۵۰ mg/kg به‌طور معنی‌داری درد مزمن را کاهش داد. همین‌طور عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز با دوز ۷۵۰ mg/kg در مقایسه با گروه با دوز ۵۰۰ mg/kg به‌طور معنی‌داری ($p = 0/002$) درد مزمن را کاهش داد (نمودار شماره ۳).

نتایج حاصل از آزمون ضدتب

همان‌طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود پاراستامول در ساعات مختلف بررسی تب را به‌طور معنی‌دار تضعیف کرد. در گروه عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز دوزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ mg/kg تنها در ۱۶ ساعت پس از تزریق در مقایسه با گروه کنترل تب به‌طور معنی‌دار کاهش یافت؛ باین‌حال این کاهش در مقایسه با گروه پاراستامول معنی‌دار نبود. در گروه عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز با دوز ۷۵۰ mg/kg از ۱۰ ساعت پس از تزریق در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌دار تب مشاهده شد که این

عمل به عنوان آنتی‌اکسیدانت و مهار اکسیدازهایی مثل سیکلوکسیژناز (COX) و لیپوآکسیژناز نقش دارند و از این راه آثار ضدالتهاب و ضد درد خود را ایفا می‌کنند (۱۵). شبدر قرمز حاوی مقادیر بالایی از ۴ ایزوفلاون اصلی شامل دایدزین، جنیستین، فورمونونتین و بیوکائین است که خواص استروژنیک و آنتی‌اکسیدانت را از خود نشان می‌دهند (۱۵-۱۳). توانایی جنیستین در مهار القای COX-2 از راه مهار پروتئین تیروزین کیناز در سلول‌های اندوتلیال انسانی و ماکروفاژهای موش‌ها نشان داده شده است. همین‌طور در مطالعه‌ای دایدزین به‌طور ضعیفی عملکرد COX-1 را در پلاکت‌های انسانی مهار کرد. به‌علاوه نشان داده شده هر ۴ ایزوفلاون حاصل از شبدر قرمز دارای آثار مهارکنندگی فعالیت آنزیم COX از راه کاهش سنتز پروستاگلندین E₂ و ترمبوکسان B₂ در سلول‌های مونوسیت و ماکروفاژ انسانی کشت شده است. سیکلوکسیژنازها و لیپوآکسیژنازها با تأثیر بر متابولیسم آراشیدونیک اسید و تولید پروستاگلندین‌ها و سایر میانجی‌ها نقش مؤثری در ایجاد درد و التهاب ایفا می‌کنند (۱۵). از دیگر فلاونوئیدهای موجود در شبدر قرمز می‌توان کامپفرول و کوئرستین را نیز نام برد (۱۶). در مطالعه‌ای آثار ضد درد و ضدالتهاب کامپفرول و کوئرستین حاصل از برگ‌های درخت *Tilia argentea* نشان داده شده است اما به مکانیسم‌های احتمالی آن اشاره‌ای نشده است (۱۷).

در مطالعه اوچیتو و همکاران نشان داده شد ایزوفلاون‌های حاصل از شبدر قرمز از نورون‌های مغز در برابر آسیب‌های گلوتامات محافظت می‌کنند. (۱۸). گلوتامات یک نوروترانسمیتر تحریکی و مسئول انتقال سیگنال درد به‌ویژه در شاخ پستی نخاع است. ممکن است آثار ضد درد شبدر قرمز از راه سرکوب سیستم گلوتامات نیز باشد که نیاز به تحقیقات بیشتری دارد (۱۹). مولر و همکاران نشان دادند ایزوفلاون‌های شبدر قرمز ترشح سیتوکین‌های التهابی اینترلوکین-۶ و فاکتور نکروز توموری (TNF) توسط ماکروفاژها را در پاسخ به لیپوپلی‌ساکارید کاهش می‌دهند و سبب افزایش ترشح فاکتور ضدالتهاب اینترلوکین-۱۰ و

کاهش از ۱۲ ساعت پس از تزریق قابل قیاس با کاهش تب به‌وسیله پاراستامول بود (جدول شماره ۱).
دمای عادی، دمای قبل از القای تب و سایر دماها ساعات پس از تزریق داروها بود. کلیه دماها برحسب درجه سانتی‌گراد نوشته شدند. حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی با سطح احتمال $p < 5\%$ است.

