فصلنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال پانزدهم، شماره ۱، صفحه ۲۴ - ۱۳ (بهار ۱۳۹۱)

بررسی اثرات ضددردی و ضدالتهابی عصاره متانولیک برگ درخت زیتون در موش‌های نر بالغ نژاد NMRI

الهه تکیه[۱]، سارا مقدم‌کیا[۲]، اکرم عیدی[۲]، رضا تقی‌زادفرید[۳]، روح‌اله فردوسی[۴]، جلال زرین‌قلم[۱*]

[۱] گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران
[۳] گروه فارماکوگنوزی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی
[۴] انستیتو تحقیقات تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

زمینه: ادم و درد از علائم اصلی بیماری‌های التهابی می‌باشند که به‌دلیل تعدد میانجی‌های القاءکننده معمولاً درمان آن با مشکلاتی همراه می‌باشد. استفاده از گیاهان دارویی به‌عنوان یکی از عوامل مهم مورد استفاده در بهبود علائم التهابی در جوامع مطرح می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات عصاره متانولیک برگ درخت زیتون برروی مدل‌های مختلف التهاب و درد در موش‌های کوچک سوری بود.

مواد و روش‌ها: عصاره متانولیک برگ درخت زیتون تهیه و دوزهای مختلف آن (۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به‌صورت داخل صفاقی (۳۰ دقیقه قبل از تزریق فرمالین، اسید استیک و زایلن) به موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI تزریق شد. تأثیر تجویز عصاره بر علائم مربوط به التهاب و درد حیوانات طی تست‌های فرمالین، اسیداستیک و زایلن مورد بررسی قرار گرفت. داروهای ایندومتاسین، مورفین و دگزامتازون در گروه‌های کنترل مثبت بسته به شرایط استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه بیانگر اثرات معنی‌دار و وابسته به دوز عصاره متانولیک برگ درخت زیتون بر روی درد ناشی از تزریق فرمالین در هر دو فاز مطالعه، درد احشایی ناشی از تست اسید استیک و التهاب ناشی از تزریق زایلن بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد که تجویز عصاره متانولیک برگ درخت زیتون می‌تواند به‌عنوان یک عامل ضدالتهابی و تعدیل کننده‌ی درد عمل کرده و این اثرات وابسته به دوز ممکن است بوسیله‌ی مواد مؤثره مختلف این گیاه میانجی‌گری شود که نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

واژگان کلیدی: زیتون (Olea europaea L)، درد، التهاب، رادیکال‌های آزاد

دریافت مقاله: ۸۹/۸/۱۳- **پذیرش مقاله:** ۸۹/۱۲/۱۱

* تهران، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

E-mail:jzaringhalam@yahoo.com

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2023-03-28]

مقدمه

سابقه درمان بیماری‌ها با گیاهان دارویی به‌قدمت تاریخ زیست انسان بر روی کره زمین است. انسان به حکم تجربه، علم و بنا به مقتضیات زمان به‌کمک گیاهان دارویی بسیاری از بیماری‌های خود را مداوا کرده و می‌کند. گرایش عمومی جامعه به استفاده از داروها و درمان‌های گیاهی و به‌طور کلی فرآورده‌های طبیعی به‌ویژه در طی سال‌های اخیر رو به افزایش بوده و مهم‌ترین علل آن، اثبات اثرات مخرب و جانبی داروهای شیمیایی از یک‌طرف و از سوی دیگر ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی است که کره زمین را تهدید می‌کند (۱).

ضمن اینکه طبق آمار سازمان بهداشت جهانی حدود ۸۰ درصد از مردم جهان، در کشورهای در حال توسعه و فقیر زندگی می‌کنند که به‌دلیل گران بودن داروهای سنتتیک، عدم دسترسی و وجود عوارض جانبی این داروها، عمده‌ترین نیازهای درمانی خود را از گیاهان دارویی تأمین می‌کنند. این عوامل باعث شده در سال‌های اخیر تحقیقات بسیار گسترده‌ای بر روی گونه‌های ویژه‌ای از این گیاهان که دارای اثرات مناسبی بر روی بسیاری از بیماری‌های بشر دارند، صورت گیرد. در حال حاضر، ۲۵ درصد از داروهای موجود در بازار دارویی جهان، منشأ گیاهی دارند (۲ و ۳).

گیاه زیتون از جمله گیاهانی است که از گذشته‌های بسیار دور به‌عنوان یک گیاه دارویی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفته است. زیتون Olea europaea L. از خانواده (Oleaceae) است. برگ درخت زیتون نسبتاً ضخیم، باریک، سبز تیره، دائمی و همیشه سبز است. قسمت فوقانی یعنی روی سطح برگ کاملاً صاف و صیقلی است در صورتی که در سطح زیرین آن دسته‌های متفرق کرک مشاهده می‌شود (۴).

در قرون وسطی از برگ درخت زیتون در درمان بیماری‌ها از جمله رفع تب استفاده می‌شده است. گیاه زیتون بومی فلسطین بوده اما در نواحی وسیعی از کشورهای حوزه مدیترانه نیز کشت می‌شود (۵).

