

تاثیر عصاره اتانولی جلبک دریایی قرمز و مسیرهای عصبی دخیل در درد

ناشی از فرمالین در موش سوری

مهسا ایری^۱، امیراقبال خواجه رحیمی^{۲*}، شاهین حسن پور^۳

چکیده

با توجه به عوارض ناشی از مصرف داروهای شیمیایی در کنترل درد، استفاده از داروهای گیاهی رو به افزایش است. جلبک قرمز دارای اثرات آنتی اکسیدان، ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد توموری و ضد میکروبی است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات ضددردی عصاره اتانولی جلبک دریایی قرمز و مسیرهای عصبی دخیل در موش سوری بود. ۱۲۵ موش سوری نر بالغ در ۶ مرحله آزمایشی قرار گرفتند. در آزمایش اول، تزریق داخل صفاقی سرم فیزیولوژی، عصاره جلبک قرمز (۵، ۲/۵، ۱۰ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و مورفین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) انجام شد. در آزمایش دوم، موش‌ها تزریق داخل صفاقی سرم فیزیولوژی، عصاره جلبک قرمز (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، نالوکسان (آنتاگونیست غیرانتخابی اویوئیدی، ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و نالوکسان + عصاره جلبک قرمز را دریافت کردند. آزمایشات ۴ الی ۶ مشابه آزمایش دوم بود، اما تزریق فلومازینل (آنتاگونیست غیرانتخابی گیرنده‌های GABA، ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، سپروهپتادین (آنتاگونیست غیرانتخابی گیرنده‌های سروتونین، ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، کلرفنیرامین (آنتاگونیست گیرنده‌های H₁ هیستامین، ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و سایمتیدین (آنتاگونیست گیرنده‌های H₂ هیستامین، ۱۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بجای نالوکسان انجام شد. پس از ۳۰ دقیقه، تزریق زیر جلدی فرمالدئید در کف پای راست انجام و زمان لیسیدن، جویدن و گاز گرفتن پای تزریق شده اندازه‌گیری شد. با توجه به نتایج مورفین موجب کاهش زمان درد ($P < 0/05$)، عصاره جلبک قرمز بطور وابسته به دوز موجب کاهش زمان درد شد ($P < 0/05$). تزریق نالوکسان + عصاره جلبک قرمز بطور موجب کاهش اثرات ضد دردی عصاره جلبک قرمز شد ($P < 0/05$). فلومازینل + عصاره جلبک قرمز موجب کاهش اثرات ضد دردی عصاره جلبک قرمز شد ($P < 0/05$). تزریق سپروهپتادین + عصاره جلبک قرمز بطور معنی داری موجب تقویت اثرات عصاره جلبک قرمز شد ($P < 0/05$). تزریق کلرفنیرامین + عصاره جلبک قرمز بطور معنی داری موجب کاهش اثرات عصاره جلبک قرمز شد ($P < 0/05$). نتایج نشان دهنده این بود که اثرات ضددردی جلبک قرمز بوسیله مسیرهای اویوئیدرژیک، سروتونینرژیک، گاباژرژیک و هیستامینرژیک میانجی‌گری می‌شود.

واژگان کلیدی: جلبک دریایی قرمز، درد، سروتونینرژیک، گاباژرژیک، هیستامینرژیک، موش سوری.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۹/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۷

مقدمه

درد به عنوان مجموعه‌ای پیچیده از تجارب ناخوشایند حسی، عاطفی و شناختی حاصله از آسیب بافتی و تظاهرات واکنش‌های اتونومیک، سایکولوژیک و رفتاری تعریف شده است (۱). درد، مودالیت‌ه حسی است که در بسیاری موارد، تنها نشانه شناسایی بیماری بوده و غالباً دارای عملکرد محافظتی می‌باشد. درد یک مکانیسم حفاظتی است که در اکثر بافت‌هایی که دچار آسیب بشود دیده می‌شود. درد یک ویژگی ناراحت‌کننده و رایج در بسیاری از اختلالات مانند انواع تومورها، جراحی‌ها، آسیب‌های فیزیکی و تحریکات شیمیایی می‌باشد (۲). درد ناشی از التهاب نیز از جمله عوامل شایع درد است که فرایندهای التهابی وابستگی شدیدی با درد دارند چنانچه مواد شیمیایی آزاد شده در طی فرایند التهاب گیرنده‌های درد را بیشتر تحریک می‌کنند و منجر به درد التهابی شوند (۳). امروزه برای کنترل درد بیشتر از داروهای ضدالتهاب غیر استروئیدی و یا داروهای اویوئیدی استفاده می‌شود، اما این داروها دارای عوارض جانبی نسبتاً زیادی بوده و با وابستگی همراه هستند مصرف کوتاه و دراز مدت اویوئیدها سبب عوارض جانبی مانند کاهش فعالیت دستگاه گوارش و یبوست، تهوع، استفراغ، خارش، احتباس ادرار و ایجاد وابستگی است (۴). این امر سبب شده محققین به دنبال داروهای جدیدتری با عوارض جانبی کمتر، ارزان و در دسترس باشند (۵).

