مقاله پژوهشی

فصلنامه علمی – پژوهشی طب مکمل، شماره۴، زمستان ۱۳۹۲

بررسی اثرات ضدّ دردی عصارهٔ هیدروالکلی هستهٔ انگور با استفاده از آزمون فرمالین و صفحهٔ داغ در موش سوری نر

نغمه احمدیان باغبادرانی[۱]، فرزاد رجایی[۲*]، حسن اژدری زرمهری[۳]، سینا پوزش[۴]

۱. کارشناسی ارشد مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین.
۲. استاد مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین.
۳. استادیار مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین.
۴. کارشناس دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده پیراپزشکی.

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۹/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۹/۳۰

چکیده:

مقدمه: کاربرد گیاهان دارویی به جای داروهای سنتتیک در سال‌های اخیر به دلیل کم بودن عوارض جانبی و تنوع ترکیبات مؤثر این گیاهان افزایش یافته است**.** لذا هدف از مطالعهٔ حاضر بررسی اثر ضدّ دردی عصارهٔ هستهٔ انگور در روش آزمون فرمالین در دو فاز حاد و مزمن و آزمون صفحهٔ داغ در موش سوری آزمایشگاهی نر بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعهٔ تجربی بر روی ۵۶ سر موش سوری نر (۳g±۲۸) نژاد NMRI انجام شد که شامل گروه کنترل دریافت‌کنندهٔ نرمال‌سالین و گروه‌های دریافت‌کنندهٔ عصاره با دوزهای ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم بود. پس از تزریق داخل صفاقی برای ایجاد دردهای حاد و مزمن به طور جداگانه از آزمون‌های صفحهٔ داغ و تزریق فرمالین استفاده شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: تزریق عصارهٔ دانهٔ انگور در دوزهای ۷۵ ، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم سبب کاهش رفتارهای دردی در فاز اول و دوم آزمون فرمالین شد. همچنین تزریق عصارهٔ دانهٔ انگور سبب افزایش تأخیر بروز رفتارهای دردی (لیس زدن و یا پریدن) آزمون صفحهٔ داغ نسبت به گروه کنترل و ثبت پایه شد.

نتیجه‌گیری: نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که عصارهٔ هیدروالکلی هستهٔ انگور در واکنش به درد حاد و مزمن آزمون فرمالین و صفحهٔ داغ دارای خواص ضدّ دردی است که نشان دهندهٔ این است که عصاره احتمالاً به صورت مرکزی عمل می‌کند و می‌تواند جای‌گزین مناسبی برای داروهای شیمیایی ضدّ درد باشد.

کلیدواژه‌ها: بی‌دردی، عصارهٔ هیدروالکلی هستهٔ انگور، آزمون فرمالین، آزمون صفحهٔ داغ، موش سوری.

*نویسنده مسئول: E.mail: farzadraj@yahoo.co.uk

مقدمه:

درد تجربهٔ ناخوشایند حسی است که در اثر آسیب بافتی حاد یا بالقوه ایجاد می‌گردد و به عنوان شاخصی برای شناسائی بیماری‌ها در نظر گرفته می‌شود (۱). تاکنون تلاش‌های مؤثر زیادی در زمینهٔ شناخت مکانیسم‌های درد و درمان انواع آن به وسیلهٔ محققان و پزشکان صورت گرفته است (۳،۲). داروهای ضدّ درد اپیوئیدی، به ویژه مرفین، کارآیی بالایی در تسکین درد حاد و مزمن دارند اما با القای تحمل و وابستگی فیزیکی و همچنین افزایش حساسیت نسبت به درد یا هیپرآلرژی باعث بروز اثرات ناخواسته می‌شوند (۴) و بنابراین باید در مصرف آن‌ها احتیاط نمود (۶،۵). همچنین داروهای ضدّ درد ملایم‌تر مانند داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی شناخته شده‌اند که باعث مهار درد در مراحل اولیهٔ آن و در قسمت محیطی می‌شوند (۷). هر چند استفادهٔ طولانی مدت از آن‌ها منجر به ایجاد تحمل یا وابستگی نمی‌شود، اما با مهار COX[1] باعث بروز عوارض گوارشی مانند خونریزی دستگاه گوارش می‌شوند (۸). با توجه به آثار زیان‌بخش داروهای شیمیایی و پرداخت هزینه‌های گزاف برای تهیهٔ آن‌ها محققان در پی یافتن داروهای جدیدی در زمینهٔ کاهش درد هستند تا عوارض کمتری نسبت به داروهای موجود داشته باشند. گیاهان داروئی و داروهای مشتق از آن‌ها از قدیم به عنوان منابع مهم درمانی به وسیلهٔ بشر شناخته شده است. امروزه نیز با توجه به سهولت دسترسی به این داروها، تمرکز زیادی بر استفاده از آن‌ها و تحقیق در مورد خواص آن‌ها وجود دارد (۹). یکی از نمونه-های این گیاهان که اثرات فیزیولوژیک آن مورد توجه قرار گرفته، هستهٔ انگور است. سالانه مقدار زیادی هستهٔ انگور در کارخانه‌های مختلف آبمیوه و نوشیدنی به صورت زائد تولید می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که عصاره هستهٔ انگور دارای پتانسیل بسیار بالایی در از بین بردن رادیکال-های آزاد و مهار استرس اکسیداتیو بوده و به عنوان آنتی‌اکسیدان در غلظت‌های کم به طور قابل توجهی سرعت اکسیداسیون را کاهش می‌دهد (۱۱،۱۰).