در مطالعات گذشته اثرات آنتی‌اکسیداتیو، آنتی‌دیورتیک و آنتی‌هپاتیت عصاره برگ زیتون به اثبات رسیده است (۶ و ۷). همچنین در بررسی‌های فارماکولوژیک برگ زیتون روی حیوانات آزمایشگاهی، اثرات کاهنده فشارخون و اسید اوریک و همچنین افزایش وزن مشاهده شده است، برخی مطالعات بیانگر اثرات ضددردی عصاره برگ درخت زیتون می‌باشند و مکانیسم احتمالی این اثر را از طریق مسیر کلسیم/کالمودولین نشان داده‌اند (۱۰-۸).

بررسی‌های ابتدایی فیتوشیمیایی برگ زیتون نیز حضور ترکیبات آلکالوئیدی، فلاونوئیدی، تانن‌ها و ساپونین‌ها را در برگ درخت زیتون نشان داده‌اند. برخی از این ترکیبات می‌توانند نقش مؤثری در کاهش علائم بیماری‌های التهابی داشته باشند (۱۱) التهاب، پاسخی فیزیولوژیک به محرک‌هایی مانند عفونت و زخم‌های بافتی است. درد و ادم از علائم شایع التهاب هستند. درد مکانیسمی حفاظتی برای بدن است که منجر به عکس‌العمل مناسب در جهت حذف عامل مخرب می‌شود. درد به‌عنوان علامتی از القا و تداوم بیماری‌ها در نظر گرفته می‌شود (۱۲).

داروهای ضدالتهابی باعث تعدیل فعالیت میانجی‌ها و آنزیم‌های التهابی می‌شوند. گیاهان دارویی با دارا بودن عوامل آنتی‌اکسیدان و فلاونوییدی کاربرد فراوانی در کاهش علائم التهابی دارند. مطالعات نشان داده که فلاونوئیدها دارای اثرات مشخصی در کاهش علائم التهابی حاد و همچنین اثر بازدارندگی بر روی فعالیت آنزیم‌های مختلف مثل پروتئین کیناز C فسفولیپاز A2 و

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2023-03-28]

فسفودی استراز (که از عوامل مهم دخیل در القاء علائم التهابی در نظر گرفته می‌شوند)، هستند (۱۳). اغلب مطالعات اثرات روغن زیتون را بر روی بیماری‌های مختلف بررسی کرده و روغن زیتون از دیرباز به‌طور سنتی برای کاهش کلسترول و جلوگیری از بیماری‌های قلبی مورد استفاده قرار می‌گرفته است که بررسی‌های اخیر نیز تأییدکننده این امر بود (۱۴). همچنین مطالعات نشان داده که روغن زیتون در جلوگیری از پوکی استخوان و سرطان کولون نیز نقش بسیار مؤثری دارد (۱۵). بنابراین با توجه به میزان بالای شیوع بیماری‌های التهابی در جوامع، نارسایی‌های موجود در درمان علائم التهابی با داروهای شیمیایی و عوارض بالای آنها (۴) و عدم انجام مطالعه جامع درباره نقش ضددردی و ضدالتهابی برگ زیتون، هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضددردی و ضدالتهابی دوزهای مختلف عصاره متانولی برگ زیتون در موش کوچک آزمایشگاهی تعریف شد.

مواد و روش‌کار

جمع‌آوری و عصاره‌گیری گیاه

برگ‌های زیتون از مزرعه پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج جمع‌آوری و پس از خشک‌شدن آسیاب شد. عصاره الکلی برگ زیتون به‌روش پرکولاسیون تهیه شد، ۵۰ گرم پودر برگ آسیاب شده را داخل بشر ریخته و به آن متانول ۸۰ درصد افزوده شد. پس از مدت ۲۴ ساعت محلول به‌درون پرکولاتور منتقل شد. پس از اضافه نمودن متانول ۸۰ درصد به‌عنوان حلال، شیر پرکولاتور تاحدی که سرعت جریان حلال ۲-۳ قطره در دقیقه باشد باز شد و پس از اطمینان از پایان عمل پرکولاسیون (حدود ۷۲ ساعت بعد) عصاره با استفاده از دستگاه تغلیظ، در خلاء تغلیظ شد (۱۶).تست‌های فیتوشیمیایی نرمال به‌روش‌های استاندارد موجود به‌منظور شناسایی فلاونوئیدها، ساپونین، آلکالوئید و ترپنوئیدها انجام شد.

بررسی فیتوشیمیایی

تست‌های فیتوشیمیایی نرمال به‌روش‌های استاندارد موجود به‌منظور شناسایی فلاونوئیدها، ساپونین، آلکالوئید و ترپنوئیدها انجام شد. به‌منظور شناسایی فلاونوئیدها از روش HPLC استفاده شد.

فرمولاسیون

عصاره‌های خشک شده در آب‌استریل تقطیر شده حاوی Tween۸۰ به‌عنوان ماده حلال، حل شده، سپس بوسیله‌ی کاغذ صافی فیلتر شدند و در نهایت محلول‌های فیلتر شده به‌منظور تزریق داخل صفاقی (i.p) 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 گیاهان با غلظت‌های ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی در حجمی کمتر از ۱ میلی‌لیتر استفاده شدند.

مورفین، ایندومتاسین و دگزامتازون نیز به‌عنوان داروهای استاندارد ضددردی وضدالتهابی به‌روش بالا و به‌ترتیب با دوزهای ۱۰، ۵ و ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌حجم ۰/۲ میلی‌لیتر به‌صورت درون صفاقی تزریق شد.