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد تزریق داخل صفاقی عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز دارای آثار ضدالتهابی، ضد درد و ضد تب است. گزارش‌های موجود در طب سنتی (۵، ۶) یافته‌های این مطالعه را تأیید می‌کند. در بررسی التهاب با استفاده از آزمون گزیلن مشخص شد دوز ۷۵۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز دارای بیشترین اثر ضدالتهاب است؛ اما اثر آن به‌اندازه تأثیر دگزامتازون نیست. همین‌طور در بررسی درد با استفاده از تست‌های اسیداستیک و فرمالین مشخص شد عصاره دارای آثار ضد درد به‌صورت وابسته به دوز است اما این آثار در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کننده ایندومتاسین و مورفین کمتر بود. همین‌طور در مطالعه تب مشخص شد عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز دارای آثار ضد تب است و اثر دوز ۷۵۰ mg/kg آن با اثر داروی کاهنده تب پاراستامول قابل مقایسه است. آثار ضدالتهاب، ضد درد و ضد تب مشاهده شده را می‌توان به ترکیبات موجود در این گیاه نسبت داد.

شواهد متعدد حاصل از مطالعات فیتوشیمیایی نشان داد بیشترین ترکیبات موجود در شبدر قرمز شامل ایزوفلاون‌ها و فلاونوئیدها است (۱۳، ۱۴). ایزوفلاون‌ها به‌طور عمده در برخی گیاهان علفی یافت می‌شوند و ترکیبات فنولی ساده‌ای دارند که آثار ضدالتهاب و ضد درد آن‌ها را نشان می‌دهد اما مکانیسم آثار آن‌ها هنوز به‌خوبی درک نشده است. باین‌حال مشخص شده تعدادی از ایزوفلاون‌ها در برخی وقایع آبشار سیگنالینگ سلولی از جمله مهار فعالیت‌های تیروزین کیناز، اتصال به گیرنده‌های آدنوزین،

می‌شود. همین‌طور پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده از ترکیبات مؤثر حاصل از شبدر قرمز استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با کد ۷/۴۹۱۰۳/د با حمایت مالی دانشگاه پیام نور استان کرمانشاه انجام شد. همچنین در کمیته اخلاق آن دانشگاه با کد IR.PNU.REC.1397.013 تصویب شد. نویسنده از معاونت محترم پژوهشی آن دانشگاه تشکر و قدردانی می‌کند.

کاهش سنتز نیتریک اکسید و لیپواکسیژناز می‌شوند (۲۰). اغلب داروهای آنتی‌پیریتیک (ضدتب) شیمیایی از راه مهار بیان COX-2 به وسیله مهار سنتز پروستاگلندین E2 در جهت کاهش دمای بدن عمل می‌کنند. سیتوکین‌های تب‌زا (پیروژنیک) از قبیل اینترلوکین ۶ و TNF آن‌هایی هستند که به‌طور مستقیم بر هیپوتالاموس اثر گذاشته موجب بروز تب می‌شوند؛ اما سیتوکین اینترلوکین ۱۰ دارای خواص ضدالتهاب از جمله سرکوب درد است (۲۱، ۲۲). بنابراین کاهش فاکتورهای التهابی و ضددرد و افزایش ترشح فاکتورهای ضدالتهابی و ضددرد به وسیله شبدر قرمز به‌عنوان یک مکانیسم مؤثر در این فرایند پیشنهاد می‌شود که نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. در این مطالعه جهت القای تب از مخمر آجگو استفاده شد که منجر به افزایش فعالیت متابولیسم آراشیدونیک اسید شد که با افزایش تولید پروستاگلندین E2 منجر به افزایش دمای بدن می‌شود. دیوید و همکاران نشان دادند مهار آبشار متابولیسم آراشیدونیک اسید به‌ویژه از راه مهار لیپواکسیژناز و در نتیجه کاهش پروستاگلندین E2 در هیپوتالاموس موجب کاهش دمای بدن به دنبال تب می‌شود (۲۳).