امروزه علاقمندی زیادی در جایگزینی گیاهان دارویی برای کاهش اثرات سو داروهای موجود انجام شده است. گیاهان دارویی منبع مهمی از مواد شیمیایی با اثرات درمانی بسیار قوی می‌باشند (۶). استفاده از گیاهان دارویی به منظور درمان درد و

۱ - دانش آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲ - گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (dr.amireghbal.rahimi@gmail.com)
۳ - استادیار بخش فیزیولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

مواد و روش کار

عصاره گیری

عصاره گیری به روش میکسینگ انجام شد. جلبک قرمز (*Gracilariopsis persica*) از بانک گیاهان دارویی کشور خریداری شد. مقدار ۱۰۰ گرم از جلبک خشک آسیاب شد و در ۲۰۰ سی سی اتانول ریخته شد و در دمای ۴۵ درجه سانتی-گراد نگهداری شد. پس از خنک شدن محلول بدست آمده صاف شد. سپس یا استفاده از دستگاه GC-MS (Agilent، آمریکا) ترکیبات فعال آن مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. باتوجه به نتایج بدست آمده بیشترین ترکیب موجود در عصاره به ترتیب (ان هگزادکانوئیک اسید) (۵۱/۸۷ درصد)، اسکوالین (۲۶/۷۸ درصد) و کولست-پنتا-ان-تریول (۱۴/۳۲ درصد) بود (نمودار ۱).

حیوانات مورد مطالعه

این تحقیق بر روی ۱۲۵ موش سوری نر بالغ با محدوده وزنی ۲۵-۳۰ گرم انجام گرفت. موش‌ها از بخش تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی پژوهشگاه رویان تهیه و در قفس‌های مخصوص نگهداری شدند. تمام روش‌های تجربی مطابق با راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی برای بررسی درد تجربی در حیوانات انجام شد. عصاره جلبک قرمز توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهیه شد و میزان دوز دارو براساس مطالعات پیشین در نظر گرفته شد (۸). برای بررسی اثرات ضددردی عصاره جلبک قرمز، ۶ آزمایش در نظر گرفته شد؛ بطوری که موش‌ها در ۶ آزمایش با ۴ گروه و ۵ موش در هر گروه (۲۰ موش در هر آزمایش)، به استثنای آزمایش اول که ۵ تیمار بود. مرحله آزمایش اول، گروه اول عنوان کنترل در نظر گرفته شد و تزریق داخل صفاقی سرم فیزیولوژیک انجام گرفت. در گروه‌های ۴-۲ تزریق داخل صفاقی سطوح ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره جلبک قرمز انجام شد. گروه پنجم، تزریق داخل صفاقی مورفین

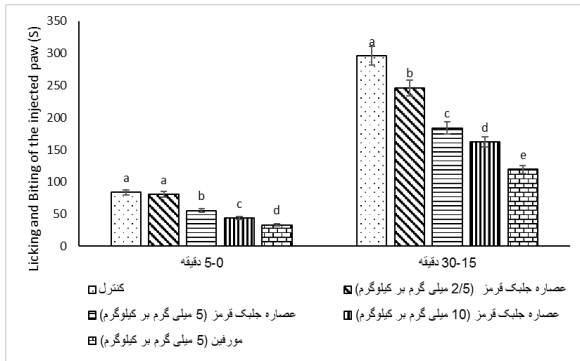
التهاب در طب سنتی ایران نوعی رسم و عادت می‌باشد؛ اما در بیشتر موارد منشا و اساس فعالیت این گیاهان ناشناخته مانده است. جلبک‌های دریایی (سبز، قهوه‌ای و قرمز) به طور گسترده‌ای در پزشکی، صنایع غذایی، شیمیایی و آرایشی و بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۷). تحقیقات نشان داده است که عصاره جلبک قرمز دارای خواص بالقوه آنتی‌اکسیدان، ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد توموری و ضد میکروبی است (۸). همچنین جلبک قرمز حاوی آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ساپونین، استرولها، تری پنوئیدها، قندها، گلیکوزیدها، کوئین، تانن و رنگدانه‌های فتوسنتزی مانند کلروفیل و کاروتنوئیدها می‌باشند. در مقایسه با گیاهان خشکی‌زی و منابع حیوانی جلبک قرمز غنی از امگا ۳ و اسیدهای چرب ضروری، مواد معدنی، اسیدهای آمینه و ویتامین‌های A, B, C است موجب مهار رشد برخی از میکروارگانیسم‌های بیماریزا است (۹). مطالعات نشان داده است که عصاره جلبک قرمز (*Laurencia caspica*) اثرات ضد توموری در سرطان پستان دارد بطوری‌که غلظت ۱۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر موجب مهار رشد ۵۰ درصد از سلول‌ها می‌شود (۱۰). *Asmawati* و همکاران بیان کردند که عصاره متانولی جلبک قهوه‌ای اثرات ضدالتهابی در موش دارد (۱۱). بعلاوه مشخص شده است که عصاره متانولی جلبک قرمز برزیلی (*Amansia multifida*) در سطوح ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اثرات ضد درد و ضد التهابی در موش دارد (۱۱). با توجه به مطالعات پیشین، تحقیقات کمی در خصوص اثرات ضددردی جلبک قرمز (*Gracilariopsis persica*) انجام شده است. لذا هدف اصلی مطالعه حاضر بررسی اثرات ضددردی عصاره اتانولی جلبک دریایی قرمز بود. همچنین هدف ثانویه بررسی تقابل عمل آن با مسیرهای عصبی اوپیوئیدرژیک، سروتونینرژیک، گاباژیک و هیستامینرژیک در تست درد ناشی از فرمالین در موش سوری بود.

گرم بر کیلوگرم) + عصاره جلبک قرمز (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) تزریق زیر جلدی فرمالدئید در تمامی گروه‌ها انجام و بلافاصله تست‌های ضد دردی انجام شد. در آزمایش ششم، گروه اول کنترل، گروه دوم عصاره جلبک قرمز (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، گروه سوم سایمتیدین (آنتاگونیست گیرنده‌های H_2 هیستامین، ۱۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) و گروه چهارم تزریق سایمتیدین (۱۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) + عصاره جلبک قرمز (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) تزریق زیر جلدی فرمالدئید در تمامی گروه‌ها انجام و بلافاصله تست‌های ضد دردی انجام شد (۱۴).

