دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و دوم، شماره ۱، صفحه ۲۸ - ۱۶ (فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۸)

Iran South Med J 2019; 22(1): 16-28

بررسی اثر عصاره الکلی گیاه خرفه بر تعدیل درد نوروپاتی و درد حاد در موش صحرائی

مهدی صادقی (PhD)[1*]، افسانه واحدی مقدم (MD)[2]، علی موحد (PhD)[3]

[1] گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران
[2] دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران
[3] گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

(دریافت مقاله: ۹۷/۲/۱ - پذیرش مقاله: ۹۷/۸/۲۱)

چکیده

زمینه: گیاه خرفه گیاه دارویی شناخته شده‌ای است که اثرات متعددی از قبیل اثرات ضد دردی و ضد التهابی به آن نسبت داده شده است. هدف از این پژوهش بررسی اثرات ضددردی عصاره الکلی خرفه بر درد نوروپاتی مدل CCI (Bennet & Xie model ۱۹۸۸) و درد حاد حرارتی حاصل از Tail Flick می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این آزمایش از موش‌های صحرایی نر بالغ، نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. حساسیت به تحریکات مکانیکی (آلودینیای مکانیکی) و تحریکات دردناک حرارتی، به ترتیب توسط تارهای فون فری و تست Tail Flick اندازه‌گیری شد. در مطالعات مربوط به حیوانات نوروپاتیک، حیوانات به ۵ گروه شامل: گروه شم، CCI، دو گروه CCI که عصاره را با دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند و یک گروه نوروپاتی که نرمال سالین دریافت نمودند، تقسیم شدند. در این گروه‌ها آلودینیای مکانیکی در روز هفتم بعد از جراحی انجام شد. در مطالعات مربوط به بررسی درد حاد، حیوانات به سه گروه شامل: یک گروه دریافت کننده نرمال سالین و دو گروه دریافت کننده عصاره با دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، تقسیم شدند. در این گروه‌ها تست Tail Flick ۳۰ تا ۶۰ دقیقه بعد از تزریق عصاره یا نرمال سالین انجام شد. نتایج با نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۵ و آزمون‌های آماری مناسب مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: بستن عصب سیاتیک موجب ایجاد آلودینیای مکانیکی در موش‌های صحرایی شد و تزریق عصاره با دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم توانست در موش‌های CCI شده آلودینیای مکانیکی را بعد از نوروپاتی کاهش دهد. همچنین عصاره خرفه با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم توانست درد حاد حرارتی را نیز کاهش دهد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که عصاره خرفه می‌تواند علائم رفتاری درد نوروپاتی و درد حاد را کاهش دهد.

واژگان کلیدی: گیاه خرفه، درد حاد، درد نوروپاتیک، chronic constriction injury (CCI)

* بوشهر، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

Email: m.sadeghi@bpums.ac.ir
*ORCID: 0000-0003-4313-7886

مقدمه

درد در اثر عوامل مختلفی مانند ضربه، آسیب بافتی، نکروز، تورم، جریان الکتریکی، اسپاسم عضلانی و همچنین در اثر بیماری‌های مختلف ایجاد می‌شود. در واقع در بعضی از بیماری‌ها تنها عامل تشخیص بیماری بوده و در اغلب مواقع اثر دفاعی و محافظتی دارد (۱ و ۲). با وجود اینکه سابقه تشخیص و درمان آن به چندین هزار سال پیش می‌رسد، هنوز هم یکی از مشکلات درمانی در انسان بوده که برای فائق آمدن بر آن تلاش بسیار انجام شده و به روش‌های گوناگون به مبارزه با آن پرداخته شده است (۳). از انواع درد می‌توان به درد نوروپاتیک اشاره کرد که نوعی درد مزمن بوده و به صورت دردهای سوزشی خود به خودی در محل آسیب، هایپرآلژزیا (افزایش پاسخ به محرکی که در حالت طبیعی دردناک است) و آلودینیا (پاسخ به محرکی که در حالت طبیعی ایجاد درد نمی‌کند) همراه می‌باشد (۴). از عوامل ایجاد کننده آن می‌توان به صدمات طناب نخاعی و اعصاب محیطی، عفونت‌ها و التهاب‌های عصبی، فشار ناشی از رشد نئوپلاسم‌ها به عصب مانند سندرم تونل کارپال، اختلالات متابولیکی مانند نوروپاتی دیابتی یا اورمی، ایسکمی بدنبال انفارکتوس یا سکته مغزی، عوامل ویروسی و اختلال عملکرد نوروترانسمیترها اشاره کرد (۵). این نوع درد یکی از دردهای کلینیکی شایع بوده که باعث کاهش کیفیت زندگی و صرف هزینه مراقبتی زیاد شده و در حال حاضر حدود یک ششم جمعیت جهان از آن رنج می‌برد (۶). درد نوروپاتی دارای مجموعه‌ای از علائم و نشانه‌های نوروژنیک است که احتمالاً در آن مکانیسم‌های نورونی متفاوتی نسبت به درد حاد مطرح می‌باشد (۷). به دلیل مشخص نبودن مکانیسم و عوامل مربوط به این نوع درد، هنوز درمان مناسب و قطعی برای آن ارائه نشده است. به همین علت درمان‌های فارماکولوژیک رایج مثل ضد افسردگی‌های سه حلقه‌ای، اپیوئیدها، داروهای ضد درد غیر استروئیدی، ضد تشنج‌ها، مسدود کننده‌های کانال سدیم، گاباپنتین و بلاکرهای کانال‌های NMDA که بیشترین موارد استفاده را در تسکین و درمان درد دارند، در درمان آن کارائی کمی داشته و هیچ یک نتوانسته‌اند به طور مؤثر باعث بهبود درد نوروپاتی شوند. گذشته از این امر، استفاده از هر یک از این داروها به دلیل اثرات جانبی متعدد محدودیت‌هایی را ایجاد می‌نماید (۸). لذا، با توجه به تعدد بیماران مبتلا به دردهای نوروپاتیک و اثرات آن بر جنبه‌های مختلف کیفیت زندگی در بیماران مبتلا، پیدا کردن راه درمانی مناسب و پیدایش داروها و درمان‌های جدید جهت کمک به این افراد و بالا بردن سطح کیفیت زندگی آن‌ها، این موضوع مورد توجه جوامع پزشکی بوده و توجه به آن لازم و ضروری به نظر می‌رسد.