پروآنتوسیانیدین موجود در هستهٔ انگور، مؤثرترین ترکیب آنتی‌اکسیدانی آن می‌باشد و تأثیر آنتی اکسیدانی آن در بدن، ۲۰ برابر ویتامین C و ۵۰ برابر ویتامین E است (۱۲). این ترکیبات آنتی‌اکسیدان با خنثی نمودن رادیکال‌های آزاد، جلوی تخریب سلولی ناشی از اثر رادیکال‌های آزاد را می‌گیرند و از دامنهٔ وسیعی از بیماری‌ها و اختلالات ناشی از استرس‌های اکسیداتیو جلوگیری می‌کنند (۱۳،۱۴). گزارش‌های متعددی در مورد اثرات مفید عصارهٔ هستهٔ انگور در کاهش التهاب (۱۵،۱۶)، بهبودی آسم و آلرژی (۱۷)، رفع خستگی (۱۸) ارائه شده است. علاوه بر این، مطالعات نشان می‌دهد که مصرف این عصاره هیچ اثر سوئی ندارد (۱۹). مطالعات انجام شده حاکی از آن است که هستهٔ انگور می‌تواند سبب کاهش درد و آسیب‌های مفصلی ناشی از استئوآرتریت و آرتریت روماتوئید شود (۲۰،۲۱). همچنین مصرف آن موجب تسکین دردهای شکمی در موارد التهاب حاد و مزمن پانکراس و کاهش آسیب‌های ناشی از التهاب معده و روده می‌شود (۲۴-۲۲). با این حال تاکنون تحقیقی در مورد اثرات عصارهٔ هیدروالکلی هستهٔ انگور بر بی‌دردی ناشی از آزمون فرمالین و صفحهٔ داغ انجام نشده است. لذا هدف از مطالعهٔ حاضر بررسی اثر ضدّ دردی عصارهٔ هستهٔ انگور در روش آزمون فرمالین در دو فاز حاد و مزمن و آزمون صفحهٔ داغ در موش سوری نر است.

مواد و روش‌ها:

روش عصاره‌گیری: انگور قرمز دانه‌دار (Grape Seed) در فصل تابستان از باغات شهر تاکستان چیده و به وسیلهٔ متخصصان مرکز منابع طبیعی و گیاهان داروئی جهاد کشاورزی استان قزوین شناسایی شد. سپس در آزمایشگاه داروشناسی دانشگاه علوم پزشکی قزوین عصاره‌گیری آن به شرح زیر انجام شد. هسته‌های انگور از میوه جدا گردید و در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد در سایه خشک و میزان ۷۵ گرم از آن با آسیاب برقی جهت تهیهٔ عصاره به پودر تبدیل شد. پس از پودر کردن درون ارلن قرار گرفت و مقداری از حلّال (۳۰٪ اتانول ۹۶٪ و ۷۰٪ آب) روی آن ریخته شد تا کاملاً پودر را بپوشاند. بعد از پوشاندن سر ارلن‌ها با ورقهٔ

[1] Cyclo-oxygenase

آلومینیومی روی هیتر برقی به مدت ۷۲ ساعت حرارت ملایم داده شد. بعد از اینکه حلّال و پودر به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ در سانتریفوژ همگن شدند محلول‌ها با کاغذ صافی Rund filter ساخت کشور آلمان با قطر منفذ ۲۰ تا ۳۰ میکرومتر صاف شدند. سپس محلول‌ها در دستگاه بن ماری با دمای ۳۳ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت و در انکوباتور استریل با دمای ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت یک هفته قرار گرفتند تا حلّال از عصاره جدا شود. از ۷۵ گرم پودر هستهٔ انگور مقدار ۷ گرم عصاره به دست آمد. سپس مقدار مشخصی از عصاره در حجم معینی از آب مقطر حل شد و غلظت‌های مورد نیاز به دست آمد (۲۵).

روش بررسی: این مطالعهٔ تجربی بر روی ۵۶ سر موش سوری نر (۳g±۲۸) نژاد NMRI انجام شد که برای هر آزمون شامل گروه کنترل دریافت‌کنندهٔ نرمال‌سالین و گروه‌های دریافت‌کنندهٔ عصاره با دوزهای ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم (n=۷) بودند. پس از تزریق داخل صفاقی برای ایجاد دردهای حاد و مزمن به طور جداگانه از آزمون‌های صفحهٔ داغ و تزریق فرمالین استفاده شد.