تست فرمالین

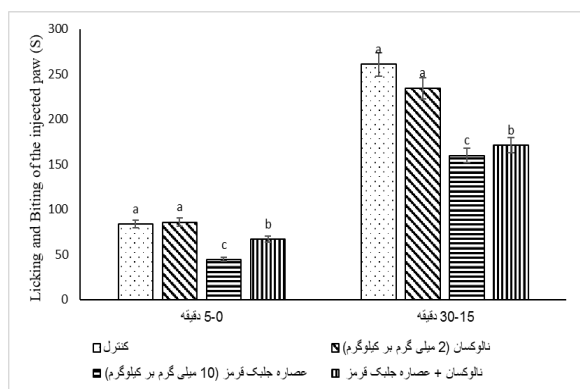
تست فرمالین بنظور ارزیابی تست درد استفاده شد. در روز آزمایش هر موش ۳۰ دقیقه قبل از شروع آزمایش درون محفظه آزمون فرمالین که از یک جعبه شفاف از جنس پلکسی گلاس با ابعاد $30 \times 30 \times 30$ سانتیمتر تشکیل شده است قرار گرفت تا به محیط عادت کند. بمنظور مشاهده بهتر حیوان در زیر آن آینه‌ای با زاویه ۴۵ درجه نسبت به سطح افقی قرار دارد تا وضعیت کف پای حیوان کاملاً مشخص باشد و مشاهدات را آسان‌تر کند. ۳۰ دقیقه پس از تزریق درون صفاقی داروها، ۵۰ میکرولیتر فرمالدئید ۱ درصد بصورت زیر جلدی به کف پای راست موش تزریق و بلافاصله به جایگاه مشاهده برگردانده شده و مدت زمان پاسخ به درد در طی ۲ مرحله، بلافاصله بعد از تزریق فرمالین که به مدت ۵ دقیقه طول می‌کشد (۰-۵ دقیقه) و به عنوان فاز حاد در نظر گرفته می‌شود که بواسطه تحریک مستقیم انتهای آزاد عصب موجب درد می‌شود و مرحله دوم که پس از ۱۵ دقیقه شروع شده و تا دقیقه ۳۰ طول می‌کشد (۱۵-۳۰ دقیقه) و به عنوان فاز مزمن در نظر گرفته می‌شود که ناشی از آسیب ایجاد شده حاصله از فرمالین به سلول و آزد شدن محتویات سلول و تحریک انتهای آزاد عصب است. در هر مرحله مدت زمان صرف شده برای لیسیدن،

(۵ میلی گرم بر کیلوگرم) انجام شد (۱۲). پس از ۳۰ دقیقه، تزریق زیر جلدی فرمالدئید در کف پای راست انجام و بلافاصله تست‌های ضد دردی انجام شد. قابل ذکر است تزریق زیر جلدی فرمالدئید در تمامی گروه‌ها انجام شد. آزمایش دوم، گروه اول کنترل، گروه دوم عصاره جلبک قرمز (تزریق داخل صفاقی ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، گروه سوم نالوکسان (آنتاگونیست غیرانتخابی اویوئیدی، ۲ میلی گرم بر کیلوگرم) و گروه چهارم نالوکسان (۲ میلی گرم بر کیلوگرم) + عصاره جلبک قرمز (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) تزریق شد. در گروه‌هایی که در آنها تقابل عمل مسیرهای ضد دردی بررسی شد، ابتدا تزریق آنتاگونیست انجام شد، ۱۵ دقیقه بعد دوز موثر عصاره (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) تزریق شد و پس از ۱۵ دقیقه، تزریق زیر جلدی فرمالدئید در تمامی گروه‌ها انجام و انجام و بلافاصله تست‌های ضد دردی انجام شد (۱۳). در آزمایش سوم، گروه اول کنترل، گروه دوم عصاره جلبک قرمز (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، گروه سوم فلومازنیل (آنتاگونیست غیرانتخابی گیرنده‌های $GABA$ ، ۵ میلی گرم بر کیلوگرم) و گروه چهارم تزریق فلومازنیل (۵ میلی گرم بر کیلوگرم) + عصاره جلبک قرمز (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) تزریق شد و پس از ۱۵ دقیقه، تزریق زیر جلدی فرمالدئید در تمامی گروه‌ها انجام و بلافاصله تست‌های ضد دردی انجام شد. در آزمایش چهارم، گروه اول کنترل، گروه دوم عصاره جلبک قرمز (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، گروه سوم سیپروهپتادین (آنتاگونیست غیرانتخابی گیرنده‌های سروتونین، ۲ میلی گرم بر کیلوگرم) و گروه چهارم سیپروهپتادین (۲ میلی گرم بر کیلوگرم) + عصاره جلبک قرمز (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) تزریق زیر جلدی فرمالدئید در تمامی گروه‌ها انجام و بلافاصله تست‌های ضد دردی انجام شد. در آزمایش پنجم، گروه اول کنترل، گروه دوم عصاره جلبک قرمز (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، گروه سوم کلرفنیرامین (آنتاگونیست گیرنده‌های H_1 هیستامین، ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و گروه چهارم تزریق کلرفنیرامین (۲۰ میلی -



نمودار ۲- اثر تزریق سطوح مختلف عصاره جلبک قرمز (*Red Algae*) در درد ناشی از تست فرمالین در موش سوری. حروف نامشابه (a-d) نشان دهنده اختلاف منی دار بین گروه های آزمایشی است. $P < 0.05$ سطح معنی داری در نظر گرفته شده است. (n= 5 موش در هر گروه).