در رابطه با درمان و کاهش درد می‌توان گفت یکی از راهکارهای ممکن جهت دستیابی به داروهای ضد درد جدید با کاربری بالا و دارای آثار محدود کننده کمتر، توجه به گیاهان دارویی و مواد طبیعی بوده است. استفاده از گیاهان دارویی با اثرات درمانی مناسب که عوارض جانبی کمتری داشته باشند و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه باشند، می‌تواند جایگزین مناسبی برای داروهای صناعی باشد که عوارض جانبی بالایی دارند و گاه می‌توانند هزینه‌های سنگینی را به بیمار تحمیل می‌کنند (۲ و ۹). در بین گیاهان دارویی، گیاه خرفه (Portulaca Oleracea) به دلیل وسعت گسترده جغرافیایی، سهولت در دسترس بودن و این که یک گیاه خوراکی است و فرهنگ عمومی مردم در اغلب کشورها مصرف آن را پذیرفته است و نیز از آنجائی‌که ترکیبات آلی و معدنی فراوانی در بخش‌های مختلف آن وجود دارد، دارای جایگاه ویژه‌ای است. در منابع مختلف،

اثرات متعدد فارماکولوژیکی شامل شل‌کنندگی عضلات اسکلتی و صاف، اثرات ضد تشنج، ضد درد، ترمیم ضایعات مخاطی، ضد اسهال، ترمیم زخم، ضد دیابت، اثر محافظتی در مقابل سمیت کلیوی، ضد اکسیداسیون، ترمیم DNA، ضد سرطان، اتساع دهنده برونش‌ها، ضدمیکروبی، ضد هایپر لیپیدمی و ضد التهاب، برای آن بیان شده است (۱۰ و ۱۱).

هر چند گزارشاتی فراوان در مورد اثرات داروئی خرفه در طب سنتی وجود دارد ولی از آنجائی که در رابطه با اثر ضد دردی این گیاه بویژه در مدل‌های آزمایشگاهی گزارشات محدودی موجود می‌باشد و از این بابت که برای تأئید و تصدیق ادعای طب سنتی مبنی بر کاربرد ضد دردی خرفه نیاز به ارائه مستندات و دلایل بیشتر و معتبرتری می‌باشد و نیز با عنایت به اهمیت کاهش درد به عنوان یکی از دغدغه‌های بشر و همچنین با توجه به اینکه طبق اطلاع ارائه دهندگان این پژوهش تاکنون راجع به کاربرد عصاره گیاه خرفه در بهبود علائم درد نوروپاتی مطالعه‌ای انجام نشده است، هدف ما در این پژوهش، بررسی اثرات ضددردی عصاره الکلی بخش‌های هوائی گیاه خرفه که مصرف خوراکی دارند، در تعدیل درد حاد با استفاده از مدل Tail flick (پس کشیدن دم) و همچنین تعدیل درد نوروپاتی با استفاده از مدل بستن مزمن عصب سیاتیک یا CCI (Chronic Constriction Injury) می‌باشد. نتایج این تحقیق به ویژه از نظر بررسی اثر خرفه در تنظیم و تعدیل درد نوروپاتی، در نوع خود، یافته‌هایی نوین خواهند بود.

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این مطالعه تجربی از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات همگی در شرایط یکسان رطوبت و حرارت و در یک سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دسترسی راحت به آب و غذای استاندارد و کافی و در قفس‌های جداگانه در گروه‌های ۲ تایی و ۳ تایی نگهداری شدند. کلیه آزمایشات بین ساعت ۸ تا ۱۴ انجام شد و در تمامی موارد اعم از جراحی یا بررسی تست‌های رفتاری، روش‌های استاندارد مربوط به قوانین اخلاقی رعایت گردید. در هر گروه آزمایشی تعداد ۸ سر موش در نظر گرفته شد و تمامی تلاش ما بر این بود که کشتن، اعمال درد، استرس و اذیت کردن حیوانات به حداقل رسیده و از کمترین تعداد حیوانات برای تغییرات معنی‌دار آماری استفاده شود.

ایجاد مدل نوروپاتی

در این پژوهش از مدل نوروپاتی CCI بر اساس مدل Bennett و Xie (۱۹۸۸) استفاده شد (۱۲). به طور خلاصه ابتدا موش‌ها با تزریق داخل صفاقی پنتوباربیتال سدیم (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شده و پس از اطمینان از بیهوشی کامل، موهای بالا و پشت ران پای سمت راست حیوان را کاملاً تراشیده و موضع برش با الکل ضدعفونی می‌شد. سپس با استفاده از تیغ بیستوری شکافی به طول ۲ سانتی‌متر بر روی ران ایجاد کرده و پس از آن به موازات خار ایلیاک شکافی بر روی عضله دو سر ران ایجاد می‌گردید. بعد از کنار زدن عضله، دسترسی به عصب سیاتیک فراهم شده و پس از رؤیت قسمت مشترک عصب، عصب سیاتیک با دقت از بافت‌های همبند اطراف خود جدا شده و قبل از محل سه شاخه شدن، به‌وسیله نخ کرومیک ۴-۰، چهار گره شل به فواصل تقریبی ۱ میلی‌متر روی عصب زده می‌شد. فشار گره‌ها به قدری اعمال می‌شد که اختلالی در جریان خون عصب به‌وجود نیاید. آنگاه عصب

سیاتیک در محل خود قرار گرفته و با استفاده از نخ ۴-۰ سیلک، عضلات و پوست بطور جداگانه دوخته می‌شدند. در پایان، محل جراحی توسط سالین استریل شسته و ضدعفونی می‌شد و حیوانات پس از به هوش آمدن به حیوان خانه منتقل می‌شدند.