آزمون فرمالین: آزمون فرمالین یک روش ارزشمند و مدل مناسب برای سنجش و ارزیابی درد مداوم و پایدار ناشی از یک محرک شیمیایی می‌باشد و از سوی دیگر اثرات درد حاد را نیز در طی فاز اول این آزمایش قابل بررسی است. در این آزمایش به منظور مشاهده و بررسی رفتارهای حیوان، از یک محفظهٔ شفاف با کف مسطح، به ابعاد ۳۰×۳۰×۳۰ و از جنس پلکسی گلاس استفاده و برای مشاهدهٔ پنجهٔ پای حیوان، در زیر این محفظهٔ شفاف آیینه‌ای تعبیه شد. در این آزمایش، ۲۰ میکرولیتر محلول فرمالین ۴٪ به زیر پوست پنجهٔ پای حیوان به وسیلهٔ یک سر سوزن نمرهٔ ۳۰ تزریق شد. به دنبال تزریق فرمالین، حیوان مجموعه‌ای از رفتارهای القا شده با فرمالین و رفتارهای خودبه‌خودی را نشان می‌دهد که به آن‌ها نمرهٔ صفر تا سه داده می‌شود. رتبهٔ صفر: پای حیوان به طور طبیعی روی زمین قرار می‌گیرد، رتبهٔ یک: پای حیوان مختصری روی زمین قرار می‌گیرد، رتبهٔ دو: پای حیوان از زمین کنده شده است؛ و رتبهٔ سه: حیوان پایش را گاز می‌گیرد و یا لیس می‌زند. در گروه درمان میزان مؤثر عصارهٔ هستهٔ انگور۲۰- ۱۵ دقیقه قبل از آزمون فرمالین به صورت داخل صفاقی تزریق می‌شد (۲۶).

آزمون صفحهٔ داغ: صفحهٔ داغ در ۵۲ درجهٔ سانتی‌گراد تنظیم شده و حیوان روی این صفحهٔ داغ قرار می‌گرفت و زمان عکس‌العمل یا مدت زمان لازم تا حیوان به محرک درد پاسخ بدهد بر حسب ثانیه اندازه‌گیری شد. زمان عکس‌العمل در واقع به زمانی اطلاق می‌شود تا حیوان پنجه‌های خود را بلیسد و یا از محفظهٔ پلاستیکی روی صفحهٔ داغ به بیرون بپرد. جهت جلوگیری از آسیب بافتی، زمان خاتمهٔ آزمون (Cut-off time) ۵۰ ثانیه در نظر گرفته شد. این آزمون برای هر موش قبل ۵، ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۸۰ و ۲۴۰ دقیقه بعد از تزریق محلول انجام می‌گرفت. نتایج به دست آمده به شکل زمان تأخیر در عکس‌العمل به درد (Pain latency) و بر حسب ثانیه بیان می‌شد. لازم به ذکر است که این آزمایش یک روز قبل از آزمون فرمالین انجام شد و نیز به منظور عادت کردن حیوانات به محیط برای به حداقل رساندن استرس ۳ روز قبل از آزمون صفحهٔ داغ موش‌ها روزانه به مدت ۳ دقیقه برای آشنایی به محیط بر روی آزمون صفحهٔ داغ، خاموش قرار داده می‌شدند. همچنین برای کاهش اشتباهات انسانی تمامی این آزمایش به وسیلهٔ یک فرد انجام شد (۲۷). برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آماری تی‌تست و آنووای یک‌طرفه استفاده شد. $p<۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی شد.

یافته‌ها:

۱. رفتارهای دردی ناشی از تزریق فرمالین در کف پای حیوان در گروه کنترل: تزریق فرمالین سبب رفتارهای دردی شد که در بازهٔ زمانی ۹۰ دقیقه بعد از تزریق فرمالین مشاهده شدند؛ این رفتارها از دو فاز تشکیل شده که این دو فاز با اینترفاز از یکدیگر جدا می‌شوند. فاز اول از دقیقهٔ ۰ تا ۷ می‌باشد. بعد از فاز اول رفتارهای دردی طی مرحلهٔ اینترفاز که از دقیقهٔ ۸ تا ۱۴ می‌باشد کاهش پیدا می‌کنند

که در قسمت B شکل ۱ به صورت ستونی نشان داده شده است. سپس فاز دوم شروع می‌شود که در این مرحله از دقیقهٔ ۱۵ تا ۶۰ رفتارهای دردی رتبه‌بندی شد (شکل ۱).

۲.اثر تزریق عصارهٔ انگور در دوز ۷۵ میلی‌گرم بـه ازای هـر کیلوگرم بر رفتارهای دردی ناشی از فرمالین:

شکل ۱ تزریق عصارهٔ انگور در دوز ۷۵ میلـی‌گـرم بـه ازای هر کیلوگرم روی رفتارهای دردی آزمون فرمـالین را نشـان می‌دهد که تزریق عصارهٔ انگور در دوز ۷۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم سبب کاهش رفتارهای دردی در فاز اول آزمون فرمالین به طور معنی‌داری با گروه کنترل شـد ($p<۰/۰۱$)، و در اینتر فاز هم تأثیر معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین در این دوز عصارهٔ انگور سبب کاهش رفتارهـای دردی در فـاز ۲ شد ($p<۰/۰۰۱$).

۳. اثر تزریق عصارهٔ انگور در دوز ۱۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم بر رفتارهای دردی ناشی از فرمالین: شکل۲ تزریق عصارهٔ انگور در دوز ۱۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم روی رفتارهای دردی آزمون فرمالین را نشان می‌دهد که تزریق عصارهٔ انگور در دوز ۱۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم سبب کاهش رفتارهای دردی در فاز اول آزمون فرمالین به طور معنی‌داری با گروه کنترل شد ($p<۰/۰۰۱$)، و در اینتر فاز هم تأثیر معنی‌داری مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). همچنین در این دوز عصارهٔ انگور سبب کاهش رفتارهای دردی در فاز ۲ شد ($p<۰/۰۰۱$).