با توجه به نتایج آزمون دوم، تزریق نالوکسان (۲ میلی گرم بر کیلوگرم) اثری بر زمان درد ناشی از تست فرمالین نسبت به گروه کنترل نداشت ($P > 0.05$). عصاره جلبک قرمز (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بطور معنی داری موجب کاهش زمان درد ناشی از تست فرمالین نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0.05$). تزریق همزمان نالوکسان و عصاره جلبک قرمز بطور معنی داری موجب کاهش اثرات ضد دردی عصاره جلبک قرمز در مقایسه با گروه عصاره جلبک قرمز شد ($P < 0.05$) (نمودار ۳).



نمودار ۳- اثر تزریق عصاره جلبک قرمز (*Red Algae*)، نالوکسان و تزریق هم زمان آنها در درد ناشی از تست فرمالین در موش سوری. حروف نامشابه (a-c) نشان دهنده اختلاف منی دار بین گروه های آزمایشی است. $P < 0.05$ سطح معنی داری در نظر گرفته شده است. نالوکسان: آنتاگونیست غیرانتخابی اوپیوئیدی. (n= 5 موش در هر گروه).

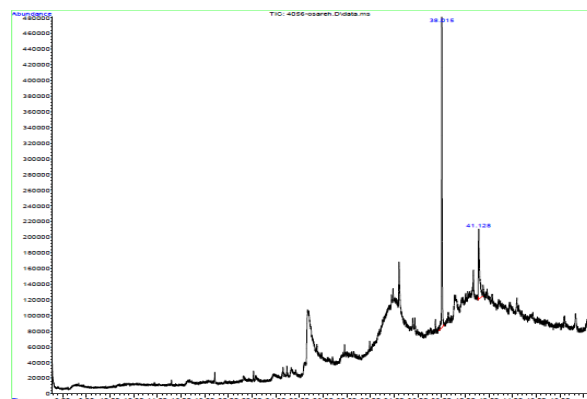
جویدن و گاز گرفتن پای تزریقی (Licking Time) برحسب ثانیه اندازه گیری شد (۱۵).

تجزیه و تحلیل آماری

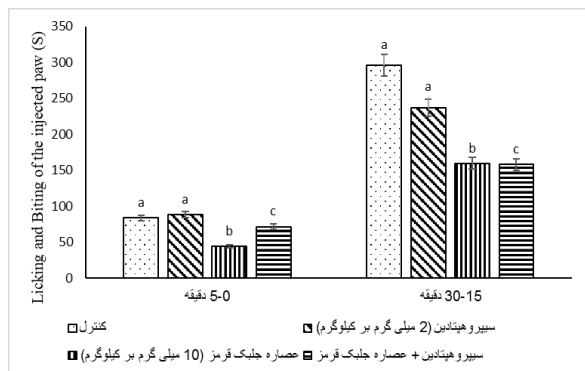
تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS توسط آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (one way ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای ارزیابی اختلاف معنی دار بین گروه ها از آزمون چند دامنه ای Tukey استفاده شد و نتایج به صورت $Mean \pm SE$ گزارش شد. $P \leq 0.05$ بعنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

نتایج

با توجه به نتایج آزمون اول، تزریق مورفین (۵ میلی گرم بر کیلوگرم) بطور معنی داری موجب کاهش زمان درد ناشی از تست فرمالین نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0.05$). سطوح ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره جلبک قرمز بطور معنی داری موجب کاهش زمان درد ناشی از تست فرمالین نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0.05$) (نمودار ۲). از این مرحله تحقیق به بعد به دلیل اثربخشی بیشتر غلظت ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره نسبت به غلظت های کمتر، فقط از غلظت ۱۰ استفاده شد.

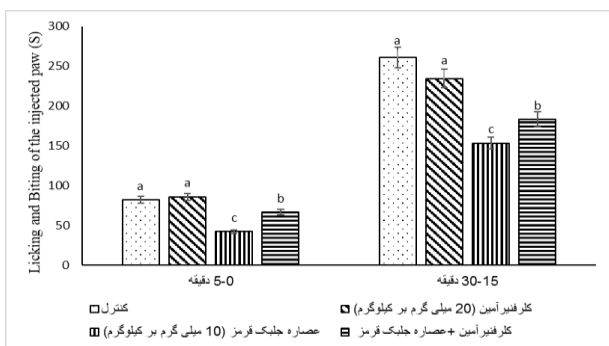


نمودار ۱- کروماتوگرافی گازی ترکیبات عصاره جلبک (*Gracilariaopsis persica*)



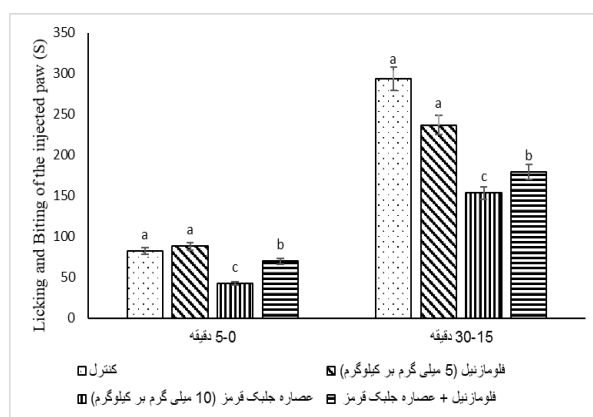
نمودار ۵- اثر تزریق عصاره جلبک قرمز (*Red Algae*)، سپروهپتادین و تزریق هم زمان آنها در درد ناشی از تست فرمالین در موش سوری. حروف نامشابه (a-c) نشان دهنده اختلاف منی دار بین گروه های آزمایشی است. $P < 0.05$ سطح معنی داری در نظر گرفته شده است. سپروهپتادین: آنتاگونیست غیرانتخابی گیرنده‌های سروتونین. ($n = 5$ موش در هر گروه).