روش تهیه عصاره‌ها

برای تهیه عصاره گیاه، ابتدا قسمت‌های هوایی گیاه جمع‌آوری و تمیز شد و سپس خشک شده و بعد از آن پودر گردید. سپس پودر به‌دست آمده را در داخل کیسه صافی قرار داده و در دستگاه سوکسله، عمل عصاره‌گیری با محلول ۷۰ درصد اتانل انجام گردید. از محلول به‌دست آمده توسط دستگاه در خلاء، حذف حلال شده و حذف کامل حلال تا مرحله خشک شدن عصاره توسط بن ماری صورت گرفت و از عصاره خشک به‌دست آمده برای تهیه عصاره‌های با غلظت مورد نظر استفاده گردید.

مطالعه رفتاری درد و بررسی اثر ضد دردی عصاره‌ها

برای مطالعه رفتاری درد و بررسی اثر ضد دردی عصاره‌ها، آزمایشات مربوطه در دو قسمت، یکی مطالعه مربوط به بررسی اثر عصاره گیاه خرفه بر درد نوروپاتی با استفاده از ایجاد درد نوروپاتی از طریق مدل بستن مزمن عصب سیاتیک (CCI) که در آن آلودینیای مکانیکی با استفاده از تارهای فون فری (Stoelting، آمریکا) بررسی می‌گردید و دیگری مطالعه مربوط به بررسی اثر عصاره بر درد حاد با استفاده از ایجاد درد حاد حرارتی توسط دستگاه Tail flick (Hugo Sachs Elektronik، آلمان) انجام شد. حیوانات حداقل سه روز قبل از انجام آزمایشات به آزمایشگاه منتقل می‌شدند و هر روز حداقل به مدت نیم ساعت داخل دستگاه‌های مربوطه قرار می گرفتند تا هم با محیط آزمایشگاه و هم دستگاه‌های مورد نظر سازش یابند.

تست رفتاری فون فری برای سنجش آلودینیای مکانیکی و بررسی درد نوروپاتی

در این تست، حساسیت مکانیکی به محرک‌های غیردردناک، با اعمال تارهای فون‌فری ۲، ۸، ۱۵، ۲۶ و ۶۰ گرمی به کف پای آسیب دیده حیوان اندازه‌گیری شد و برای این کار حیوانات روی یک صفحه مشبک فلزی و در داخل یک محفظه پلاکسی گلاس به ابعاد ۳۰ در ۳۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۴۰ سانتی‌متر قرار می‌گرفتند. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه که حیوان با محیط جدید عادت نموده و فعالیت grooming و کاوش محیط جدید متوقف می‌شد، هر تار سه بار متوالی به فاصله ۵ ثانیه و هر بار به مدت زمان حدود یک ثانیه به کف پای آسیب دیده اعمال می‌شد. اگر حیوان دو بار از سه بار اعمال تار پاسخ می‌داد (پای خود را از محرک عقب می‌کشید)، آن تار به عنوان آستانه پاسخ در نظر گرفته می‌شد و در غیر این صورت بعد از پنج دقیقه تاری با نیروی بالاتر اعمال می‌گردید. کمترین شدت محرک بر حسب گرم که می‌توانست ۲ پاسخ از مجموع ۳ بار اعمال تحریک ایجاد نماید، به عنوان پاسخ و به عنوان معیار سنجش آلودینیای مکانیکی در نظر گرفته می‌شد. تار فون‌فری ۶۰ گرم به عنوان Cut off در نظر گرفته شد و در صورتی که حیوان به این تار پاسخ نمی‌داد، عدد ۶۰ به عنوان آستانه پاسخ در نظر گرفته می‌شد.

تست رفتاری Tail Flick برای بررسی درد حاد با استفاده از ایجاد درد حاد حرارتی

در این تست، نوری با شدت ثابت توسط منبع تولید نور حرارتی دستگاه به یک سوم انتهائی دم حیوان تابیده می‌شد و همزمان تایمر دستگاه شروع به ثبت زمان می‌نمود. هنگامی که حیوان دم خود را از منبع نور حرارتی کنار می‌کشید، منبع نور خاموش شده و تایمر

دستگاه به صورت اتوماتیک متوقف می‌شد و زمانی را که سپری شده تا حیوان دم خود را از محرک حرارتی دردناک دور کند، نشان می‌داد. مدت زمان تأخیر در پس کشیدن دم، سه بار و با فواصل ۵ دقیقه انجام می‌گردید و میانگین این سه بار زمان ثبت شده، به عنوان معیار پاسخ حیوان و آستانه درد در نظر گرفته می‌شد. به منظور جلوگیری از آسیب بافتی زمان ختم آزمایش و زمان قطع نوردهی (Cut off time) ۲۰ ثانیه در نظر گرفته می‌شد.

گروه‌های آزمایشی مطالعات مربوط به بررسی درد نوروپاتی

در این قسمت حیوانات به پنج گروه تقسیم شدند. گروه اول به عنوان شم بوده که در این گروه پوست و عضله تا عمقی که عصب نمایان شود برش داده شده و بعد از رؤیت عصب سیاتیک و بدون هیچ گونه دستکاری، عضله و پوست با نخ بخیه ۴-۰ سیلک دوخته شد. گروه دوم، سوم، چهارم و پنجم برای نوروپاتی CCI تحت جراحی قرار گرفتند. گروه دوم به عنوان گروه نوروپاتی بوده و گروه سوم و چهارم علاوه بر نوروپاتی، به منظور بررسی تغییرات در پاسخ دهی به عصاره گیاه خرفه طی روند نوروپاتی، به‌ترتیب مقدار ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره الکلی گیاه را به صورت داخل صفاقی دریافت داشتند. گروه پنجم نیز گروه حامل بود که این گروه نرمال سالین را به عنوان حلال عصاره گیاه و به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. لازم به ذکر است که قبل از شروع مطالعه و در آزمایشات پایلوت، برای بررسی اینکه حیوان چه زمانی بعد از نوروپاتی، اوج درد (حداکثر پاسخ به تارهای فون فری) را نشان می‌دهد، در روز ۱، ۴، ۷ و ۱۴ بعد از نوروپاتی، آلودینیای مکانیکی با تارهای فون فری سنجیده شد و مشخص گردید که حیوان حداکثر پاسخ را به این تارها در روز هفتم بعد از جراحی نشان می‌دهد. به همین دلیل در این گروه‌ها تست رفتاری فون فری روز هفتم بعد از جراحی که اوج درد نوروپاتی در این مدل می‌باشد و در آزمایشات پایلوت ما هم تأیید شده بود، انجام شد. در ضمن تمامی اندازه‌گیری‌ها در فواصل ۳۰ تا ۶۰ دقیقه بعد از تزریق عصاره و یا نرمال سالین انجام گردید.