۴. اثر تزریق عصارهٔ انگور در دوز ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگـرم بـر رفتارهـای دردی ناشـی از فرمـالین: شـکل ۳ تزریق عصارهٔ انگور در دوز ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلـو-گرم روی رفتارهای دردی آزمون فرمالین را نشان مـی‌دهـد که تزریق عصارهٔ انگور در دوز ۳۰۰ میلی‌گـرم بـه ازای هـر کیلوگرم سبب کاهش رفتارهـای دردی در فـاز اول آزمـون فرمالین به طور معنی‌داری با گروه کنترل شد و در اینتر فـاز هم تأثیر معنی‌داری مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). همچنـین در این دوز عصارهٔ انگور سبب کاهش رفتارهـای دردی در فـاز ۲ شد ($p<۰/۰۰۱$).

۵. اثر تزریق عصارهٔ انگور در دوزهای ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم بر درد ناشی از آزمون صفحهٔ داغ: شکل ۴ تزریق عصارهٔ انگور در دوزهای ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم روی رفتارهای دردی ناشی از آزمون صفحهٔ داغ نشان می‌دهد که تزریق عصارهٔ انگور در دوز ۷۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم سبب افزایش مدت زمان تا بروز رفتارهای دردی (لیس زدن و یا پریدن) در دقایق ۵، ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۸۰ و ۲۴۰ نسبت به گروه کنترل و ثبت پایه شد ($p<۰/۰۵$ و $p<۰/۰۱$).

تزریق عصارهٔ انگور در دوز ۱۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم سبب افزایش مدت زمان تا بروز رفتارهای دردی (لیس زدن و یا پریدن) در دقایق ۱۸۰و ۲۴۰ نسبت به گروه کنترل و ثبت پایه شد ($p<۰/۰۵$). همچنین تزریق عصارهٔ انگور در دوز ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم سبب افزایش مدت زمان تا بروز رفتارهای دردی (لیس زدن و یا پریدن) در دقایق ۶۰، ۱۸۰ و ۲۴۰ نسبت به گروه کنترل و ثبت پایه شد ($p<۰/۰۵$ و $p<۰/۰۱$).

بحث:

در این مطالعه، آثار ضدّ دردی عصارهٔ هسـتهٔ انگـور در دو روش فرمالین آزمایش و آزمون صفحهٔ داغ مـورد بررسـی قرار گرفت. بررسی آماری نتایج حاصل از آزمون فرمـالین نشان داد دوز ۷۵ میلی‌گرم بـر کیلـوگرم از عصـارهٔ هسـتهٔ انگور باعث کاهش درد در فاز اولیه به طور معنی‌داری شد، هر چند کاهش درد در فاز مزمن بیشتر بود. تمامی گـروه-های دیگر مورد مطالعه نیز اختلاف معنی‌داری را با گـروه شاهد در هر دو فاز اولیـه و ثانویـهٔ درد نشـان مـی‌دهنـد. آزمون فرمالین برای بررسی مکانیسم ایجاد درد و مطالعـهٔ اثر ضدّ دردی ترکیبـات کـاربرد فراوانـی دارد. مرحلـهٔ اول (حاد) آزمون که در چند دقیقهٔ اول پس از تزریق کف پائی فرمالین رخ می‌دهد و نسبتاً زودگذر می‌باشد به علـت اثـر مستقیم مادهٔ محرک فرمالین بر فیبرهای حسـی نـوع C می‌باشد و فاز طولانی‌تر و مزمن (ثانویه) ایـن آزمـون بـه علت ایجاد تغییرات التهابی ناشی از آزاد شدن مدیاتورهای دردزا می‌باشد (۲۸). لذا این آزمون می‌تواند بـرای روشـن

شدن مکانیسم احتمالی اثر ضدّ دردی یک ضدّ درد مشخص به کار رود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصارهٔ هستهٔ انگور در تمامی دوزهای مورد مطالعه، رفتارهای دردی را در هر دو فاز اولیه و ثانویه مهار می‌نماید. اثر تولیدشده در فاز اولیه احتمالاً از طریق اثر مستقیم و فوری بر گیرنده‌های حسی، گیرنده‌های برادی کینین یا از طریق مسیر گلوتاماترژیک است در حالی که اثر ضدّ دردی بر مرحلهٔ ثانویه وابسته به پاسخ‌های التهابی القا شده از طریق آبشار اسید آراشیدونیک است (۲۸). با توجه به تأثیر هستهٔ انگور بر هر دو فاز اولیه و ثانویه در آزمون فرمالین، احتمالا عملکرد ضدّ دردی این عصاره نیز از طریق مکانیسم مرکزی صورت می‌پذیرد.