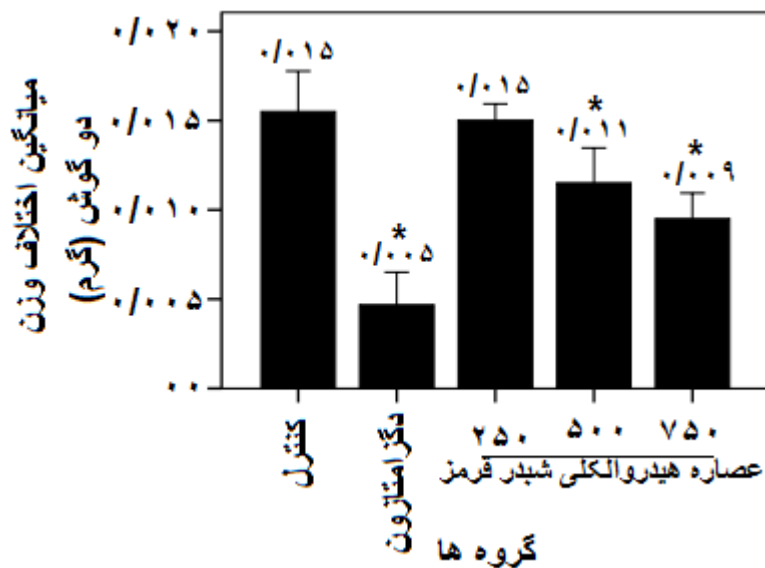
مشقات کومارین‌ها نیز از ترکیبات موجود در شبدر قرمز است که در مطالعات قبلی آثار ضدالتهاب و ضددرد آن‌ها نشان داده شده است (۲۴). ساپونین از دیگر ترکیبات شبدر قرمز است (۱۵). در مطالعه‌ای نشان داده شد ساپونین حاصل از برگ‌های نوعی گیاه خوراکی به نام Vernonia amygdalina دارای آثار ضدتب و ضددرد است (۲۵) که نیاز به تحقیقات بیشتر دارد.

نتیجه‌گیری

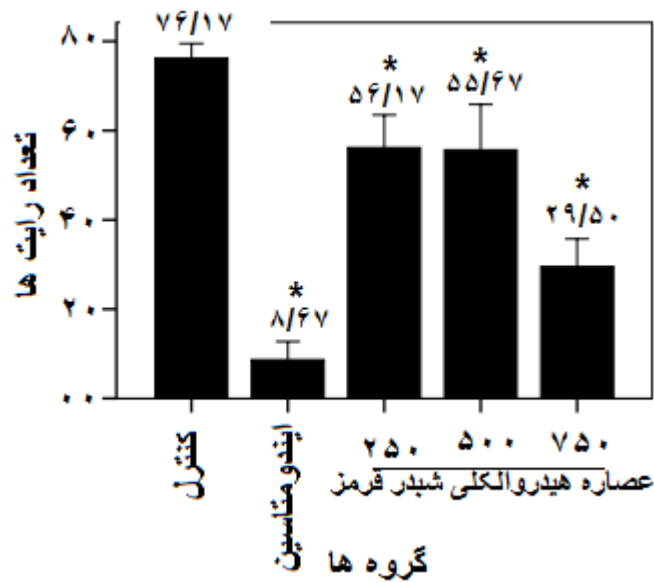
عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز دارای آثار ضدالتهاب، ضددرد و ضدتب وابسته به دوز است و بهترین اثر آن در دوز ۷۵۰ mg/kg به دست می‌آید. این آثار ممکن است به علت ترکیبات متعدد موجود در این گیاه به‌ویژه ترکیبات قابل توجه ایزوفلاونوئیدی و فلاونوئیدی آن باشد که به‌عنوان یک گیاه بالقوه برای تحقیقات بیشتر و به دست آوردن داروی مؤثر و فاقد آثار جانبی در این زمینه پیشنهاد

جدول شماره (۱) تأثیر تیمارهای عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز بر میانگین تب در ساعات مختلف

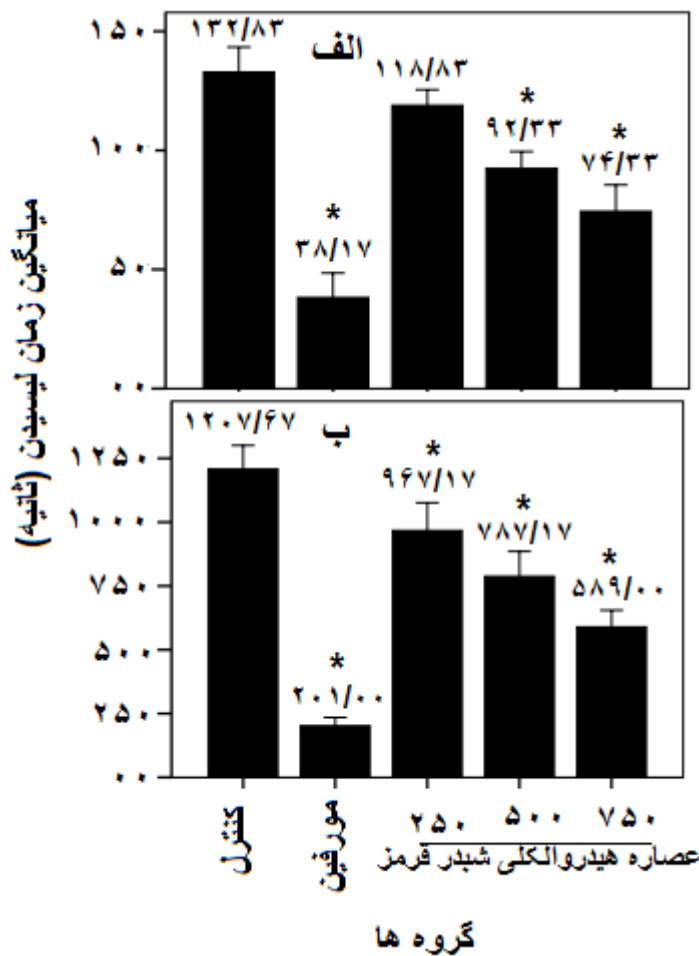
گروه‌ها	دمای عادی	۶ ساعت	۸ ساعت	۱۰ ساعت	۱۲ ساعت	۱۴ ساعت	۱۶ ساعت
کنترل	۳۷/۰۱±۰/۰۲ ^a	۳۹/۱۸±۰/۱۳ ^a	۳۹/۰۹±۰/۰۷ ^a	۳۸/۹۵±۰/۱۱ ^a	۳۸/۹۲±۰/۱۱ ^a	۳۸/۸۱±۰/۰۹ ^a	۳۸/۸۳±۰/۰۸ ^a
پاراستامول	۳۷/۰۲±۰/۰۳ ^a	۳۸/۰۷±۰/۱۳ ^b	۳۷/۹۴±۰/۱۱ ^b	۳۷/۶۰±۰/۰۹ ^b	۳۷/۵۶±۰/۰۹ ^b	۳۷/۴۷±۰/۰۸ ^b	۳۷/۴۵±۰/۰۷ ^b
	P=۰/۹۹۹	p<۰/۰۰۱	p<۰/۰۰۱	p<۰/۰۰۱	p<۰/۰۰۱	p<۰/۰۰۱	P=۰/۹۹۹
شیدر قرمز ۲۵۰ mg/kg	۳۶/۹۸±۰/۰۲ ^a	۳۹/۰۷±۰/۱۴ ^a	۳۸/۹۴±۰/۱۷ ^a	۳۸/۸۶±۰/۱۶ ^a	۳۸/۷۸±۰/۱۷ ^a	۳۸/۶۶±۰/۱۴ ^a	۳۸/۳۰±۰/۱۱ ^c
	P=۰/۹۳۳	P=۰/۹۸۰	P=۰/۹۴۳	P=۰/۹۷۸	P=۰/۹۱۵	P=۰/۸۲۶	P=۰/۰۰۳
شیدر قرمز ۵۰۰ mg/kg	۳۷/۰۱±۰/۰۲ ^a	۳۹/۰۷±۰/۱۶ ^a	۳۸/۹۶±۰/۱۲ ^a	۳۸/۹۰±۰/۱۲ ^a	۳۸/۷۴±۰/۱۳ ^a	۳۸/۴۸±۰/۱۰ ^a	۳۸/۲۱±۰/۱۰ ^c
	P=۱/۰۰۰	P=۰/۹۷۷	P=۰/۹۶۳	P=۰/۹۹۸	P=۰/۸۲۵	P=۰/۱۵۸	p<۰/۰۰۱
شیدر قرمز ۷۵۰ mg/kg	۳۷/۰۴±۰/۰۳ ^a	۳۸/۸۳±۰/۱۶ ^a	۳۸/۷۰±۰/۱۸ ^a	۳۸/۱۵±۰/۰۳ ^c	۳۷/۹۸±۰/۰۶ ^b	۳۷/۷۱±۰/۰۶ ^b	۳۷/۶۶±۰/۰۶ ^b
	P=۰/۹۰۳	P=۰/۴۲۸	P=۰/۲۹۴	p<۰/۰۰۱	p<۰/۰۰۱	p<۰/۰۰۱	p<۰/۰۰۱



نمودار شماره (۱) اثر تجویز عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز بر میزان التهاب موش‌های سوری. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی با سطح احتمال $p < 5\%$ انجام شد. * اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل.