گروه‌های آزمایشی مطالعات مربوط به درد حاد حرارتی حاصل از Tail Flick

در این قسمت از مطالعه، حیوانات به سه گروه تقسیم شدند. گروه اول به عنوان گروه حامل بوده و نرمال سالین را به عنوان حلال عصاره گیاه و به صورت داخل صفاقی دریافت داشتند. در گروه دوم و سوم به منظور بررسی تغییرات در پاسخ‌دهی به عصاره الکلی گیاه خرفه بر درد حاد حرارتی حاصل از دستگاه Tail flick، به‌ترتیب دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره گیاه به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. در این گروه‌ها، پاسخ حیوان در فواصل ۳۰ تا ۶۰ دقیقه بعد از تزریق عصاره و یا نرمال سالین معین و ثبت می‌گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

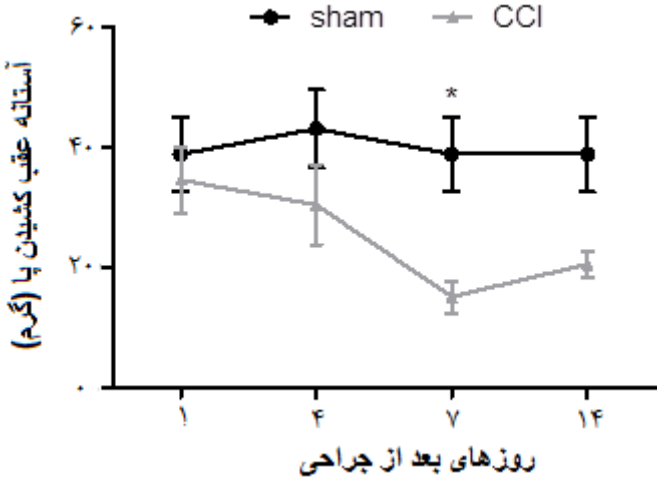
نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۵ مورد بررسی قرار گرفت. برای مقایسه گروه شم و گروه‌های دریافت کننده عصاره و حلال از آزمون One- way ANOVA و تست تعقیبی tukey استفاده شد. همچنین برای مقایسه تغییرات آلودینیای مکانیکی در گروه CCI و گروه شم در روزهای مختلف بعد از جراحی از آزمون Repeated Measures two way ANOVA و آزمون Bonferroni استفاده شد. $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌دار بوده و داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است.

ضمناً نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک مورد تأیید قرار گرفت.

یافته‌ها

مقایسه تغییرات آلودینیای مکانیکی در گروه CCI و گروه شم در روزهای مختلف بعد از نوروپاتی

مقایسه آستانه عقب کشیدن پای آسیب دیده حیوان از محرک مکانیکی Paw Withdrawal (PWT) Threshold، که با تارهای فون فری سنجیده شد و معیار سنجش آلودینیای مکانیکی می‌باشد، نشان داد که گرچه در روزهای هفتم و چهاردهم پس از آسیب عصبی، آستانه عقب کشیدن پای آسیب دیده حیوان از محرک مکانیکی (PWT)، در گروه CCI در مقایسه با گروه شم کاهش زیادی داشته است (نمودار ۱) ولی این کاهش فقط در روز هفتم معنی‌دار بود (P=۰/۰۱۵). از آنجائی که حداکثر کاهش در روز هفتم بعد از نوروپاتی دیده شد، مقایسه اثر عصاره بر آلودینیای مکانیکی در گروه‌های نوروپاتی شده در روز هفتم انجام شد.



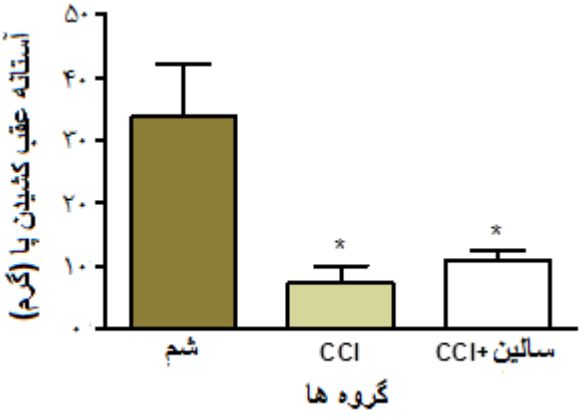
نمودار ۱) مقایسه تغییرات آلودینیای مکانیکی بین گروه CCI و گروه شم در روزهای بعد از جراحی. نتایج آزمون آماری حداکثر کاهش معنی‌داری را در آستانه عقب کشیدن پای آسیب دیده حیوان از محرک مکانیکی (PWT)، که با تارهای فون فری سنجیده شد، در گروه CCI در مقایسه با گروه شم در روز هفتم بعد از نوروپاتی نشان داد. P<۰/۰۵*: تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل

Fig 1) Comparison of mechanical allodynia changes between sham and CCI groups on postoperative days. The results of the statistical test showed the maximum significant decrease in paw withdrawal threshold (PWT) from mechanical stimulus that was measured by Von Frey hairs, in CCI group in comparison to sham group on the seventh day after neuropathy.*p<0.05: significant difference with control group

تغییرات آلودینیای مکانیکی در گروه شم، CCI و حامل

تحریکات دردناک ناشی از اعمال تحریکات مکانیکی که توسط تارهای فون فری اعمال می‌شد، موجب گردید تا حیوان ضمن عقب کشیدن پا، رفتارهای تهاجمی نظیر تکان دادن و گاز گرفتن پای آسیب دیده را نیز از خود نشان دهد. آنالیز واریانس یک‌طرفه نتایج تفاوت معنی‌داری را در آستانه عقب کشیدن پای آسیب دیده حیوان از محرک مکانیکی بین گروه CCI، گروه دریافت کننده سالین و گروه شم در روز هفتم بعد از جراحی نشان داد (P=۰/۰۰۸). همچنین مقایسه گروه‌ها با استفاده از آزمون تعقیبی توکی نشان داد که در روز هفتم پس از آسیب عصبی، آستانه عقب کشیدن پای