حیوانات آزمایشگاهی

در این مطالعه از حیوانات آزمایشگاهی نر بالغ NMRI با محدوده وزنی ۲۵-۳۰ گرم استفاده شد که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده و در قفس‌های پلی‌پروپیلن در شرایط استاندارد (۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد رطوبت ۶۰-۷۰ درصد 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 بر اساس قوانین کمیته اتیک، کار با حیوانات آزمایشگاهی بوده و برای ایجاد درد در حیوانات

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2023-03-28]

آزمایشگاهی نیز بر طبق استانداردهای Zimmerman عمل شد.

گروه‌های مورد آزمایش

موش‌های نر به ۶ گروه تقسیم شده که شامل: گروه کنترل (تزریق فرمالین)، گروه کنترل مثبت (تزریق فرمالین + سالبن)، گروه تیمار شده با دوزهای (۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) از عصاره متانولیک برگ درخت زیتون - و گروه‌های تیمار شده با دارو (مورفین، ایندومتاسین و یا دگزامتازون). در هر گروه تعداد ۶ سر موش نر بالغ نژاد NMRI در نظر گرفته شد (n=۶).

القاء درد با استفاده از تست فرمالین (Formalin test) و تأثیر عصاره برگ درخت زیتون بر آن

جهت انجام این آزمایش از جعبه شیشه‌ای به ابعاد ۱۳×۱۲×۳۰ سانتی‌متر استفاده شد، در فاصله‌ای از جعبه و سطح افق آینه‌ای با زاویه‌ی ۴۵ قرار داده شد تا مشاهدات آسان‌تر شود. هر حیوان ۳۰ دقیقه قبل از شروع آزمایش به‌منظور عادت کردن به‌محیط آزمایش در جعبه شیشه‌ای قرار داده شدند. ابتدا عصاره برگ درخت زیتون در دوزهای ۲۰۰، ۳۰۰ و۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت درون صفاقی به حیوان تزریق شد و پس از ۳۰ دقیقه مقدار ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد به‌صورت زیر جلدی به پشت پای راست حیوان تزریق شد. در گروه کنترل مثبت فقط فرمالین (۲/۵ درصد به‌میزان ۵۰ میکرولیتر) تزریق شد. عمل لیسیدن و گاز گرفتن پا طی دوره‌های زمانی ۰-۵ دقیقه (به‌عنوان فاز حاد و اولیه) و سپس ۱۵-۴۵ دقیقه (به‌عنوان فاز مزمن و ثانویه) بعد از تزریق فرمالین به‌عنوان شاخص درد و به‌صورت امتیازدهی مورد محاسبه قرار گرفت (۱۷). مورفین به‌عنوان داروی استاندارد به‌میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به حجم ۰/۲ میلی‌لیتر به‌صورت درون صفاقی تزریق شد.

نحوه امتیازدهی به رفتارهای حیوان

امتیاز صفر: حیوان بر روی دو پنچه خود قرار گرفته باشد. وزن حیوان به‌طور مساوی روی هر دو پا باشد و در حین حرکت هم ترجیح اختیاری برای استفاده از یک پا وجود نداشته باشد.

امتیاز یک: پای تزریق شده به آرامی روی کف پا یا بخشی از بدن حیوان قرار گرفته و فشار کمی روی آن اعمال شود. حرکت لنگ‌لنگان را نشان می‌دهد.

امتیاز دو: پای تزریق شده کاملاً از زمین برداشته شده و هیچ تماسی با سطح ندارد و بیشتر وزن بر روی پای مقابل است.

امتیاز سه: حیوان پای تزریق شده را لیسیده و گاز می‌گیرد و به‌شدت می‌لرزاند. این حرکت به‌طور مشخصی با رفتار حیوان جهت تمیزکردن خودش متفاوت است (۸).

القاء درد با استفاده از تست انقباضات شکمی (writhing test) و تأثیر عصاره برگ درخت زیتون بر آن

ابتدا موش‌ها با عصاره برگ درخت زیتون در دوزهای ۲۰۰، ۳۰۰ و۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت درون صفاقی تیمار شدند. بعد از ۳۰ دقیقه ۰/۲ میلی‌لیتر اسیداستیک ۱ درصد به‌حجم ۰/۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت درون صفاقی به حیوانات تزریق شد و ۵ دقیقه بعد از تزریق اسیداستیک تعداد انقباضات شکمی به گونه‌ای که هر دو پای عقبی موش کاملاً کشیده گردد به‌مدت ۳۰ دقیقه شمارش شد. در گروه کنترل مثبت فقط اسیداستیک ۱ درصد به‌حجم ۰/۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت درون صفاقی به حیوانات تزریق شد. ایندومتاسین به‌عنوان داروی استاندارد به‌میزان ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌حجم ۰/۲ میلی‌لیتر تزریق شد (۱۸).

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2023-03-28]

القاء التهاب با استفاده از تست ادم گوش توسط زایلن (Xylene) و تأثیر عصاره برگ درخت زیتون بر آن

ابتدا عصاره‌های برگ درخت زیتون در دوزهای ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت درون صفاقی به حیوانات تزریق شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه میزان ۰/۰۵ میلی‌لیتر کتامین به‌صورت درون صفاقی به موش‌ها تزریق و بی‌هوش شدند. پس از بی‌هوشی میزان ۰/۰۳ میلی‌لیتر زایلن خالص به‌سطح پشتی گوش راست تزریق و گوش چپ به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

در گروه کنترل مثبت فقط زایلن خالص به سطح پشتی گوش تزریق شد. دو ساعت پس از تزریق زایلن، حیوانات بوسیله‌ی کلروفرم کشته و توسط دستگاه cork borer قطعات ۷ میلی‌متری از هر دو گوش برداشته شد. قطعات وزن گردیده و اختلاف وزن بین گوش راست و چپ هر موش به‌عنوان میزان التهاب گزارش گردید (۱۹). دگزامتازون به‌عنوان داروی استاندارد به‌میزان ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌حجم ۰/۲ میلی‌لیتر به‌صورت درون صفاقی تزریق شد.

آنالیزهای آماری

مقایسه نتایج حاصل از مطالعه در داخل گروه‌ها از نظر آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) صورت گرفته و بررسی‌های داخل گروهی با استفاده از Unpaired t-test انجام شد. همه نتایج به‌صورت Mean±SEM گزارش گردید ($P<۰/۰۵$).

یافته‌ها

نتایج فیتوشیمیایی

بررسی‌های فیتوشیمیایی برگ زیتون نشان داد که عصاره برگ درخت زیتون مورد استفاده در این مطالعه حاوی فلاونوئیدها، ساپونین گلیکوزید، آلکالویید و تانن می‌باشد. عصاره متانولیک خشک حاوی ۰/۸۵ درصد فلاونویید بر پایه هیبروزید بود.

تأثیر تزریق درون صفاقی دوزهای مختلف عصاره متانولیک برگ درخت زیتون بر فاز اولیه درد القا شده توسط تست فرمالین در موش کوچک آزمایشگاهی نژاد NMRI

تزریق فرمالین در گروه کنترل مثبت (۲/۵ درصد به‌میزان ۵۰ میکرولیتر) منجر به ایجاد رفلکس‌هایی مانند، عمل لیسیدن و گاز گرفتن پا طی دوره‌های زمانی فاز حاد و اولیه (۰– ۵ دقیقه)(گروه کنترل: ۲/۳۸±۰/۰۴ و کنترل مثبت: ۲/۴۲±۰/۰۶۶) و فاز مزمن و ثانویه (۱۵–۴۵ دقیقه) (گروه کنترل: ۱/۳۲±۰/۰۳۷ و کنترل مثبت: ۱/۳۸±۰/۰۷۱) بعد از تزریق شد.

تزریق درون صفاقی عصاره برگ زیتون با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ۳۰ دقیقه قبل از تزریق فرمالین کاهش معنی‌داری را در فاز اولیه درد القا شده توسط تست فرمالین ایجاد نکرد (۲/۴۶±۰/۰۷۴) در حالی که تزریق دوزهای ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از این عصاره باعث کاهش معنی‌دار در فاز اولیه درد ناشی از فرمالین شد (دوز ۳۰۰: ۱/۸۸±۰/۰۷۳ و دوز ۴۰۰: ۱/۸۴±۰/۰۳۱) ($P<۰/۰۰۱$) تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیمار شده با دوزهای ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره متانولیک برگ درخت زیتون در طی فاز اولیه تست فرمالین در این مطالعه وجود نداشت. بنابراین دوز ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دوز مؤثر در نظر گرفته شد. تزریق مورفین (به‌عنوان داروی مؤثر بر درد فاز حاد تست فرمالین) با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم موجب کاهش معنی‌دار در فاز اولیه درد در مقایسه با گروه کنترل شد (۱/۲۴±۰/۰۹۲) ($P<۰/۰۰۱$). این کاهش درد در گروه تیمار شده با مورفین در مقایسه با گروه‌های تیمار

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2023-03-28]

شده با دوز مؤثر عصاره برگ زیتون (۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) معنی‌دار بود (P<۰/۰۵)(جدول ۱).

جدول ۱) تأثیر تزریق درون صفاقی دوزهای مختلف عصاره متابولیک برگ درخت زیتون بر فاز اولیه درد القا شده توسط تست فرمالین

گروه‌ها	کنترل (فرمالین)	کنترل مثبت (فرمالین+سالین)	عصاره ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم	عصاره ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم	عصاره ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم	مورفین ۱۰میلی‌گرم بر کیلوگرم
امتیاز پاسخ به درد (۰-۵ دقیقه بعد از تزریق)	۲/۳۸±۰/۰۴	۲/۴۲±۰/۰۶۶	۲/۴۶±۰/۷۴	۱/۸۸±۰/۷۳ ***	۱/۸۴±۰/۰۳۱ ***	۱/۲۴±۰/۹۲ *** ▲

نتایج به صورت mean±SEM بیان شده و n=6 است.

(P<۰/۰۰۱)*** :مقایسه گروه‌های تیمار شده با عصاره متابولیک برگ زیتون و مورفین، با گروه کنترل در فاز اولیه (۰-۵ دقیقه بعد از تزریق فرمالین)

(P<۰/۰۵)▲: مقایسه گروه تیمار شده با مورفین (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و گروه تیمار شده با دوز موثر عصاره برگ زیتون (۳۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم)

تأثیر تزریق درون صفاقی دوزهای مختلف عصاره متانولیک برگ درخت زیتون بر فاز ثانویه درد القا شده توسط تست فرمالین در موش کوچک آزمایشگاهی نژاد NMRI

تزریق درون صفاقی عصاره برگ زیتون با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، تأثیری در فاز ثانویه درد القا شده توسط تست فرمالین (۴۵-۱۵ دقیقه بعد از تزریق فرمالین) نیز نشان نداد (۱/۴۸±۰/۰۴۷)، ولی دوزهای ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم این عصاره باعث کاهش معنی‌دار در رتبه عددی مربوط به فاز ثانویه درد شد (دوز ۳۰۰: ۰/۷۹±۰/۰۳۱ و دوز ۴۰۰: ۰/۷۴±۰/۰۳۲)(P<۰/۰۰۱).

گروه‌های تیمار شده با دوزهای ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره متانولیک برگ درخت زیتون تفاوت معنی‌داری در طی فاز ثانویه تست فرمالین در این مطالعه نشان ندادند. تزریق مورفین با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیز موجب کاهش معنی‌دار در رتبه عددی درد طی فاز ثانویه در مقایسه با گروه کنترل شد (۰/۵±۰/۰۲۹)(P<۰/۰۰۱).

لازم به‌ذکر است که تزریق مورفین در مقایسه با تجویز دوز مؤثر عصاره برگ زیتون (۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در کاهش درد طی فاز ثانویه مؤثرتر بود (P<۰/۰۵)(جدول ۲).

جدول ۲) تأثیر تزریق درون صفاقی دوزهای مختلف عصاره متابولیک برگ درخت زیتون بر فاز ثانویه درد القا شده توسط تست فرمالین

گروه‌ها	کنترل (فرمالین)	کنترل مثبت (فرمالین+سالین)	عصاره ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم	عصاره ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم	عصاره ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم	مورفین ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم
امتیاز پاسخ به درد ۱۵-۴۵ دقیقه بعد از تزریق)	۱/۳۲±۰/۰۳۷	۱/۳۸±۰/۰۷۱	۱/۴۸±۰/۰۴۷	۰/۷۹±۰/۰۳۱ ***	۰/۷۴±۰/۰۳۲ ***	۰/۵±۰/۰۲۹ *** ▲

نتایج به صورت mean±SEM بیان شده و n=6 است.

(P<۰/۰۰۱)*** :مقایسه گروه‌های تیمار شده با عصاره متابولیک برگ زیتون و مورفین، با گروه کنترل در فاز ثانویه (۱۵-۴۵ دقیقه بعد از تزریق فرمالین)

(P<۰/۰۵)▲: مقایسه گروه تیمار شده با مورفین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و گروه تیمار شده با دوز موثر عصاره برگ زیتون (۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2023-03-28]

تأثیر تزریق درون صفاقی دوزهای مختلف عصاره متانولیک برگ درخت زیتون بر تعداد انقباضات شکمی ایجاد شده توسط تست اسیداستیک در موش کوچک آزمایشگاهی نژاد NMRI

تزریق۰/۲ میلی‌لیتر اسید استیک ۱ درصد به‌صورت درون صفاقی در گروه کنترل و کنترل مثبت باعث ایجاد انقباضات شکمی به گونه‌ای که هر دو پای عقبی موش کاملاً کشیده می‌شود، گردید (کنترل: ۳/۳۶±۷۹ و کنترل مثبت:۳/۰۴±۷۹/۵). تزریق درون صفاقی عصاره برگ زیتون ۳۰ دقیقه قبل از تزریق اسیداستیک با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش معنی‌داری در تعداد انقباضات شکمی القا شده توسط اسیداستیک ایجاد نکرد (۴/۵۳±۶۹/۸). دوزهای ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم این عصاره باعث کاهش معنی‌دار تعداد انقباضات شکمی شد (دوز ۳۰۰: ۱/۰۷±۵۰/۶ و دوز ۴۰۰: ۱/۱۵±۴۹/۶) (P<۰/۰۰۱). تفاوت مشخصی بین گروه‌های تیمار شده با دوزهای ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره متانولیک از نظر کاهش تعداد انقباضات شکمی طی این مطالعه وجود نداشت. تزریق ایندومتاسین (به‌عنوان داروی ضدالتهابی مؤثر در تست اسیداستیک) با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش معنی‌داری را در تعداد انقباضات شکمی در مقایسه با گروه کنترل نشان (۱/۵۳±۱۵/۴)(P<۰/۰۰۱). کاهش تعداد انقباضات شکمی در گروه تیمار شده با ایندومتاسین در مقایسه با گروه‌های تیمار شده با دوز مؤثر عصاره برگ زیتون (۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۰۱) (جدول ۳).

جدول ۳) تأثیر تزریق درون صفاقی دوزهای مختلف عصاره متابولیک برگ درخت زیتون بر تعداد انقباضات شکمی ایجاد شده توسط تست اسید استیک فاز

گروه‌ها	کنترل (اسیداستیک)	کنترل مثبت (اسیداستیک+سالین)	عصاره ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم	عصاره ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم	عصاره ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم	ایندومایسین ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم
تعداد انقباضات شکمی	۷۹±۳/۳۶	۷۹/۵±۳/۰۴	۶۹/۸±۴/۵۳	۵۰/۶±۱/۰۷ ***	۴۹/۶±۱/۱۵ ***	۱۵/۴±۱/۵۳ *** ▲

نتایج به صورت mean±SEM بیان شده و n=6 است.

(P<۰/۰۰۱)***: مقایسه گروه‌های تیمار شده با عصاره متابولیک برگ زیتون با گروه کنترل.

(P<۰/۰۰۱)▲: مقایسه گروه تیمار شده با ایندومایسین(۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و گروه تیمار شده با دوز موثر عصاره برگ زیتون (۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)

تأثیر تزریق درون صفاقی دوزهای مختلف عصاره متانولیک برگ درخت زیتون بر التهاب ایجاد شده توسط زایلن در موش کوچک آزمایشگاهی نژاد NMRI

تزریق درون صفاقی عصاره برگ درخت زیتون با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت درون صفاقی تأثیر معنی‌داری در کاهش التهاب ایجاد شده توسط تزریق زایلن در گوش ایجاد نکرد (۰/۳۵±۱۳/۹).

نتایج نشان داد که تزریق عصاره با دوزهای ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث کاهش معنی‌دار حجم گوش ملتهب در مقایسه با گوش سالم حیوان شد (دوز ۳۰۰: ۰/۷۴±۸/۴۴ و دوز ۴۰۰: ۰/۵۴±۸/۰۲) (P<۰/۰۰۱). تفاوت مشخصی بین گروه‌های تیمار شده با دوزهای ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره متانولیک برگ درخت زیتون در کاهش التهاب وجود نداشت. تزریق دگزامتازون (داروی استاندارد کورتیکوستروییدی و ضدالتهابی) با دوز ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم موجب کاهش معنی‌دار حجم گوش تیمار شده نسبت به گوش سالم شد (۰/۱۹±۴/۲۲)(P<۰/۰۰۱). کاهش ادم گوش در گروه

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2023-03-28]

تیمار شده با دگزامتازون در مقایسه با گروه تیمار شده با دوز مؤثر عصاره برگ زیتون (۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) معنی‌دارتر بود (P<۰/۰۱) (جدول ۴).

جدول ۴) تأثیر درون صفاقی دوزهای مختلف عصاره متابولیک برگ درخت زیتون بر التهاب ایجاد شده توسط تست زایلن

گروه‌ها	کنترل (زایلن)	کنترل مثبت (زایلن+سالین)	عصاره ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم	عصاره ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم	عصاره ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم	دگزامتازون ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم
اختلاف وزن گوش چپ و راست (برحسب میلی‌گرم)	۱۳/۶±۰/۴۲	۱۳/۹۶±۰/۵۹	۱۳/۹±۰/۳۵	۸/۴۴±۰/۷۴ ***	۸/۰۲±۰/۵۴ ***	۴/۲۲±۰/۱۹ *** ▲▲

نتایج به صورت mean±SEM بیان شده و n=6 است.

(P<۰/۰۰۱)***: مقایسه گروه‌های تیمار شده با عصاره متابولیک برگ زیتون با گروه کنترل

(P<۰/۰۵)▲▲: مقایسه گروه تیمار شده با دگزامتازون (۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و گروه تیمار شده با دوز موثر عصاره برگ زیتون (۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که درمان با عصاره برگ درخت زیتون باعث کاهش معنی‌دار علائم التهابی مانند ادم و درد در مدل‌های مختلف آزمایشگاهی (تست فرمالین، تست اسیداستیک و تست زایلن) می‌شود. بررسی‌های قبلی اثرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌دیورتیکی برگ درخت زیتون را نشان داده‌اند (۶). این مطالعات همچنین نشان دادند که عصاره برگ درخت زیتون با کاهش رادیکال‌های آزاد باعث کاهش سطوح سرمی LDL و همین‌طور باعث کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از سیگار کشیدن می‌شود (۷). برخی مطالعات نیز همسو با مطالعه ما اثرات ضددردی عصاره برگ زیتون را در التهاب حاد نشان داده‌اند. ماهانی و همکاران طی مطالعه‌ای نشان دادند که تجویز عصاره برگ درخت زیتون باعث کاهش علائم درد حاد در موش‌های رت نژاد ویستار می‌شوند (۸). ما طی این مطالعه علاوه بر بررسی اثرات ضددردی حاد و مزمن تجویز پیش درمان عصاره برگ زیتون، اثرات ضدالتهابی این عصاره برروی التهاب حاصل از تزریق زایلن و درد احشایی ناشی ازاسیداستیک را نیز مورد بررسی قرار دادیم. تجویز دوزهای ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره متانولیک برگ درخت زیتون طی این مطالعه به‌صورت داخل صفاقی به‌موش‌های نر اثرات مختلفی را بر روی مدل‌های درد و التهاب ناشی از تست‌های فرمالین (فاز اولیه و ثانویه)، اسیداستیک و زایلن نشان داد. نتایج مطالعه حاکی از این بود که تجویز عصاره متانولیک برگ درخت زیتون با دوز ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌تواند تأثیر معنی‌داری را در کاهش علائم التهابی و درد شرایط مختلف التهابی و درد را نشان دهد. علت استفاده از مدل‌های مختلف درد و التهاب طی این مطالعه تفاوت فیزیوپاتولوژی و فارماکولوژی انواع درد می‌باشد که نه تنها روند علائم بلکه پاسخ به‌درمان آنها را نیز از هم متمایز می‌سازد.

تست فرمالین مدلی پذیرفته شده برای ایجاد درد حاد محیطی و تونیک مرکزی است. استفاده از این مدل در بررسی نقش ضددردی حاد و مزمن داروهای مختلف حائز اهمیت است. رفتارهای مرتبط با درد القا شده توسط تزریق زیر جلدی فرمالین در دو فاز

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2023-03-28]

اولیه (۰-۵ دقیقه) و ثانویه (۱۵-۴۵ دقیقه) طبقه‌بندی می‌شوند. فاز اولیه ناشی از تحریک گیرنده‌های محیطی درد در ناحیه تزریق می‌باشد، در حالی که فاز ثانویه به‌دنبال ادامه ارسال پیام‌های درد به سیستم عصبی مرکزی و تداوم آزاد شدن میانجی‌گرهای شیمیایی از جمله هیستامین، سروتونین، پروستاگلاندین و برادی کینین ایجاد شده و به‌عنوان مدلی از درد التهابی مزمن هم در مطالعات مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۷).

تزریق اسیداستیک (به‌عنوان مدل درد احشایی) و زایلن (به‌عنوان مدل التهاب) نیز با تحریک آزادسازی میانجی‌گرهای شیمیایی مانند پروستاگلاندین‌ها، سایتوکین‌ها و برادی کینین در نهایت باعث ایجاد علائم التهابی از جمله ادم و دردهای التهابی احشایی (به‌صورت انقباضات شکمی) می‌شود (۲۰). نتایج بررسی‌های فیتوشیمیایی این مطالعه حاکی از حضور عوامل شیمیایی متنوعی از جمله فلاونوئیدها (به‌ویژه هیدروکسی فلاونوئید)، ساپونین‌ها، آلکالویید و تانن در عصاره متانولیک برگ درخت زیتون بود. تحقیقات قبلی نشان داده که علاوه بر این مواد، عصاره برگ درخت زیتون حاوی ترکیبات فنولی نیز می‌باشد (۲۱).

فلاونوئیدهای موجود در ترکیبات گیاهی با دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی در گروه عوامل ضدالتهابی مؤثر و قوی قرار می‌گیرند (۲۲ و ۲۳). فلاونوئیدها دارای خاصیت مهارکنندگی بر روی بسیاری از آنزیم‌های مؤثر در التهاب از جمله پروتئین کیناز C، فسفولیپاز A2 و فسفودی استرازها می‌باشند. فلاونوییدها با مهار و یا کاهش فعالیت این آنزیم‌ها باعث کاهش آزادسازی برخی عوامل التهابی از جمله ترکیبات پروساگلاندینی، سایتوکاینی و هیستامینی می‌شوند (۱۳). از طرفی در گزارشات متفاوتی اثرات ضددردی ساپونین‌ها و آلکالوییدها نیز نشان داده شده است (۲۴ و ۲۵). بنابراین به‌نظر می‌رسد بخش زیادی از اثرات ضددردی و ضدالتهابی برگ درخت زیتون در این بررسی نیز با حضور این عوامل در عصاره متانولیک مرتبط باشد.

از طرف دیگر نتایج بررسی نشان داد که اثرات ضددردی و ضدالتهابی داروهای استاندارد مورد استفاده طی این مطالعه (مورفین، ایندومتاسین و دگزامتازون) در مقایسه با دوز مؤثر عصاره (۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) قوی‌تر و میزان اثربخشی این داروها بیشتر بود. علت این امر می‌تواند از طرفی به‌دلیل پایین بودن میزان مواد مؤثره ضدالتهابی (به‌ویژه فلاونوییدها) در عصاره متانولیک برگ زیتون بوده و از سوی دیگر تفاوت زمان جذب و تأثیر عصاره متانولیک با داروهای صناعی (که با در نظر گرفتن همه این موارد طراحی و تولید شده‌اند) در نظر گرفت (۲۶).

بنابراین پیشنهاد می‌شود جهت به‌دست آوردن نتایج جامع‌تر انواع عصاره‌های برگ زیتون جهت مقایسه اثرات ضددردی و التهابی اجزاء مختلف گیاه طی زمان‌های متفاوت بررسی گردند.

نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد که تزریق عصاره متانولیک برگ درخت زیتون باعث کاهش وابسته به دوز علائم التهابی و درد می‌گردد و این اثرات وابسته به دوز ممکن است به‌وسیله‌ی مواد مؤثره مختلف این گیاه میانجی‌گری شود. بنابراین با توجه به رواج بالای استفاده از ترکیبات زیتون در زندگی روزمره، به‌نظر می‌آید که استفاده از عصاره برگ درخت زیتون بتواند جایگاه مؤثری در بهبود درد و سایر علائم التهابی بالینی داشته باشد که نیاز به

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2023-03-28]

بررسی‌های بیشتری دارد.

References:

1.Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 564-82.
2.Magaji MG, Anuka JA, Abdu-Aguye I, et al. Preliminary studies on anti-inflammatory and analgesic activities of Securinega virosa (Euphorbiaceae) in experimental animal models. JMPR 2008; 2: 39- 44.
3.Huang ZR, Lin YK, Fang JY. Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: Potential Uses in Cosmetic Dermatology. Molecules 2009; 14: 540-54.
4.Zargari A, editor. Medicinal plants. 6th ed. Tehran: Tehran University publication; 2009: p. 319-26.
5.Bianchi G, Pozzi N. 3, 4-Dihydroxyphenylgl - ycol, a major C6-C2 Phenolic in Olea europaea fruits. Phytochemistry 1994; 35: 1335-7.
6.Andreadou I, Iliodromitis EK, Mikros E, et al. The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. J Nutr 2006;136: 2213-9.
7.Poudyal H, Campbell F, Brown L.Olive Leaf Extract Attenuates Cardiac, Hepatic, and Metabolic Changes in High Carbohydrate–, High Fat–Fed Rats. J. Nutr 2010; 140: 946-53.
8.Esmaeili-Mahani S, Rezaeezadeh-Roukerd M, Esmaeilpour K, et al. Olive (Olea europaea L.) leaf extract elicits antinociceptive activity, potentiates morphine analgesia and suppresses morphine hyperalgesia in rats . J Ethenopharmacol 2010; 132: 200-5.
9.Lee OH, Lee BY. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in Olea europaea leaf extract. Bioresour Technnol 2010; 101: 3751-9.
10.Clinical assay of Olea europaea aqueous extract in hypertension. Arteria Treatment 1996; 5: 51-9.
11.Amiot MJ, Fleuriet A, Macheix JJ. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. J Agric Food Chem 1986; 34: 823-6.
12.Almeidal RN, Navarro DS, Barbosa-filho JM. Plants with central analgesic activity . Phytomedicine 2001; 8: 310-22.
13.Middleton E Jr. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. Adv Exp Med Biol 1998; 439: 175-82.
14.Binkoski AE, Kris-Etherton PM, Wilson TA, et al. Balance of unsaturated fatty acids is important to a cholesterol-lowering diet: comparison of mid-oleic sunflower oil and olive oil on cardiovascular disease risk factors. J Am Diet Assoc 2005; 105: 1080-6.
15.Colomer R, Menendez JA. Mediterranean diet, olive oil and cancer. Clin Transl Oncol 2006; 8: 15-21.
16.khan S, Nisar M, Rehman W, et al. Anti inflammatory study on crude methanol extract and different fractions of Eremostachys laciniata. Pharm Biol 2010; 48: 1115-8.
17.Dubuisson D, Dennis SG. The fomalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rat and cats. Pain 1997; 4: 161-74.
18.Collier HO, Dinneen LC, Johnson CA, et al. The abdominal constriction response and its suppression by Analgesic drugs in the mouse. Br J Pharmacol Chemother 1968; 32: 295-310.
19.Cao BJ, Meng QY, Ji N. Analgesic and anti-inflammatory effects of Ranunculus japonicus extract. Planta Med 1992; 58: 496-8.
20.De Souza ET, de Lira DP, de Queiroz AC, et al. The antinociceptive and anti-Inflammatory activities of caulerpin, a bisindole alkaloid isolated from seaweeds of the genus caulerpa. Mar Drugs 2009; 7: 689-704.
21.Tuck KL, IIayball PJ. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. J Nutr Biochem 2002; 13: 636-44.
22.Rajnarayana K, Reddy MS, Chaluvadi MR, et al. Bioflavanoids Classification, Pharmacological, Biochemical effects and Therapeutic potential. Indian J Pharmacol 2001; 33: 2-16.
23.Middleton E Jr. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. Adv

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2023-03-28]

Exp Med Biol 1998; 439: 175-82.
24.De Araujo PF, Coelho-de-Souza AN, Morais SM, et al. Antinociceptive effects of the essential oil of Alpinia zerumbet on mice. Phytomedicine 2005; 12: 482-686.
25.Reanmongkol W, Subhadhirasakul S, Thienmontree S, et al. Antinociceptive activity of the alkaloid extract from Kopsia macrophylla leaves in mice. Songklanakarin J Sci Technolol 2005; 27: 509-16.
26.Rezazadeh SH, Zaringhalam J, Manaheji H, Kebryaeezadeh A. Anti-inflammatory and anti–hyperalgesic activities of Stachys athorecalyx extracts on CFA-induced inflammation. J Med Plants Res 2009; 3: 368-76.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2023-03-28]

Original Article

Investigation on the anti- inflammatory and analgesic effects of Olea europaea L. metanolic extract on male NMRI mouse

E. Tekieh [1], S. Moghadam kia [2], A. Eidi [2], R. Taghizad farid [3], R. Ferdosi [4], J. Zaringhalam [1]*

[1] *Department of Physiology, Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, IRAN*
[2] *Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, IRAN*
[3] *Department of Pharmacognosy, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Tehran, IRAN*
[4] *Research Institute of Nutrition, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, IRAN*

(Received 4 Nov, 2010 Accepted 2 Mar, 2011)

Abstract

Background: Different mediators are involved in pain and edema induction during different stages of inflammation. Then, treatment of them encounters some difficulties. Medicinal plants are an important source of substances which are claimed to induce anti-inflammatory effects. This study was aimed to investigate anti-inflammatory and analgesic effects of Olea europaea L.methanolic extract on male NMRI mouse.

Methods: Methanolic extraction was done for leaf of Olea europaea L. and different doses (200, 300 and 400 mg/kg) were intraperitoneally (i.p.) adminstered to male NMRI mice. Analgesic and anti-inflammatory effects of extract was measured during both phases of Formalin test, Acetic acid induced visceral pain and xylene inflammation tests. A standard analgesic and anti-inflammatory drug such as indomethacin, dexamethasone and morphine were administered in positive control groups where appropriates.

Results: Results indicated significant dose-dependent analgesic and anti-inflammatory effects of methanolic extract of Olea europaea L. leaf on pain which induced by formalin (both phase) and acetic acid, and inflammation caused by xylene.

Conclusion: Our findings Showed that administration of methanolic extract of Olea europaea L.leaf can suppress pain and inflammation dose dependently which, may mediate via different components of extract. However, more investigations need to be done.

Keywords: Olea europaea L., pain, inflammation, free radicals

**Address for correspondence*: Department of Physiology, Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, IRAN; E-mail: jzaringhalam@yahoo.com

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2023-03-28]