نمودار شماره (۲) اثر تجویز عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز بر تعداد رایت‌ها در موش‌های سوری. تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی با سطح احتمال $p < 5\%$ انجام شد. * اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل.



نمودار شماره (۳) اثر تجویز عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز بر میزان درد حاد (الف) و مزمن (ب) در آزمون فرمالین. تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار SPSS و آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی با سطح احتمال $p < 5\%$ انجام شد. * اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل.

References:

1. Adebayo SA, Dzoyem JP, Shai LJ, Eloff JN. The anti-inflammatory and antioxidant activity of 25 plant species used traditionally to treat pain in southern African. *BMC Complementary and Alternative medicine*. 2015;15(1):159.
2. Shilpi JA, Islam ME, Billah M, Islam KMD, Sabrin F, Uddin SJ, et al. Antinociceptive, anti-inflammatory, and antipyretic activity of mangrove plants: A mini review. *Advances in pharmacological sciences*. 2012: 576086.
3. Samson Cheruiyot K. Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory potential of dichloromethanolic root extract of *Clusia abyssinica* Jaub and Spach in rats and mice models [MSc Thesis]. Nairobi County, Kenya; Kenyatta University 2017.
4. Tundis R, Marrelli M, Conforti F, Tenuta M, Bonesi M, Menichini F, Loizzo M. *Trifolium pratense* and *T. repens* (Leguminosae): Edible flower extracts as functional ingredients. *Foods*. 2015 ;4(3):338-48.
5. Schütz K, Carle R, Schieber A. *Taraxacum*—a review on its phytochemical and pharmacological profile. *Journal of ethnopharmacology*. 2006;107(3): 313-23.
6. Azad Bakht M. Phytoestrogens. *Journal of Medical Plants*. 2006; 6(21):1–10.
7. Mueller M, Hobiger S, Jungbauer A. Red clover extract: a source for substances that activate peroxisome proliferator-activated receptor alpha and ameliorate the cytokine secretion profile of lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Menopause*. 2010;17(2):379-87.
8. Howes JB, Tran D, Brillante D, Howes LG. Effects of dietary supplementation with isoflavones from red clover on ambulatory blood pressure and endothelial function in postmenopausal type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2003 Sep;5(5):325-32.
9. Rabiei Z, Movahedi E, Rafieian-Kopaei M, Lorigooini Z. Antidepressant effects of *Trifolium pratense* hydroalcoholic extract in mice. *Iranian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2016 Apr 15;2(1):33-24.
10. Asadi Balsin Sharif Abadi S, Nasri S, Amin G, Bidaran S. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of hydroalcoholic extract of *Nepeta menthoides* on pain in aerial parts in male mice. *Journal of Jahrom University of Medical Sciences*. 2013;11(3):1-9.
11. Ghasemi M, Golmakani E, Ahmadzadeh Sani T, Kamali H, Akaberi A, Bibak B. Study of methanol extract of *Cyprus Longus* on visceral pain by writhing test in mice. *JNKUMS*. 2014; 6 (1) :133-138.
12. Muhammad N, Saeed M, Khan H. Antipyretic, analgesic and anti-inflammatory activity of *Viola betonicifolia* whole plant. *BMC complementary and alternative medicine*. 2012 ;12(1):59.
13. Çölgeçen H, Koca U, Büyükkartal HN. Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention, Chapter 115 - Use of Red Clover (*Trifolium*

- pratense L.) Seeds in Human Therapeutics. Academic press. 2011: Pages 975-980.
14. Pakalapati G, Li L, Gretz N, Koch E, Wink M. Influence of red clover (*Trifolium pratense*) isoflavones on gene and protein expression profiles in liver of ovariectomized rats. *Phytomedicine*. 2009;16(9):845-55.
 15. Lam AN, Demasi M, James MJ, Husband AJ, Walker C. Effect of red clover isoflavones on cox-2 activity in murine and human monocyte/macrophage cells. *Nutrition and cancer*. 2004 May 1; 49(1):89-93..
 16. Booth NL, Overk CR, Yao P, Burdette JE, Nikolic D, Chen SN, Bolton JL, Breemen RB, Pauli GF, Farnsworth NR. The chemical and biologic profile of a red clover (*Trifolium pratense* L.) phase II clinical extract. *Journal of Alternative & Complementary Medicine*. 2006 ;12(2):133-9.
 17. Toker G, Küpeli E, Memisoğlu M, Yesilada E. Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden). *J Ethnopharmacol*. 2004; 95(2-3):393-7.
 18. Occhiuto F, Zangla G, Samperi S, Palumbo DR, Pino A, De Pasquale R, Circosta C. The phytoestrogenic isoflavones from *Trifolium pratense* L.(Red clover) protects human cortical neurons from glutamate toxicity. *Phytomedicine*. 2008; 15(9):676-82.
 19. Karami M, Gohari AR, Ebrahimzadeh MA, Danaei GH. Pathophysiology of pain and effective drugs to control it. *Clinical Excellence*. 2016;5(2):28-44.
 20. Mueller M, Hobiger S, Jungbauer A. Red clover extract: a source for substances that activate peroxisome proliferator-activated receptor α and ameliorate the cytokine secretion profile of lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Menopause*. 2010;17(2):379-87..
 21. Luo C, He ML, Bohlin L. Is COX-2 a perpetrator or a protector? Selective COX-2 inhibitors remain controversial. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2005;26(8):926.
 22. Luheshi GN. Cytokines and fever: mechanisms and sites of action. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998;856(1):83-9.
 23. Aronoff DM, Neilson EG. Antipyretics: mechanisms of action and clinical use in fever suppression. *The American journal of medicine*. 2001;111(4):304-15.
 24. Tosun A, Akkol EK, Yeşilada E. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of coumarins from *Seseli gummiferum* subsp. *corymbosum* (Apiaceae). *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2009;64(1-2): 56-62.
 25. Adiukwu PC, Kayanja FIB, Nambatya GK, Rugera S, Ezeonwumelu JOC, Tanayen JK, et al. Antipyretic and Antinociceptive properties of the aqueous extract and Saponin from an edible vegetable: *vernonia Amygdalina* leaf. *African Journal of food, agriculture, nutrition and development*. 2013;13(2).

Evaluation of anti-inflammatory, anti-nociceptive, and anti-pyretic potential of hydroalcoholic extract of *Trifolium pratense* in mice

Parandin R^{1*}

1. Assistant Professor, PhD in Physiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran.

Received: 06 December, 2018 :Accepted: 10 March, 2019

Abstract

Introduction: There are some reports in traditional medicine concerning the anti-inflammatory, anti-nociceptive and anti-pyretic effects of *Trifolium pratense* (red clover). The purpose of this study was to investigate the effects of hydroalcoholic extract of red clover on inflammation, pain and fever in male mice.

Methods: In this experimental study, 120 male mice were classified into twenty 6-member groups (4 tests and each test covering 5 groups), considering the ethics of working with laboratory animals. The hydroalcoholic extract of red clover was injected intraperitoneally at doses of 250, 500 and 750 mg/kg. The anti-inflammatory and antipyretic activities were measured using xylene-induced ear edema and brewer's yeast-induced pyrexia tests, respectively. In addition, the anti-nociceptive activity was measured using the abdominal constrictions induced by acetic acid and formalin tests. The data were analyzed by SPSS and one-way ANOVA test. The significance was shown as $p < 0.05$.

Results: The doses of 500 mg/kg ($p=0.003$) and 750 mg/kg ($p<0.001$) significantly reduced inflammation. All the doses significantly reduced the pain in the abdominal constriction test and chronic pain in the formalin test and the doses of 500 and 750 mg/kg reduced the pain in the acute phase of formalin test ($p<0.001$). Also, fever was significantly reduced ($p<0.001$) at dose of 750 mg/kg.

Conclusion: The red clover has anti-inflammatory, anti-nociceptive and antipyretic effects, which are likely to be related to the isoflavonoid and flavonoid components of this plant. Further research is required.

Keywords: Inflammation, Pain, Fever, Mice.

*Corresponding author: E.mail: rahmatparandin@pnu.ac.ir