آسیب دیده از محرک مکانیکی در گروه CCI (P=۰/۰۱۳) و گروه دریافت کننده سالین (P=۰/۰۳۳)، کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه شم داشته است ولی بین گروه CCI و گروه دریافت کننده سالین تفاوت معنی‌داری دیده نشد (نمودار ۲). به همین جهت در قسمت بعدی مطالعه برای مقایسه اثر عصاره گیاه خرفه بر آلودینیای مکانیکی، گروه‌های دریافت کننده عصاره با گروه نوروپاتی که سالین را به عنوان حلال عصاره‌ها دریافت نموده بودند، انجام شد.

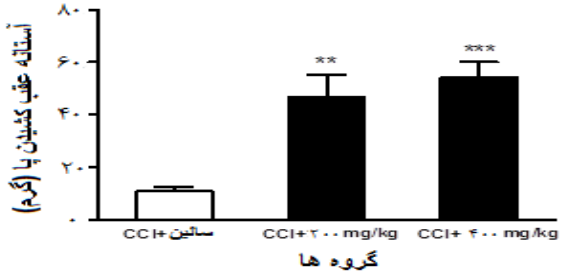


نمودار ۲) تغییرات آلودینیای مکانیکی در گروه شم، CCI و CCI + سالین در روز هفتم بعد از نوروپاتی. نتایج کاهش معنی‌داری را در آستانه عقب کشیدن پای آسیب دیده حیوان در تست فون فری در گروه CCI و گروه دریافت کننده سالین در مقایسه با گروه شم در روز هفتم بعد از جراحی نشان داد ولی بین گروه CCI و گروه سالین هیچ تفاوت معنی‌داری دیده نشد. *P<۰/۰۵: تفاوت معنی‌دار با گروه شم

Fig 2) Changes of mechanical allodynia in sham, CCI, and CCI+Saline groups on the seventh day after neuropathy. The results showed a significant reduction in paw withdrawal threshold in the Von Frey test in CCI group and saline recipient group in comparison to sham group on the seventh day after surgery, but no significant difference was observed between CCI and saline groups. *p<0.05: significant difference with sham group

اثر عصاره خرفه بر آلودینیای مکانیکی در حیوانات نوروپاتی شده

به منظور بررسی اثر عصاره گیاه خرفه بر آلودینیای مکانیکی ایجاد شده در حیوانات نوروپاتیک، در روز هفتم بعد از نوروپاتی، عصاره گیاه خرفه را با دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی تزریق نموده و پس از ۳۰ دقیقه تست رفتاری فون فری انجام شد. نتایج آزمون آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که مقایسه پاسخ گروه‌های دریافت کننده عصاره با گروه دریافت کننده سالین که به عنوان گروه حامل در نظر گرفته شده بود، اختلاف معنی‌داری در آلودینیای مکانیکی دارد (P<۰/۰۰۱). به نحوی که عصاره با دوز ۴۰۰ (P<۰/۰۰۱) و ۲۰۰ (P=۰/۰۰۴) میلی‌گرم بر کیلوگرم توانست آستانه درد مکانیکی را در حیوانات نوروپاتیک افزایش دهد (نمودار ۳). در ضمن بین دو گروه دریافت کننده عصاره تفاوت معنی‌داری از لحاظ اثر بر آستانه درد مکانیکی حاصل از اعمال تارهای فون فری دیده نشد.

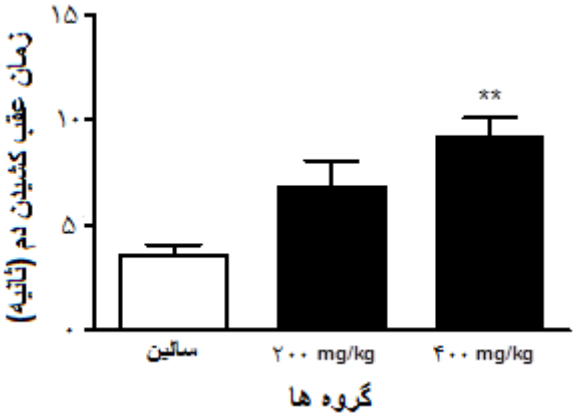


نمودار ۳) مقایسه آلودینیای مکانیکی بین گروه‌های مختلف دریافت کننده عصاره و گروه دریافت کننده سالین در روز هفتم بعد از نوروپاتی. نتایج آماری اثرات ضدآلودینیایی عصاره خرفه با دوز ۴۰۰ (P<۰/۰۰۱) و ۲۰۰ (P<۰/۰۱) میلی‌گرم بر کیلوگرم را در روز هفتم بعد از نوروپاتی نشان داد ولی اثرات ضدآلودینیایی عصاره با دو دوز بیان شده باهم تفاوت معنی‌دار نداشت. (P<۰/۰۱** و P<۰/۰۰۱***. تفاوت معنی‌دار با گروه دریافت کننده سالین). CCI+Saline، CCI+۲۰۰ mg/kg و CCI+۴۰۰ mg/kg نمایانگر گروه‌های نوروپاتی بوده که به‌ترتیب سالین و عصاره خرفه را با دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت نمودند.

Fig 3) Comparison of mechanical allodynia between different groups receiving the extract and saline recipient group on the seventh day after neuropathy. The statistical results showed antiallodynic effects of the Portulaca Oleracea extract with doses of 200 (p<0.01) and 400 (p<0.001) mg/kg on the seventh day after neuropathy, but antiallodynic effects of the extract did not differ significantly with these two doses. **p<0.01, ***p<0.001: significant difference with saline recipient group. CCI+Saline, CCI+200 mg/kg and CCI+400 mg/kg represent the neuropathy groups that received saline and Portulaca Oleracea extract with doses of 200 mg/kg and 400 mg/kg, respectively.