در نمودار ۶، تزریق کلرفنی‌آمین (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) اثری بر زمان درد ناشی از تست فرمالین نسبت به گروه کنترل نداشت ($P > 0.05$). عصاره جلبک قرمز (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بطور معنی داری موجب کاهش زمان درد ناشی از تست فرمالین نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0.05$). تزریق توام کلرفنی‌آمین به علاوه عصاره جلبک قرمز بطور معنی داری موجب کاهش اثرات ضد دردی عصاره جلبک قرمز در مقایسه با گروه عصاره جلبک قرمز شد ($P < 0.05$).



نمودار ۶- اثر تزریق عصاره جلبک قرمز (*Red Algae*)، کلرفنی‌آمین و تزریق هم زمان آنها در درد ناشی از تست فرمالین در موش سوری. حروف نامشابه (a-c) نشان دهنده اختلاف منی دار بین گروه های آزمایشی است. $P < 0.05$ سطح معنی داری در نظر گرفته شده است. کلرفنی‌آمین: آنتاگونیست گیرنده‌های H_1 هیستامینی. ($n = 5$ موش در هر گروه).

همانطور که در نمودار ۴ دیده می‌شود، تزریق فلومازنیل (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) اثری بر زمان درد ناشی از تست فرمالین نسبت به گروه کنترل نداشت ($P > 0.05$). عصاره جلبک قرمز (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بطور معنی داری موجب کاهش زمان درد ناشی از تست فرمالین نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0.05$). تزریق همزمان فلومازنیل به علاوه عصاره جلبک قرمز بطور معنی داری موجب کاهش اثرات ضد دردی عصاره جلبک قرمز شد ($P < 0.05$).

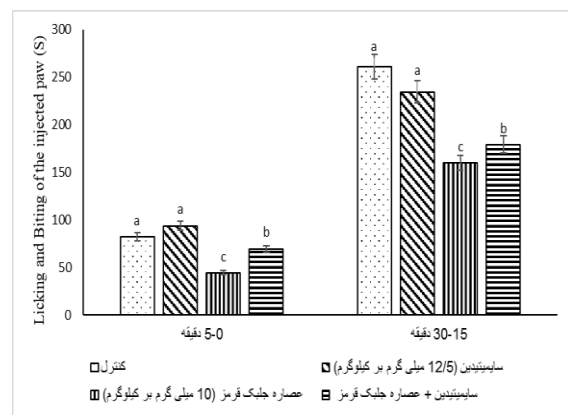


نمودار ۴- اثر تزریق عصاره جلبک قرمز (*Red Algae*)، فلومازنیل و تزریق هم زمان آنها در درد ناشی از تست فرمالین در موش سوری. حروف نامشابه (a-c) نشان دهنده اختلاف منی دار بین گروه های آزمایشی است. $P < 0.05$ سطح معنی داری در نظر گرفته شده است. فلومازنیل: آنتاگونیست غیرانتخابی گیرنده‌های GABA. ($n = 5$ موش در هر گروه).

باتوجه به نمودار ۵، تزریق سپروهپتادین (۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم) اثری بر زمان درد ناشی از تست فرمالین نسبت به گروه کنترل نداشت ($P > 0.05$). عصاره جلبک قرمز (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بطور معنی داری موجب کاهش زمان درد ناشی از تست فرمالین نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0.05$). تزریق همزمان سپروهپتادین و عصاره جلبک قرمز بطور معنی داری موجب تقویت اثرات ضد دردی عصاره جلبک قرمز در مقایسه با گروه عصاره جلبک قرمز شد ($P < 0.05$).

طبیعی گیاهی اگر جایگزین داروهای سنتتیک شوند، عوارض جانبی کمتری اعمال می‌نمایند. (۳). جلبک دریایی بعنوان یک پتانسیل فعال زیستی غنی شناخته می‌شود. جلبک‌های دریایی جلبک قهوه‌ای حاوی پلی ساکاریدهای سولفات (فوکوئیدان‌ها) هستند و برای کنترل التهاب استفاده می‌شود. هونگ و همکاران بیان کردند که جلبک دریایی (*Phaeophyta*) و کلو روفیتا اثرات ضد التهاب در ادم پای حیوانات و اثرات مزمن ضد التهابی دارد (۱۶). باتوجه به یافته‌های حاضر، عصاره جلبک قرمز بطور وابسته به دوز موجب کاهش درد در مقایسه با گروه مورفین شد. تزریق نالوکسان + عصاره جلبک قرمز بطور معنی‌داری موجب کاهش اثرات ضد دردی عصاره جلبک قرمز در مقایسه با عصاره جلبک قرمز به تنهایی شد. Asmawati و همکاران بیان کردند که عصاره متانولی جلبک قهوه‌ای (*Panida*) اثرات ضد التهابی در موش دارد (۱۱). محققین بیان کردند که عصاره متانولی جلبک قرمز برزیلی (*Amansia multifida*) در سطوح ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اثرات ضد درد و ضد التهابی در موش دارد (۱۱). در تحقیق دیگری مشخص شده است که پلی ساکاریدهای مستخرج از عصاره گیاه *Gracilaria caudate* موجب اثرات ضد درد و التهابی در موش می‌شود (۱۷). در تحقیق مشابهی اثرات ضد دردی عصاره جلبک قرمز *Amansia multifida* را مورد بررسی و ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان دهنده این بود که موجب مهار ۷۸ درصدی درد در تست رایت، ۶۲ درصد در تست فرمالین و ۳۶ درصد در تست tail flick شد (۱۸). پیشنهاد شده است که اثرات ضد دردی عصاره جلبک قرمز ناشی از اثرات آنتی اکسیدانی آن است. دوز ۴/۸۷ میکروگرم عصاره جلبک قرمز موجب مهار ادم گوش در موش می‌شود. اینطور می‌توان نتیجه گرفت که اثرات ضد دردی عصاره جلبک قرمز در این مطالعه همسو با مطالعات قبلی بود. همچنین تزریق داخل صفاقی عصاره جلبک قرمز اثرات ضد دردی قوی

باتوجه به نمودار ۷، تزریق سایمیتیدین (۱۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) اثری بر زمان درد ناشی از تست فرمالین نسبت به گروه کنترل نداشت ($P > 0.05$). عصاره جلبک قرمز (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بطور معنی‌داری موجب کاهش زمان درد ناشی از تست فرمالین نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0.05$). تزریق توام سایمیتیدین به علاوه عصاره جلبک قرمز بطور معنی‌داری موجب کاهش اثرات ضد دردی عصاره جلبک قرمز در مقایسه با گروه عصاره جلبک قرمز شد ($P < 0.05$).



نمودار ۷- اثر تزریق عصاره جلبک قرمز (*Red Algae*)، سایمیتیدین و تزریق هم زمان آنها در درد ناشی از تست فرمالین در موش سوری. حروف نامشابه (a-c) نشان دهنده اختلاف منی دار بین گروه‌های آزمایشی است. $P < 0.05$ سطح معنی‌داری در نظر گرفته شده است. سایمیتیدین: آنتاگونیست گیرنده‌های H_2 هیستامینی. (n = ۵ موش در هر گروه).

بحث

امروزه میزان تولید و مصرف سرانه بستنی در بسیاری از دردها، احساس ناخوشایندی است که در پاسخ به محرک قوی به عنوان یک مکانیسم دفاعی ایجاد می‌شود. داروهای بسیاری برای تسکین درد معرفی شده‌اند ولی اغلب آنها دارای عوارض جانبی نامطلوبی هستند که سبب محدود شدن مصرف آنها می‌گردند. اما اعتقاد بر این است که ترکیبات

ها، به ویژه PGI₂ و همچنین برخی سیتوکین‌هایی مانند-IL-1 β ، TNF- α و IL-8 می‌شود. در تحقیقی مشخص شد که عصاره متانولی جلبک قرمز (*Dichotomaria obtusata*) به طور قابل توجهی موجب مهار درد در تست رایت (writhing) می‌شود. با این وجود تزریق داخل صفاقی آن موثرتر از گواژ آن است. این نتیجه ممکن است به دلیل محدودیت زیستی فراهمی ترکیبات فعال عصاره با جذب ضعیف یا اثر عبور اول در کبد باشد (۲۰). در تحقیق مشابه مشخص شد که تزریق سطوح متوسط تا بالای عصاره زنجبیل موجب کاهش درد ناشی از محرک حرارتی در رفلکس‌های نخاعی و مسیر ضددردی مرکزی می‌شود (۳). عمدتاً این اثرات از طریق فلاونوئیدها و آلکالوئیدهای موجود در عصاره عمل می‌کنند. باتوجه به نمودار ۱، بیشترین ترکیب موجود در عصاره به ترتیب ان هگزادکانوئیک اسید، اسکوالین و کولست - پتتا- ان-تریول بود. به نظر می‌رسد اثرات ضددردی این عصاره نیز از طریق این ترکیبات با کنترل آزاد شدن میانجی‌های درد انجام می‌پذیرد. هرچند مطالعه پیشین در خصوص شناسایی مکانیسم‌های ضددردی عصاره جلبک قرمز وجود ندارد، لذا یافته‌های حاضر بعنوان اولین گزارش در مسیره‌های عصبی دخیل در اثرات ضددردی آن است. محققین بیان کردند که اثرات عصاره گیاه *Inula racemosa Hook* در تسکین درد، واسطه گیرنده‌های اوپیویدی و نیتریک اکساید می‌شود (۲۱). تاکنون مطالعه‌ای در خصوص شناسایی مسیره‌های عصبی دخیل در اثرات ضددردی عصاره جلبک قرمز انجام نشده است. در تحقیقی بر تداخل اثر سیستم هیستامینرژیک و عصاره آبی زرشک بر درد ناشی از فرمالین در موشهای صحرایی نر مشخص شد که عصاره آبی زرشک احتمالاً با تقویت قدرت کاهش دهندگی درد توسط گیرنده‌های H₁ هیستامینی اثرات ضددردی خود را اعمال می‌کند (۲۲). در مطالعه‌ای دیگر، تزریق زیر جلدی دکس کلرفنی‌آمین و

(۸۰/۲ درصد) در تست رایت نشان داد (۱۹) که نتایج ما نیز همسو با گزارش‌های پیشین بود. بایستی خاطر نشان کرد که بدلیل مسیره‌های عصبی مختلف دخیل در تست‌های درد، گاهی متغییر و حتی متضاد دیده می‌شود. در مطالعه حاضر از تست فرمالین که یکی از قابل اعتمادترین تست‌ها برای تعیین اثرات ضددردی می‌باشد استفاده شد (۱۵). باتوجه به یافته‌ها تزریق کلرفنی‌آمین + عصاره جلبک قرمز بطور معنی‌داری موجب کاهش اثرات ضد درد عصاره جلبک قرمز شد. در درد ناشی از فرمالین دو نوع ارزیابی مختلف، فاز حاد و مزمن برای درد وجود دارد. فاز حاد بلافاصله بعد از فرمالین شروع می‌شود که موجب تحریک سیستم عصبی مرکزی و محیطی می‌شود که به آن فاز نوروژنیک نیز اطلاق می‌شود. در این مرحله میانجی‌های عصبی مثل ماده P و گیرنده‌های مزدوج شونده با پروتئین G و برادی کینین از پایانه عصبی آزاد می‌شود. سپس یک مرحله بی‌دردی دیده می‌شود که ناشی از بلوک شدن موقتی گیرنده‌های درد بواسطه فرمالین است. مرحله دوم که پس از ۱۵ دقیقه شروع شده و تا دقیقه ۳۰ طول می‌کشد (۳۰-۱۵ دقیقه). این مرحله فاز التهابی نیز گفته می‌شود که بواسطه آسیب موضعی ایجاد شده توسط فرمالین، میانجی‌هایی مثل برادی کینین، پروستاگلاندین‌ها، ماده P، نیتریک اکسید، سروتونین و هیستامین آزاد و موجب بروز حس درد می‌شود (۱۵). جلبک قرمز اثرات ضد التهاب بدون اثرات سمی حتی در سطوح زیاد دارد که سبب شده در پزشکی برای کنترل التهاب استفاده بشود. در مطالعه اثرات ضدسرطانی عصاره جلبک قرمز (*Laurencia caspica*) بر رده سلولی T47D سرطان پستان مشخص شده است که عصاره جلبک، رشد سلول‌های T47D را به صورت وابسته به دوز کاهش و در غلظت ۱۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر رشد ۵۰ درصد از سلول‌ها را مهار می‌کند (۱۰). تحریک موضعی موجب رهایش ترکیباتی مثل برادی کینین، ماده P و پروستاگلاندین-