دراین رابطه، نتایج بررسی‌های قبلی نشان می‌دهد که ترکیبات فلاونوئیدی این گونه گیاهان به علت دارا بودن عوامل محافظت‌کننده قادر به اعمال اثرات ضدّ التهابی است (۱۶) که از این طریق احتمالاً می‌توانند شدت درد و التهاب را کاهش دهند. تأثیر مستقیم فلاونوئیدها بر سنتز پروستاگلاندین‌ها به طور قطع مشخص شده است (۲۹). با توجه به شواهد موجود، فلاونوئیدها با مهار آنزیم سیکلواکسیژناز تولید پروستاگلاندین‌ها را از اسید آراشیدونیک در پاسخ به محرک‌های التهابی مهار می‌کنند و در نتیجه از حساس شدن گیرنده‌های درد که به وسیلهٔ این مولکول‌ها به وجود می‌آید جلوگیری می‌شود و متعاقباً احساس دردی را که به همراه این پاسخ‌ها می‌باشد کم می‌کند (۳۱،۳۰). فلاونوئیدها یکی از مهار کننده‌های آنزیم سنتزکنندهٔ نیتریک اکساید (NO[1]) به شمار می‌روند و مانع تولید NO می‌شوند که به دنبال تزریق فرمالین افزایش می‌یابد (۳۲). از آنجا که NO ممکن است میانجی پردردی باشد بنابراین کاهش آن منجر به فعالیت بی‌دردی می‌شود (۳۳). ازطرفی فرآیندهای ضدّ التهابی با افزایش مهار فعّالیت رادیکال‌های آزاد همراه است (۳۴). در این راستا فلاونوئیدهای موجود در عصارهٔ هستهٔ انگور با اعمال اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌توانند اثرات ضدّ دردی هستهٔ انگور را در این بررسی تا حدودی توجیه نمایند. در این مورد مشخص شد که پروآنتوسیانیدین، مؤثرترین ترکیب آنتی-اکسیدانی هستهٔ انگور، قادر به تنظیم فعّالیت آنزیم‌های دخیل در مهار رادیکال‌های آزاد اکسیژن نظیر سوپراکسید دیس موتاز و گلوتاتیون پراکسیداز است (۱۸). بخش دیگر از اثر ضدّ التهابی پروآنتوسیانیدین را می‌توان به توانائی آن‌ها در کاهش فعّالیت یک سری از آنزیم‌هایی مانند ایزوفرم‌های نیتریک اکساید سنتاز و سیکلواکسیژناز دو، مهار بیوسنتز پروستاگلاندین‌ها و نیتریک اکساید و کاهش تعداد سلول‌های التهابی نسبت داد که این خود موجب کاهش پیشرفت التهابی می‌گردد (۱۷). به نظر می‌رسد پروآنتوسیانیدین از طریق تنظیم بسیاری از میانجی‌های درگیر در پاسخ التهابی، مهار نفوذ سلول های التهابی و آسیب‌های اکسیداتیو و بهبود فرایند ترمیم بافت آسیب‌دیده باعث کاهش التهاب می‌شود (۲۴).

بررسی آماری نتایج آزمون صفحهٔ داغ نشان می‌دهد که تجویز عصاره در دوزهای ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه شاهد به صورت معنی‌داری سبب افزایش آستانهٔ درد پس از تزریق عصاره می‌گردد.

آزمون صفحهٔ داغ یک آزمون انتخابی برای ترکیبات شبه اپیوئیدی است، اما سایر داروهایی که به صورت مرکزی عمل می‌نمایند مانند خواب‌آورها و شل‌کننده‌های عضلانی نیز اثرات مشابهی را نشان می‌دهند. به طور خلاصه می-توان بیان نمود که آزمون صفحهٔ داغ پاسخ ضدّ دردی به محرک‌های سریع‌الاثر را بررسی می‌کند، در حالی که آزمون فرمالین پاسخ به محرک‌های درد تأخیری را نیز اندازه‌گیری می‌نماید، بدین لحاظ به موارد بالینی نزدیک‌تر است. مقایسهٔ اثر کاهش درد حاد ناشی از صفحهٔ داغ با کاهش درد حاد فرمالینی تقریباً در یک راستا بوده و با توجه به اینکه ایجاد دردهای ناشی از صفحهٔ داغ بیشتر به صورت مرکزی عمل می‌کنند، بنابراین نتایج کاهش درد در آزمون صفحهٔ داغ و مرحلهٔ حاد فرمالینی تأییدی بر عملکرد عصاره به صورت مرکزی می‌باشد. تأثیر عصاره بر مرحلهٔ دوم یا التهابی درد فرمالینی می‌تواند به طور احتمالی بیانگر

[1] Nitric oxide

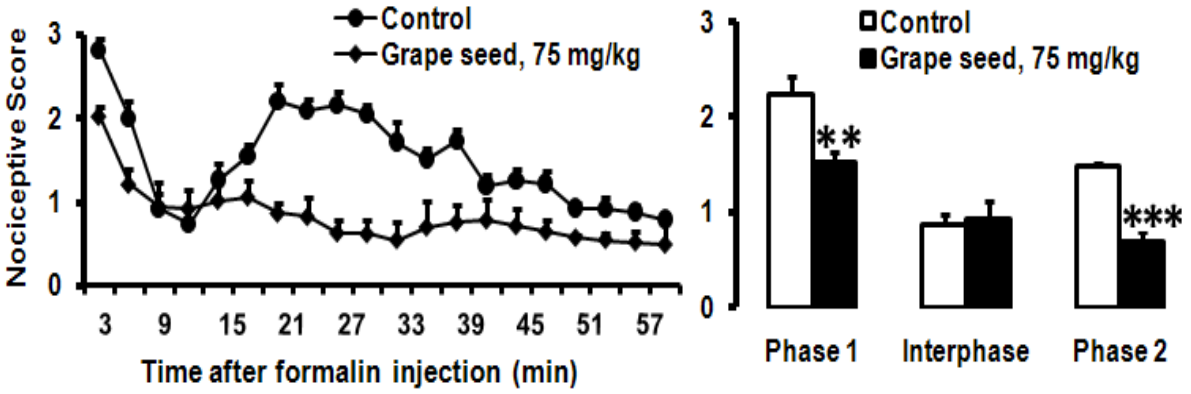
این باشد که هستهٔ انگور از طریق تعدیل واسطه‌های محیطی باعث کاهش درد می‌شود. البته با در نظرگیری اینکه کاهش درد التهابی متعاقب کاهش درد در مرحلهٔ اول فرمالین می‌باشد می‌توان گفت احتمالاً عصاره در مرحلهٔ التهابی درد به شکل مستقیم با تعدیل واسطه‌های موضعی درد یا به شکل غیرمستقیم به دنبال کاهش درد حاد ایجاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری:

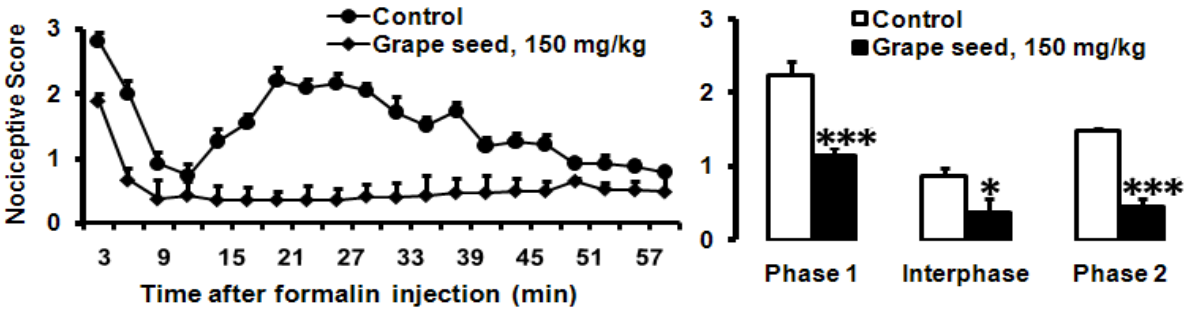
نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که عصارهٔ هیدروالکلی هستهٔ انگور دارای خواص ضدّ دردی است و می‌تواند جای‌گزین مناسبی برای داروهای شیمیایی ضدّ دردی باشد. پیشنهاد می‌شود از آزمایش‌های دیگر درد و التهاب و فراکسیون‌های مختلف عصاره استفاده گردد و همچنین با تداخل عصاره با آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های مؤثر بر درد و التهاب می‌توان مسیرهای دقیق تأثیر عصارهٔ هستهٔ انگور را مشخص نمود.

تشکر و قدردانی:

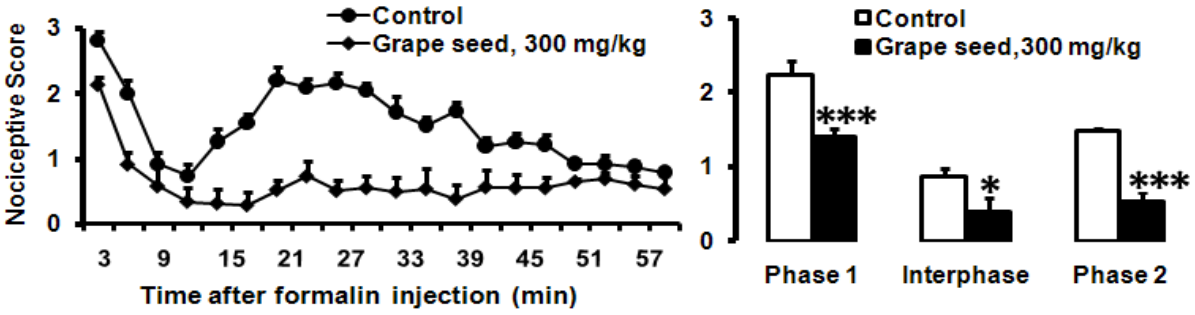
این طرح با کد تصویب ۲۴۷ در کمیتهٔ اخلاق در پژوهش پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین به تصویب رسیده است. از معاونت پژوهشی این دانشگاه به خاطر تصویب و تأمین هزینه‌های انجام این طرح تحقیقاتی صمیمانه سپاس‌گزاری می‌گردد.



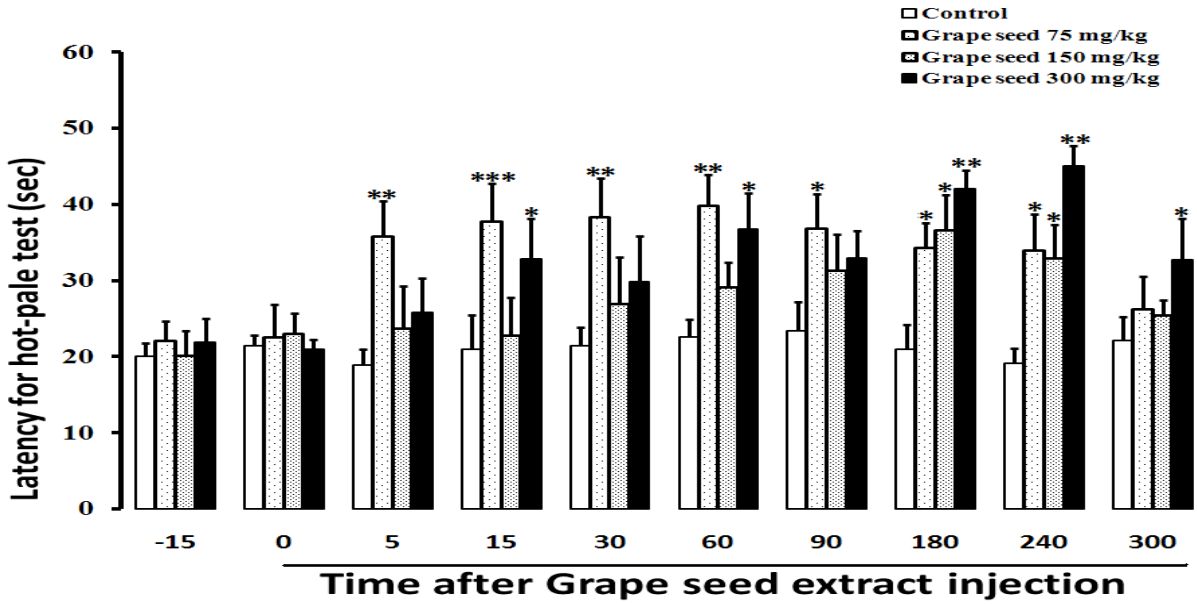
شکل ۱- اثر تزریق عصارهٔ انگور در دوز ۷۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم بر روی رفتارهای دردی ناشی از تزریق فرمالین برای مدت زمان ۶۰ دقیقه (A) و نمودار ستونی میانگین نمرهٔ آزمون فرمالین در فاز ۱، اینترفاز و فاز ۲ آزمون فرمالین (B).