اثر عصاره گیاه خرفه بر درد حاد حرارتی حاصل از Tail Flick

به منظور بررسی اثر گیاه خرفه بر درد حاد حرارتی حاصل از Tail Flick، عصاره گیاه به روش داخل صفاقی تزریق شد. آنالیز نتایج، تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌های مورد مطالعه نشان داد (P=۰/۰۰۳). مقایسه گروه‌ها نشان داد که مدت زمان تأخیر در عقب کشیدن دم حیوان از محرک حرارتی، در گروهی که عصاره را با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت می‌داشتند در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین تفاوت معنی‌دار داشت (P=۰/۰۰۲). بدین صورت که این دوز از عصاره توانست مدت زمان تأخیر در عقب کشیدن دم از منبع نور حرارتی را نسبت به گروه دریافت کننده سالین افزایش معنی‌دار دهد ولی دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره گرچه توانست کمی مدت زمان عقب کشیدن دم را از نور حرارتی افزایش دهد ولی این تأثیر معنی‌دار نبود (نمودار ۴).



نمودار ۴) تغییرات مدت زمان عقب کشیدن دم حیوان از محرک حرارتی حاد حاصل از Tail Flick بین گروه‌های دریافت کننده نرمال سالین، عصاره خرفه با دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم. نتایج افزایش معنی‌داری را در مدت زمان عقب کشیدن دم حیوان از محرک حرارتی در گروه دریافت کننده عصاره با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین نشان داد. گروه دریافت کننده عصاره با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گرچه کمی مدت زمان عقب کشیدن دم را افزایش داد ولی این افزایش معنی‌دار نبود. **P<۰/۰۱تفاوت معنی‌دار با گروه حامل. mg/kg ۲۰۰ و mg/kg ۴۰۰ نمایانگر گروه‌های دریافت کننده عصاره با این دو دوز می‌باشند.

Fig 4) Changes in the tail withdrawal time from acute thermal stimulus resulting from Tail flick between groups receiving saline and Portulaca Oleracea extract with doses of 200 mg/kg and 400 mg/kg. The results showed a significant increase in the tail withdrawal time from thermal stimulus in the extract recipient group at a dose of 400 mg/kg compared with the saline recipient group. The extract recipient group at a dose of 200 mg/kg, although slightly increased tail withdrawal time, but this increase was not significant. **p<0.01: significant difference with vehicle group. 200 mg/kg and 400 mg/kg indicate the groups receiving the extract with these two doses.

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که گرچه تزریق هر دو دوز عصاره توانست آلودینیای مکانیکی را در حیوانات نوروپاتیک کاهش دهد ولی دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تأثیر بیشتری بر کاهش آلودینیای مکانیکی داشت. همچنین بررسی اثر عصاره بر درد حاد نشان داد که در گروهی که عصاره را با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت نمودند، افزایش معنی‌داری در مدت زمان تأخیر در عقب کشیدن دم حیوان از درد حاد حرارتی حاصل از Tail flick در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین دیده شد ولی دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تأثیری بر آستانه درد حاد نداشت. بدین‌ترتیب می‌توان گفت که تزریق عصاره خرفه در کاهش علائم رفتاری حاصل از درد نوروپاتی و درد حاد مؤثر بوده است ولی اثر ضد آلودینیایی و همچنین اثر آن بر آستانه درد حاد حرارتی وابسته به دوز نبوده است. مطالعات اندکی در مورد اثرات ضددردی و ضد التهابی خرفه توسط سایر محققین در مدل‌های مختلف ایجاد درد و التهاب، گزارش شده است. در این راستا، اثر ضد التهابی عصاره خرفه در کاهش التهاب پنجه پا در رت توسط چان (Chan) و همکاران، نشان داده شده است. این محققین گزارش نمودند که عصاره می‌تواند التهاب ناشی از تزریق ماده التهاب‌زای کاراگنن در پنجه پا را در حد اثرات ضد التهابی دیکلوفناک سدیم، کاهش دهد. همچنین آن‌ها در قسمتی دیگر از مطالعه خود مشاهده نمودند که عصاره الکلی گیاه می‌تواند درد ایجاد شده را در مدل ایجاد درد حاد توسط آزمون صفحه داغ (Hot plate)، کاهش داده و این اثر قابل مقایسه با اثر دیکلوفناک سدیم می‌باشد (۱۳). رائو (Rao) و همکاران، با مطالعه بر روی موش سوری نشان دادند که

مصرف خوراکی عصاره اتری خرفه می‌تواند تعداد انقباضات شکمی را در نوعی مدل ایجاد درد احشائی به نام تست رایتینگ (Writhing test) کاهش داده و بی‌دردی احشائی ایجاد نماید. این پژوهشگران همچنین با استفاده از مدل‌های دیگر بررسی و سنجش حس درد همانند تست فرمالین (Formalin test) و تست غوطه‌ور سازی دم حیوان در آب داغ (Tail immersion)، کاهش درد را بدنبال مصرف خوراکی عصاره گزارش نمودند (۹). گزارشات مشابه دیگری در مورد اثرات ضددردی عصاره حاصل از قسمت‌های هوایی و تخم خرفه نیز وجو دارد (۱۰ و ۱۴). نتایج مطالعات فوق همسو با نتایج پژوهش ما بوده و تأییدی است برنتایج پژوهش حاضر که در آن تزریق داخل صفاقی عصاره خرفه توانست درد حاد و درد حاصل از نوروپاتی را کاهش دهد.

با بررسی‌های صورت گرفته دریافته‌اند که ایجاد درد در تست عقب کشیدن دم و صفحه داغ در نخاع سازمان یافته و نیز توسط مراکز فوق نخاعی جمع‌بندی می‌گردد (۱۵). از آنجایی که انتقال حس درد از طریق نورون‌های حسی درد به نخاع و مراکز فوق نخاعی صورت می‌گیرد، می‌توان گفت که تعدیل در این نوع دردها می‌تواند ناشی از عواملی باشد که بر این مراکز اعمال اثر نمایند. بر این اساس به‌نظر می‌رسد که اثر ضددردی عصاره خرفه احتمالاً با تأثیر بر سیستم اعصاب مرکزی و نیز سیستم عصبی محیطی (هم در سطح نخاع و هم فوق نخاعی) اعمال می‌شود (۱۰).