انجام شده مکانیسم دقیق این اثرات مشخص نشده است و مسیرهایی برای این شواهد پیشنهاد شده است. بعنوان مثال مشخص شده است که بیشتر فلاونوئیدها و آلکالوئیدها عملکرد کانال های سدیم را مهار می کنند و همزمان گیرنده های $GABA_A$ را نیز فعال می کنند که به نوبه خود موجب کاهش درد می شود (۲۷). همچنین مشخص شده است که گیرنده های $GABA_A$ در اثرات ضد اضطراب ط جلیبک دریایی قرمز در موش صحرائی نقش دارند (۲). در تحقیقی بر اثر ضد دردی عصاره جلیبک دریایی قرمز *Gracilaria* در آسیب مفصل تمپومانندیوبلار ناشی از فرمالین در موش صحرائی مشخص شد که اثرات ضد دردی آن از طریق مسیر سروتونین ارژیک میانجی گری می شود. باتوجه به یافته ها چنین نتیجه گیری می شود که جلیبک قرمز اثرات ضد دردی داشته و احتمالاً از طریق مسیرهای اویپوئیدرژیک، سروتونینرژیک، گاباژیک و هیستامینرژیک در موش سوری میانجی گری می شود. هر چند مسیرهای عصبی دخیل در سویه های دیگر حیوانی و حتی با تست های درد مختلف متفاوت است، لذا پیشنهاد می شود اثرات ضد دردی جلیبک قرمز در سایر حیوانات و با استفاده از تست های تکمیلی جهت بهتر مشخص شدن کاربرد بالینی آن به عنوان ترکیب ضد دردی انجام بشود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مدیریت و کارشناسان دانشکده دامپزشکی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی نهایت تشکر و قدردانی به عمل می آید. این تحقیق بر گرفته از پایان نامه دوره دکتری عمومی دامپزشکی نویسنده اول می باشد.

فهرست منابع

1. Chiu IM, Ribeiro F, Woolf CJ. Pain and infection: pathogen detection by nociceptors. *Pain*. 2016;157(6):1192.
- 2.

رانیتیدین باعث کاهش رفتارهای دردی القا شده توسط فرمالین در موش سوری می شود (۲۳). اخیر مشخص کرده اند که هیستامین مغزی نیز در درک درد نقش دارد، چون تزریق داخل بطن مغزی هیستامین موجب کاهش درد در آزمونهای مکانیکی و حرارتی درد در موشهای سوری و رت شده است. تزریق داخل بطن مغزی هیستامین یک اثر مهارى در کنترل درد ناشی از تزریق کفپایی کاراجینان ایجاد کرده است. به علاوه تزریق داخل بطن مغزی هیستامین موجب کاهش درد ناشی از تزریق کفپایی فرمالین در موشهای سوری شده است (۲۴). تزریق داخل مغزی هیستامین به قشر حسی - پیکری اولیه اثرات ضد دردی را در مرحله اول و دوم درد فرمالینی ایجاد کرد، درحالیکه پیش تیمار با کلرفنیرامین و رانیتیدین، اثرات ضد دردی ناشی از هیستامین را مهار کردند و این نشان می دهد که در قشر حسی پیکری اولیه، هیستامین از طریق گیرنده های H_1 و H_2 پس سیناپسی، درد ناشی از فرمالین را تعدیل میکند. در سطح فوق نخاعی، تزریق توأم تملاستین و تیوتیدین، همراه با هیستامین به قشر دور قناتی خاکستری، آنالژی ناشی از هیستامین را در تست صفحه داغ در موش ها می شود (۲۵). به نظر می رسد ضد دردی جلیبک قرمز از طریق مسیرهای عصبی مشابهی با این گزارش میانجی گری می شود.

همانطور که در نتایج دیده می شود، فلومازنیل + عصاره جلیبک قرمز بطور معنی داری موجب کاهش اثرات ضد دردی عصاره جلیبک قرمز شد. تزریق سیپروهپتادین + عصاره جلیبک قرمز بطور معنی داری موجب تقویت اثرات ضد دردی عصاره جلیبک قرمز شد. میانجی های شیمیایی مختلف مانند سروتونین، کینین ها، گابا و اسیدهای آمینه تحریکی در پاتوژنز التهاب و پاسخ های پردازش درد نقش دارند. بیان شده است که فلاونوئیدها و آلکالوئیدها ممکن است در تعاملات با سیستم های گاباژیک، سروتونین ارژیک و نیتریک اکساید نقش داشته باشند (۲۶). علیرغم مطالعات