شکل ۲- اثر تزریق عصارهٔ انگور در دوز ۱۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم بر روی رفتارهای دردی ناشی از تزریق فرمالین برای مدت زمان ۶۰ دقیقه (A) و نمودار ستونی میانگین نمرهٔ آزمون فرمالین در فاز ۱، اینترفاز و فاز ۲ آزمون فرمالین (B).



شکل ۳- اثر تزریق عصارهٔ انگور در دوز ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم بر روی رفتارهای دردی ناشی از تزریق فرمالین برای مدت زمان ۶۰ دقیقه (A) و نمودار ستونی میانگین نمرهٔ آزمون فرمالین در فاز ۱، اینترفاز و فاز ۲ آزمون فرمالین (B).



شکل ۴- اثر تزریق عصارهٔ انگور در دوزهای ۷۵ ، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم بر روی رفتارهای دردی ناشی از آزمون صفحهٔ داغ برای مدت زمان ۳۰۰ دقیقه.

References:

1. Almeida R, Navarro D, Barbosa-Filho J. Plants with central analgesic activity. Phytomedicine. 2001; 8(4):310-22.
2. Schoenen J, Sandor P. Textbook of pain. Edinburgh : Churchill Livingstone; 1999.
3. Harrison L, Kastin A, Zadina J. Opiate tolerance and dependence: Receptors, G-proteins and antiopiates. Peptides. 1998; 19: 1603-30.
4. Mangione M, M. C-M. Improving pain management communication: how patients understand the terms "opioid" and "narcotic". Journal of General Internal Medicine . 2008; 23(9): 1336-8.
5. Waldhoer M, Bartlett S, Whistler J. Opioid receptors. .Annual Review of Biochemistry. 2004;73:953-90.
6. Law P, Loh H, Wei L. Insights into the receptor transcription and signalling: Implications in opioid tolerance and dependence. Neuropharmacology. 2004; 47:300-11.
7. Simmons D, Botting R, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. Pharmacolgical Reviews. 2004; 56(3): 387-437.
8. Rostom A, Dubé C, Lewin G, Tsertsvadze A, Barrowman N, Code C, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors for primary prevention of colorectal cancer: a systematic review prepared for the U.S. Preventive Services Task Force. Annals of Internal Medicine. 2007; 146(5): 376-89.
9. Huang K. The Pharmacology of Chinase Herb. 2nd ed. USA: CRC Press; 1999.
10. Feng Y, Liu Y, Fratkins J, Le Blan M. Grape seed extract suppresses lipid peroxidation and reduces hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. Brain Research Bulletin. 2005; 66: 120-7.
11. Spranger I, Sun B, Mateus A, de Freitas V, Ricardo-da-Silva J. Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds. Food Chemistry. 2008; 108: 519-32.
12. Nassiri-Asl M, Hosseinzadeh H. Review of the pharmacological effects of Vitis vinifera (Grape) and its bioactive compounds. Phytotherapy Research. 2009; 23(9): 1197-204.
13. Shi J, Yu J, Pohorly JE, Kakuda Y. Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. Journal of medicinal food. 2003; 6(4): 291-9.
14. Bagchi D, Sen CK, Ray SD, Das DK, Bagchi M, Preuss HG, et al. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. Mutation research. 2003; 523-524: 87-97.
15. Terra X, Montagut G, Bustos M, Llopiz N, Ardevol A, Blade C, et al. Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. The Journal of nutritional biochemistry. 2009; 20(3): 210-8.
16. Chacon MR, Ceperuelo-Mallafre V, Maymo-Masip E, Mateo-Sanz

JM, Arola L, Guitierrez C, et al. Grape-seed procyanidins modulate inflammation on human differentiated adipocytes in vitro. Cytokine. 2009; 47(2):137-42.
17. Zhou DY, Du Q, Li RR, Huang M, Zhang Q, Wei GZ. Grape seed proanthocyanidin extract attenuates airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma by downregulating inducible nitric oxide synthase. Planta medica. 2011;77(14):1575-1.
18. Shan Y, Ye X, Xin H. Effect of the grape seed proanthocyanidin extract on the free radical and energy metabolism indicators during the movement Scientific Sci. Res. Essays 2010;5(2):148-53.
19. Yamakoshi J, Saito M, Kataoka S, Kikuchi M. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. 2002; 40(5): 599-607.
20. Woo YJ, Joo YB, Jung YO, Ju JH, Cho ML, Oh HJ, et al. Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. Experimental & molecular medicine. 2011; 31; 43(10):561-70.
21. Cho ML, Heo YJ, Park MK, Oh HJ, Park JS, Woo YJ, et al. Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) attenuates collagen-induced arthritis. Immunology letters. 2009; 124(2): 102-10.
22. Banerjee B, Bagchi D. Beneficial effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract in the treatment of chronic pancreatitis. Digestion. 2001; 63(3):203-6.
23. Iwasaki Y, Matsui T, Arakawa Y. The protective and hormonal effects of proanthocyanidin against gastric mucosal injury in Wistar rats. Journal of gastroenterology. 2004; 39(9): 831-7.
24. Li XL, Cai YQ, Qin H, Wu YJ. Therapeutic effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds in rats with TNBS-induced ulcerative colitis. Canadian journal of physiology and pharmacology. 2008; 86(12): 841-9.
25. H. S. Extraction of effective materials of medicinal plantand methods for their identification and evaluation: Mani; 1371.
26. Azhdari Zarmehri H, Semnanian S, Fathollahi Y, Erami E, Khakpay R, Azizi H, et al. Intra-Periaqueductal Gray Matter Microinjection of Orexin-A Decreases Formalin-Induced Nociceptive Behaviors in Adult Male Rats. The Journal of Pain. 2011; 12(2): 280-7.
27. Gary J. Animal Models of Pain. Methods in Pain Research. New York: CRC Press; 2001.
28. Azhdari-Zarmehri H, Semnanian S, Fathollahi Y, Pakdell F. Responsiveness of paragigantocellularis nucleus neurons in morphinedependent rats to Forskolin in vivo: Single unitrecording. . Yakhteh. 2005; 6: 194-201.
29. Alcaraz M, Hongli R. Actions of flavonoids and the novel anti-inflammatory flavones, Hyperlactin-8-glucoside, on prostaglandin biosynthesis and inactivation. Biochemical Pharmacology. 1985; 34(14): 2477-82.

30. Katzung B. Basic and clinical pharmacology. 6th ed. ed. New york: conn Appleton and lung co; 1995.
31. Ahmadiani A, Hosseiny J, Semnanian S, Javan M, Saeedi F, Kamalinejad M, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Elaeagnus angustifolia fruit extract. Journal of ethnopharmacology. 2000; 72(1-2): 287-92.
32. Toker G, Kupeli E, Memisoglu M, Yesilada E. Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of Tiliaargentea (silver linden). Journal of Ethnopharmacology. 2004; 95(2-3): 393-7.
33. Ozek M, Uresin Y, Gungor M. Comparison of the effects of specific and nonspecific inhibition of nitric oxide synthase on morphine analgesia, tolerance and dependence in mice. Life Sciences. 2003; 72(17): 1943-51.
34. Rezazadeh S, Zaringhalam J, Manaheji H, Kebryaeezadeh A. Anti-inflammatory and hyperalgesic activities of Stachysathorecalyx on CFA-induced inflammation. Journal of Medicinal Plants 2009; 3(5): 368-76.

Original Article

The Antinociceptive Effects of Hydroalcholic Extract of Grape Seed Using Hot Plate and Formalin Tests in Male Mice

Ahmadian-Baghbadorani N[1], Rajaei F*[2], Azhdari-Zarmehri H[3], Pozesh S[4]

1. MSc. Qazvin University Of Medical Sciences, Qazvin University Of Medical Sciences.
2. Dr. Professor Qazvin University Of Medical Sciences, Qazvin University Of Medical Sciences.
3. Dr. Assistant Professor Qazvin University Of Medical Sciences, Qazvin University Of Medical Sciences.
4. BSc. 2Paramedical school, Qazvin University of Medical Sciences, 2Paramedical school, Qazvin University of Medical Sciences.

Received: 16 December, 2012; Accepted: 21 December, 2013

Abstract

Introduction: The application of herbal plants instead of synthetic drugs is increasing in recent years because of their lower side-effects and high varieties of efficient components. The aim of the present study was to evaluate the antinociceptive effects of hydroalcholic extract of grape seed using hot plate and formalin test.

Methods: This experimental study has been done on 56 NMRI male mice (28±3 g) (n = 7 in each group) in weight. The hot plate and formalin test were used for acute and chronic pain. After preparation of extract, to evaluate the effect of pain related behaviors on antinociception, animals systemically received grape seed extract (75, 150, 300, mg/kg) and after 30 min pain related behaviour was monitored in formalin and for hotplate tests. The data was analyzed using SPSS software and ANOVA at significance level $p < 0/05$.

Results: The results showed that hydroalcholic Grape seed extract (75, 150, 300, mg/kg), significantly can induce antinociception in both phases of formalin test. Also, the Grape seed extract caused delay in painful behaviours (licking and jumping) in hot-plate test.

Conclusion: The present results show that hydroalcoholic extract of grape seed has analgesic properties in response to acute and chronic pain in the formalin with hot plate tests and can be substituted for chemical analgesic drugs.

Keywords: Antinociceptive, Grape seed hydroalcholic extract, hot plate and formalin test, mice.

*Corresponding author: E.mail: farzadraj@yahoo.co.uk