بعضی محققان نشان داده‌اند که اثر ضددردی خرفه با نالوکسان از بین رفته و یا تعدیل می‌گردد که نشان دهنده اثر مرکزی خرفه بوده و این اثر ممکن است از طریق تحریک گیرنده‌های اوپیوئیدی و مسیرهای اوپیوئیدی انجام شود (۱۰). گزارشاتی نیز وجود دارد که نشان می‌دهد بخشی از اثرات ضددردی خرفه می‌تواند از طریق گیرنده‌های $\alpha 2$- آدرنورسپتور اعمال شود که در شاخ خلفی نخاع وجود داشته و در اثر تحریک، می‌توانند موجب مهار رهایش واسطه‌های شیمیائی دردزا از فیبرهای آوران درد شوند (۹). از طرفی، خرفه گیاهی است که مقادیر قابل توجهی فلاونوئید دارد و بر این اساس، بخشی از اثرات ضددردی و ضد التهابی عصاره آن را می‌توان به فلاونوئیدهای موجود در این گیاه نسبت داد که با مهار آنزیم سیکلواکسیژناز و کاهش تولید پروستاگلاندین‌ها می‌تواند در کنترل مرکزی درد نقش داشته باشد (۱۶ و ۱۷). علاوه بر آن دیگر تحقیقات نیز نشان داده‌اند که ترکیبات استروئیدی می‌توانند از طریق گیرنده‌های μ اپیوئیدی اثرات ضددردی خود را اعمال نمایند (۱۸) و با توجه به وجود ترکیبات استروئیدی فراوان در عصاره خرفه (۱۹)، می‌توان بخشی از اثرات ضددردی خرفه را به این ترکیبات نسبت داد.

در اکثر مطالعات انجام شده به اثرات مهاری نوروترانسمیتر گابا در CNS و اثرات ضددردی عوامل گاباارژیک اشاره شده است (۲۰ و ۲۱). گابا با تحریک گیرنده‌های گابا A سبب باز شدن کانال کلر شده و سلول را هیپرپلاریزه و مهار می‌نماید و در نتیجه در انتقال اطلاعات دردناک بین آوران‌های اولیه و نورون‌های نخاعی- تالاموسی اثر تعدیل کنندگی اعمال می‌نماید (۲۲). با توجه به اینکه گابا مهم‌ترین نوروترانسمیتر مهاری در سیستم عصبی می‌باشد و نظر به ارتباط گسترده نورون‌های گاباارژیک در نخاع و نیز از آنجایی که تحقیقات متعددی نشان دهنده کاهش اثر مهاری گابا بر مسیرهای انتقال دهنده حس درد در شاخ خلفی نخاع در هنگام ایجاد درد می‌باشند (۲۳)، احتمال دارد که بخشی از اثرات ضددردی عصاره خرفه، مربوط

به تداخل بر روی گیرنده‌های گابا باشد. از این رو ایجاد اثر ضد آلودینیایی و ضددردی و همچنین کاهش تحریک‌پذیری نورون‌ها در شاخ خلفی نخاع، توسط عصاره خرفه دور از انتظار نیست.

نتیجه‌گیری

به طور خلاصه نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که عصاره گیاه خرفه دارای اثرات ضددردی بوده و مصرف آن می‌تواند به عنوان یک روش درمانی مؤثر جهت کاهش دردهای نوروپاتیک و آسیب‌های عصبی و همچنین کاهش درد حاد مورد توجه قرار گیرد. به‌نظر می‌رسد مکانیسم‌های احتمالی متفاوتی در مورد اثرات ضد دردی عصاره خرفه برای کاهش علائم رفتاری درد نوروپاتیک و درد حاد می‌توانند مطرح باشند که در این زمینه تحقیقات گسترده‌تر و کامل‌تر مورد نیاز می‌باشد. به همین جهت این پژوهش می‌تواند پایه‌ای برای مطالعات بیشتر و دقیق‌تر جهت بررسی مکانیسم‌های دخیل در مورد اثرات ضددردی این عصاره برای کاهش دردهای مذکور باشد. پیشنهاد می‌شود به منظور بررسی دقیق‌تر و بهتر اثر ضددردی عصاره خرفه، مکانیسم ضددردی عصاره و تداخل آن با سیستم‌های نوروترانسمیتری مؤثر در تعدیل درد بررسی شده و اثر ضددردی گیاه با داروهای رایج ضد درد مقایسه گردد. علاوه بر آن ترکیبات مؤثره موجود در عصاره که در تعدیل درد نقش دارند، استخراج شده و مورد ارزیابی قرار گیرند. شایان ذکر است که موارد ذکر شده پیشنهادی در مطالعات تکمیلی ما بر روی عصاره گیاه مورد توجه قرار می گیرد.

سپاس و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر به خاطر تأمین مالی این پژوهش و همچنین از آقایان دکتر افشار بارگاهی و عادل دانشی که در تهیه عصاره‌ها با این پروژه همکاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Almeida RN, Navarro DS, Barbosa-Filho JM. Plants with Central Analgesic Activity. Phytomedicine 2001; 8(4): 310-22.
2.Bahmani M, Shirzad H, Majlesi M, et al. A Review Study on Analgesic Applications of Iranian Medicinal Plants. Asian Pac J Trop Med 2014; 7(S1): S43-53.
3.Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, et al. Advances in Neuropathic Pain: Diagnosis, Mechanisms, and Treatment Recommendations. Arch Neurol 2003; 60(11): 1524-34.
4.Perry VH, Hume DA, Gordon S. Immunohistochemical Localization of Macrophages and Microglia in the Aadult and Developing Mouse Brain. Neuroscience 1985; 15(2): 313-26.
5.Ristoiu V. Contribution of Macrophages to Peripheral Neuropathic Pain Pathogenesis. Life Sci 2013; 93(23): 870-81.
6.Qu L, Ma C. Animal Models of Pain After Peripheral Nerve Injury. In: Ma C, Zhang J-M, eds. Animal Models of Pain. Vol 49. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, 69-80.
7.Bridges D, Thompson SW, Rice AS. Mechanisms of Neuropathic Pain. Br J Anaesth 2001; 87(1): 12-26.
8.Guindon J, Walczak JS, Beaulieu P. Recent Advances in the Pharmacological Management of Pain. Drugs 2007; 67(15): 2121-33.
9.Rao J, Jayasree T, Mallikarjuna Rao B, et al. Evaluation of the Anti-Nociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Pet: Ether