- Monteiro VS, Teles FB, Coura CO, Souza RB, de Carvalho Lima CN, da Silva Costa DV, et al. Involvement of the GABAergic system in the anxiolytic effect of sulfated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Journal of Applied Phycology*. 2016;28(3):1997-2004.
- Fallahzadeh A, Mohammadi S. An investigation of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract of *Inula helenium* on male rats. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2016;18(12):57-63.
 - Zarei M, Mohammadi S, Abolhassani N, ASGARI NM. The antinociceptive effects of hydroalcoholic extract of *bryonia dioica* in male rats. 2015.
 - Izadpanah E, Nikandam F, Moloudi MR, Hassanzadeh K. Evaluation of the analgesic effect of hydroalcoholic extract of *Cinnamomum* in rats. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*. 2016;21(4):41-8.
 - Zarei M, Mohammadi S, Shahidi S, Fallahzadeh AR. Effects of *Sonchus asper* and apigenin-7-glucoside on nociceptive behaviors in mice. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*. 2017;5(4):227-37.
 - Ghaffari M, Taheri A, Zobeidinezhad M. In vitro Evaluation of Antibacterial Effect of Ethyl Acetate Extract of Red Algae (*Gelidiella acerosa*) on Some Gram-positive and Gram-negative Bacteria. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*. 2016;15(3):209-22.
 - Ma J, Yu H, Liu J, Chen Y, Wang Q, Xiang L. Curcumin promotes nerve regeneration and functional recovery after sciatic nerve crush injury in diabetic rats. *Neuroscience letters*. 2016;610:139-43.
 - Omar H, Shiekh H, Gumgumjee N, El-Kazan M, El-Gendy A. Antibacterial activity of extracts of marine algae from the Red Sea of Jeddah, Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*. 2012;11(71):13576-85.
 - Shafaghi M, Salehzadeh A, Moshfegh A. Anticancer effects of *Laurencia caspica* extract on breast cancer T47D cell line. *Aquatics Physiology and Biotechnology*. 2016;4(1):69-83.
 - Asmawati A, Hasyim R, Lianingsih A, Ariani D. The difference of anti-inflammatory effect of brown algae extract *panida* sp. and *sargassum* sp that is derived from Punaga beach, South Sulawesi. *J Dentomaxillofac Sci*. 2016;1:116-9.
 - Labuz D, Celik MÖ, Zimmer A, Machelska H. Distinct roles of exogenous opioid agonists and endogenous opioid peptides in the peripheral control of neuropathy-triggered heat pain. *Scientific reports*. 2016;6:32799.
 - Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*. 1987;30(1):103-14.
 - Abdallah H, Asaad G, Arbid M, Abdel-Sattar E. Anti-inflammatory, Antinociceptive, Antipyretic and Gastroprotective Effects of *Calligonum comosum* in Rats and Mice. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*. 2014;6(2):26-33.
 - Shahin H, Hadis R, Razavi SM. Anti-nociceptive and antioxidant activity of Betaine on Formalin-and Writhing tests induced pain in mice. *Behavioural Brain Research*. 2020:112699.
 - Hong DD, Hien HM, Anh HTL. Studies on the analgesic and anti-inflammatory activities of *Sargassum swartzii* (Turner) C. Agardh (Phaeophyta) and *Ulva reticulata* Forsskal (Chlorophyta) in experiment animal models. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(12):2308-13.
 - Chaves LdS, Nicolau LAD, Silva RO, Barros FCN, Freitas ALP, Aragão KS, et al. Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 2013;35(1):93-100.
 - Aragão GF, Nonato DTT, da Ponte EL, Sales JR, Alencar DB, Sampaio SS, et al. Protective effects of ethanolic extract from

- the red algae *Amansia multifida* on experimental inflammation, nociception and seizure experimental models. *Acta Scientiarum Biological Sciences*. 2016;38(4):465-71.
19. García Delgado N, Frías Vázquez AI, Cabrera Sánchez H, Soto del Valle RM, Sierra Gómez Y, Suárez Alfonso AM. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of methanolic extract from red seaweed *Dichotomaria obtusata*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;49(1):65-74.
 20. Vázquez AIF, Sánchez CMD, Delgado NG, Alfonso AMS, Ortega YS, Sánchez HC. Anti-inflammatory and analgesic activities of red seaweed *Dichotomaria obtusata*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011;47(1):111-8.
 21. Zhang S-D, Qin J-J, Jin H-Z, Yin Y-H, Li H-L, Yang X-W, et al. Sesquiterpenoids from *Inula racemosa* Hook. f. inhibit nitric oxide production. *Planta medica*. 2012;78(02):166-71.
 22. Mojtahedin A, Gholizadeh NikPey M, Hajighahramani S. Interaction of the effect of histaminergic system and aqueous extract of Barberry on formalin-induced pain in male rats. *Journal of Animal Environment*. 9(4):85-94.
 23. Mojtahedin A. Effects of cholinergic system in antinociception induced by H-1 and H-2 receptor antagonists on somatic pain in rats. *Int J Med Res Health Sci*. 2016;5:378-83.
 24. Salimi S, Tamaddonfard E. Microinjection of histamine and its H3 receptor agonist and antagonist into the agranular insular cortex influence sensory and affective components of neuropathic pain in rats. *European journal of pharmacology*. 2019;857:172450.
 25. Erfanparast A, Tamaddonfard E, Henareh-Chareh F, editors. Central H2 histaminergic and alpha-2 adrenergic receptors involvement in crocetin-induced antinociception in orofacial formalin pain in rats. *Veterinary Research Forum*; 2020: Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
 26. Al-Hariri MT, Abualait TS. Effects of Green Brazilian Propolis Alcohol Extract on Nociceptive Pain Models in Rats. *Plants*. 2020;9(9):1102.
 27. Wang Z-J, Heinbockel T. Essential oils and their constituents targeting the gabaergic system and sodium channels as treatment of neurological diseases. *Molecules*. 2018;23(5):1061.