Extract of Portulaca Oleracea (Linn.). J Clin Diagn Res 2012; 6(2): 226-30.
10.Radhakrishnan R, Zakaria MN, Islam MW, et al. Neuropharmacological Actions of Portulaca Oleraceae L v. sativa (Hawk). J Ethnopharmacol 2001; 76(2): 171-6.
11.Rashed AN, Afifi FU, Disi AM. Simple Evaluation of the Wound Healing Activity of a Crude Extract of Portulaca Oleracea L. (growing in Jordan) in Mus Musculus JVI-1. J Ethnopharmacol 2003; 88(2-3): 131-6.
12.Bennett GJ, Xie Y-K. A Peripheral Mononeuropathy in Rat that Produces Disorders of Pain Sensation like those Seen in Man. Pain 1988; 33(1): 87-107.
13.Chan K, Islam MW, Kamil M, et al. The Analgesic and Anti-Inflammatory Eeffects of Portulaca Oleracea L. subsp. Sativa (Haw.) Celak. J Ethnopharmacol 2000; 73(3): 445-51.
14.Karimi G, Khoei A, Omidi A, et al. Protective effect of aqueous and ethanolic extracts of Portulaca oleracea against cisplatin induced nephrotoxicity. Iran J Basic Med Sci 2010;13(2):31-5.
15.Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal Models of Nociception. Pharmacol Rev 2001; 53(4): 597-652.
16.Zhou YX, Xin HL, Rahman K, et al. Portulaca Oleracea L.: A Review of Phytochemistry and Pharmacological Effects. Biomed Res Int 2015; 2015: 925631.
17.Mirabzadeh M, Rahimi R, Sahraee Z. Evaluation of Adverse Events Reported in Traditional Iranian Medicine Following Administration of Aqueous Extract of Herba Portulacae Oleraceae Seed. J Tradit Chin Med 2013; 33(4): 535-7.
18.Wang X, Traub RJ, Murphy AZ. Persistent Pain Model Reveals Sex Difference in Morphine Potency. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2006; 291(2): R300-6
19.Calixto JB, Beirith A, Ferreira J, et al. Naturally Occurring Antinociceptive Substances from Plants. Phytother Res 2000; 14(6): 401-18.
20.Enna SJ, McCarson KE. The Role of GABA in the Mediation and Perception of Pain. Adv Pharmacol 2006; 54: 1-27.
21.Smith CG, Bowery NG, Whitehead KJ. GABA Transporter Type 1 (GAT-1) Uptake Inhibition Reduces Stimulated Aspartate and Glutamate Release in the Dorsal Spinal Cord in Vivo via Different GABAergic Mechanisms. Neuropharmacology 2007; 53(8): 975-81.
22.Park JH, Han JB, Kim SK, et al. Spinal GABA Receptors Mediate the Suppressive Effect of Electroacupuncture on Ccold Allodynia in Rats. Brain Res 2010; 1322: 24-9.
23.Nickel FT, Seifert F, Lanz S, et al. Mechanisms of Neuropathic Pain. Eur Neuropsychopharmacol 2012; 22(2): 81-91.

Iran South Med J 2019; 22(1): 16-28

Original Article

Effects of Alcoholic Extract of Portulaca Oleracea on Modulation of Neuropathic and Acute Pain in Rats

M. Sadeghi (PhD)[1*], A. Vahedi Moghadam (MD)[2], A. Movahed (PhD)[3]

[1] Department of Physiology, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran
[2] School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran
[3] Department of Biochemistry, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

(Received 21 April, 2018 Accepted 12 Nov, 2018)

Abstract

Background: Portulaca Oleracea is a medicinal plant with many effects including analgesic and anti-inflammatory properties. This study aimed to investigate the effect of alcoholic extract of Portulaca Olerecea on CCI model of neuropathic pain (Bennet & Xie model) and acute thermal pain induced by Tail Flick.

Materials and Methods: Adult male Wistar rats weighing 200-250 g were used. Sensitivity to mechanical stimuli (mechanical allodynia) and noxious thermal stimuli were evaluated by Von Frey filaments and Tail Flick, respectively. In neuropathic pain studies, animals were randomly assigned to five groups of sham, CCI, two groups subjected to CCI and injected with extract (200 and 400 mg/kg, i.p.) and a group subjected to CCI and injected with normal saline. In these groups, mechanical allodynia was assessed on day 7 after surgery. In acute pain studies, animals were divided to three groups of a group that received normal saline and two groups that received extract (200 and 400 mg/kg, i.p.). In these groups, Tail Flick was measured 30 minutes after normal saline or extract administration. Data were analyzed by SPSS and appropriate statistical tests.

Results: All of the rats that had experienced CCI, exhibited mechanical allodynia after neuropathy. Portulaca oleracea could reduce the development of mechanical allodynia after CCI at 200 and 400 mg/kg doses. Thermal acute pain was reduced by 400 mg/kg of the extract.

Conclusion: Our findings indicate that Portulaca Oleracea extract can reduce behavioral symptoms of neuropathic and acute pain.

Keywords: Portulaca oleracea, acute pain, chronic constriction injury (CCI), neuropathic pain

©Iran South Med J.All right sreserved

Cite this article as: Sadeghi M, Vahedi Moghadam A, Movahed A. Effects of Alcoholic Extract of Portulaca Oleracea on Modulation of Neuropathic and Acute Pain in Rats. Iran South Med J 2019;22(1): 16-28

Copyright © 2019 Sadeghi, et al This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

[*] *Address for correspondence:* Department of physiology, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran.
E.mail: m.sadeghi@bpums.ac.ir
*ORCID: 0000-0003-4313-7886

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir