مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره سیزدهم، شمارهٔ ۱، دی ۱۳۸۹، صفحه ۳۵-۲۸

اثر عصاره الکلی میوه زرشک (Berberis Vulgaris L) بر التهاب حاد و مزمن در موش صحرایی نر

زهرا کیاسالاری(PhD) [۱]، محسن خلیلی(PhD) [*۱]، پیام احمدی(MD) [۲]

۱- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و علوم اعصاب دانشگاه شاهد
۲- دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد

دریافت: ۸۹/۳/۱ ، اصلاح: ۸۹/۵/۱۳، پذیرش: ۸۹/۷/۱۴

خلاصه

سابقه و هدف: التهاب از جمله عوارض شایع بسیاری از بیماری‌هاست که موجب تضعیف سیستم ایمنی بدن می‌شود. دو نوع اصلی التهاب حاد و مزمن وجود دارد. التهاب موجب ایجاد عفونت و تاخیر در بهبود بیماری می‌شود. با توجه به عدم درمان قطعی و کامل توسط داروهای شیمیایی و ترکیبات آلکالوئیدی موجود در ریشه گیاه زرشک از جمله بربرین که دارای خاصیت ضدالتهابی قوی می باشد. این مطالعه به منظور بررسی اثر ضد التهابی عصاره الکلی میوه زرشک انجام شد.

مواد و روشها: در این مطالعه آزمایشگاهی تعداد ۸۶ سرموش صحرائی نر نژاد NMRI در محدوده وزنی ۳۵۰-۳۰۰ گرم به صورت تصادفی به پنج گروه کنترل (فقط دریافت ایوانس بلو)، شاهد (ایجاد التهاب بدون درمان)، گروه های التهابی- درمان که بترتیب با دوزهای ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، عصاره الکلی میوه زرشک را دریافت می کردند، تقسیم شدند. هر یک از گروه‌ها با سه روش سنجش التهاب حاد (تزریق فرمالین به کف پا، گزیلن در گوش، و اسید استیک در داخل صفاق) و یک روش سنجش التهاب مزمن (کاشت گاز استریل در کشاله ران) مورد ارزیابی قرار گرفتند. نهایتا در آزمون تکمیلی اثر ضد دردی دوز موثر عصاره میوه زرشک با استفاده از آزمون تزریق فرمالین به کف پای حیوان ارزیابی گردید.

یافته ها: دوزهای موثر ۱۵۰ و ۳۰۰ mg/kg عصاره توانست جذب نوری مایع پای ملتهب را از میزان ۰/۱±۰/۰۳ در گروه کنترل به میزان ۰/۱۵±۰/۰۲ و ۰/۱۶±۰/۰۱ برساند (p<۰/۰۵). همچنین دوز ۳۰۰ mg/kg عصاره، جذب نوری مایع صفاقی را از میزان ۱/۴۳±۰/۱ در گروه کنترل به مقدار ۰/۷±۰/۰۹ تغییر داد (p<۰/۰۵). التهاب مزمن با مصرف دوزهای ۱۵۰ و ۳۰۰ mg/kg به ترتیب ۲۰/۱۱±۲/۲۷ و ۲۴/۱۵±۲/۸۴ گردید که نسبت به گروه کنترل (۳۳/۴±۲/۱۴) کاهش معنی دار پیدا کرد (p<۰/۰۱ و p<۰/۰۵). فاز انتهایی درد مزمن توسط عصاره (۳۰۰ mg/kg) از میزان ۱/۷۹±۰/۱۸ در گروه کنترل به مقدار ۱/۲۵±۰/۱ کاهش معنی دار پیدا کرد (p<۰/۰۱).

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که عصاره الکلی میوه زرشک در دوزهای متوسط و بالا قادر است التهاب حاد تزریق فرمالین و اسید استیک را بترتیب در پا و صفاق به همراه التهاب مزمن کاشت یک جسم خارجی در بدن بصورت معنی داری کاهش دهد. بعلاوه کاهش فاز انتهایی درد مزمن که هم راستای نتایج کاهش التهاب مزمن می باشد را نمی توان از نظر دور داشت.

واژه های کلیدی: *التهاب، درد، میوه زرشک، موش صحرایی.*

مقدمه

التهاب از جمله عوارض شایع بسیاری از بیماری‌هاست که موجب تضعیف سیستم ایمنی بدن می‌شود. دو نوع اصلی التهاب حاد و مزمن وجود دارد. التهاب موجب ایجاد عفونت و تاخیر در بهبود بیماری می‌شود. درمان‌های شیمیایی از جمله کاربرد گلوکوکورتیکوئیدها ضمن ایفای نقش اساسی در رفع التهاب، گاهی اوقات موجب ایجاد عوارض جانبی شدید در بیمار نیز می‌شوند. از این‌رو در رویکرد جدید در دنیا بویژه ایران استفاده از طب مکمل بخصوص طب سنتی و گیاه

▣ این مقاله حاصل پایان نامه پیام احمدی دانشجوی پزشکی دانشگاه شاهد می باشد.
* مسئول مقاله:
آدرس: تهران، بلوار کشاورز، خیابان شهید عبداله زاده، دانشکده پزشکی شاهد، گروه فیزیولوژی، تلفن: ۸۸۹۶۴۷۹۲-۰۲۱
e-mail:najafabady@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.13.1.4.9]

درمانی به عنوان درمان رایج با تجربه هزارساله و احتمال تاثیر بهتر معرفی میگردد (۱). گیاه زرشک (Berberis vulgaris) از خانواده Berberidaceae از جمله گیاهان بومی در ایران است که در طب سنتی ایران به عنوان گیاه ضد التهاب شناخته شده است (۱). تحقیقات اخیر اثرات ضد درد، ضد التهاب و ضد سرطانی ریشه این گیاه را نشان داده‌اند (۵-۲). مشاهده شده که الکالوئیدهای گیاه زرشک قادرند ایمنی بواسطه سلولهای T را افزایش دهند (۶و۳). نتیجه تحقیق دیگری نشان داد که اثرات ضد دردی و ضد التهابی و ضد تب توسط ریشه این گیاه ظاهر می‌شود (۴). علاوه بر اینها Fukuda و همکارانش نشان دادند که عصاره گیاه زرشک در مهار پروتئین فعال کننده (Activating protein 1, AP1) سلول های هپاتومای انسانی مؤثر می باشد (۵).

همچنین کاربرد این گیاه در درمان بسیاری از انواع بیماریهای عفونی ذکر شده است (۷ و۲). در بعضی جوامع نیز از این گیاه بعنوان ضد انگل (مالاریا و لشمانیا تروپیکا) استفاده شده است (۸و۷). علاوه بر اینها اثرات کاهش دهنده فشار خون و محرک سیستم ایمنی از این گیاه ذکر شده است که این اثرات را مربوط به ترکیب موثره این گیاه یعنی آلکالوئید بربرین (Berberine) می دانند (۹و۲). اگرچه مصرف مقادیر زیاد آلکالوئید این گیاه (بربرین) می تواند باعث فلج تنفسی و حتی مرگ شود، اما مرگ ناشی از مصرف زیاد این گیاه هنوز گزارش نشده است (۸و۷). Tomosaka و همکاران خاصیت آنتی اکسیدانی و حفاظت سلولی میوه زرشک را نشان داده اند (۱۰).

اخیرا اثر مهار کنندگی عصاره ریشه زرشک بر روی استرس اکسیداتیو گزارش شده‌است (۱۱). حدود ۲۲ آلکالوئید در ریشه، برگ و میوه این گیاه شناسایی شده است که در درمان بیماریهای مختلف کاربرد داشته است (۱۲). اگر چه در طب سنتی به اثر میوه زرشک روی التهاب تاکید شده، ولی در مطالعات جدید فقط اثر ضد التهابی ریشه گیاه مورد بررسی قرار گرفته است (۴) و هیچ‌گونه کار آزمایشگاهی روی تاثیرات میوه گیاه انجام نشده‌است. لذا با توجه به عوارض شدید و اجتناب ناپذیر داروهای شیمیایی (۱۴و۱۳و۸) از جمله آزاد شدن واسطه‌های شیمیایی (۱۶و۱۵) و با توجه به وجود شواهد در طب سنتی ایران از اثرات ضد التهابی میوه زرشک (۷)، در این مطالعه اثر ضد التهابی عصاره میوه زرشک بر التهاب حاد و مزمن در موش آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

روش تهیه عصاره: جهت تهیه عصاره الکلی زرشک، پس از تهیه میوه گیاه زرشک از فروشگاه های محلی و تایید آن توسط هرباریوم مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد تهران و جدا کردن ناخالصی‌های آن، مقدار ۵۰۰ گرم از میوه گیاه بوسیله آسیاب خرد شده و با نسبت ۱ به ۵ با الکل اتیلیک (۷۰٪) مخلوط گردید. محتوای بدست آمده به صورت در بسته به مدت ۴۸ ساعت در محیط آزمایشگاه نگه داشته شد. آنگاه به وسیله کاغذ صافی‌های بزرگ و کوچک فیلتراسیون دقیق مخلوط انجام گرفت. مایع صاف شده در بن‌ماری ۶۵ درصد جهت تغلیظ قرار گرفت. در نهایت از عصاره با قوام عسلی به دست آمده (حدود ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰گرم میوه خرد شده) بوسیله نرمال سالین غلظتهای متفاوت مورد نیاز برحسب میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن حیوان تهیه شد.

حیوانات: در این مطالعه از ۸۶ سر موش صحرایی نر از جنس NMRI (تهیه شده از انسیتو پاستور تهران) در محدوده وزنی ۳۵۰-۳۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات در شرائط دمایی و طول شب و روز یکسان با دسترسی آزاد به یک نوع آب و غذا نگهداری شدند. حیوانات بطور تصادفی به پنج گروه کنترل (فقط دریافت ایوانس بلو)، شاهد (ایجاد التهاب بدون درمان)و گروه های التهابی-درمان که بترتیب با دوزهای ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن عصاره الکلی میوه زرشک را دریافت می کردند، تقسیم شدند. هر یک از گروههای مورد مطالعه با سه روش سنجش التهاب حاد (تزریق فرمالین به کف پا، گزیلن در گوش، و اسید استیک در داخل صفاق) و یک روش سنجش التهاب مزمن (کاشت گاز استریل در کشاله ران) مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۷). نهایتاً در آزمون تکمیلی در دو گروه کنترل و درمان با دوز ۳۰۰ mg/kg عصاره، درد فرمالینی مورد بررسی قرار گرفت

آزمونهای التهابی مورد استفاده:

ایجاد التهاب حاد با فرمالین: در هریک از زیرگروه‌های التهاب پا از چهار موش صحرایی استفاده شد. ابتدا فرمالین ۲/۵ درصد با حجم ۵۰ میکرولیتر به کف پای عقب موش‌ها تزریق شد (۱۴) و سپس حیوانات توسط تزریق کتامین (۱۰۰ mg/kg) + گزیلازین (یک هشتم دوز کتامین) بیهوش شدند. پس از کانول‌گذاری در نای حیوان تنفس مصنوعی برقرار شد. در مرحله بعد با باز کردن قفسه سینه و آشکار شدن قلب، عمل تزریق ایوانس بلو (۳۰ mg/kg) از طریق بطن چپ انجام شد. میزان نفوذ ایوانس بلو در عروق ناحیه ملتهب و ورود به فضای بین بافتی نشان دهنده میزان التهاب است. ۳۰ دقیقه پس از تزریق ایوانس بلو، پای حیوان از ناحیه مچ جدا شده، با قیچی به قطعات کوچکتر تبدیل و در محلول استات سولفاته (استون و سولفات سدیم ۱٪ به نسبت ۳ به ۱/۵) قرار گرفت.

ظرف محتوی پا به همراه محلولهای مربوطه به مدت ۲۴ ساعت بر روی دستگاه شیکر افقی قرار گرفت (در این مدت ایوانس بلو از داخل پا وارد محلول استات سولفاته می‌شد). ظروف حاوی پا و محلولهای مربوطه به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفوژ شده و نهایتاً جذب نوری مایع سانتریفوژ شده در ۶۲۰ nm به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (Spectronic 20 Genesys) قرائت شد. میزان جذب نوری با توجه به میزان ماده رنگی نشان دهنده میزان التهاب است. در گروه درمان، عصاره الکلی میوه گیاه زرشک با دوزهای ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ mg/kg حدود ۳۰ دقیقه قبل از تزریق ایوانس بلو بصورت داخل صفاقی به حیوان تزریق شد. در انتها با ۳۰ دقیقه فاصله زمانی از ایجاد التهاب، میزان التهاب اندازه‌گیری شد (۱۷).

ایجاد التهاب حاد در گوش: در هریک از زیرگروههای التهاب گوش از چهار موش صحرایی استفاده شد. برای ایجاد التهاب حاد در گوش حیوانات از گزیلن (۰/۰۳ ml) استفاده شد. بدنبال بیهوشی و برقراری تنفس مصنوعی از طریق نای، گزیلن بصورت زیر جلدی بر روی لاله گوش حیوان تزریق شد. حدود یک ساعت بعد از تزریق گزیلن (تقریباً حداکثر بروز التهاب) ایوانس بلو با روش بکار برده شده در آزمون فرمالین تزریق شد. سپس گوش‌ها به شکل حلقوی از مرکز ناحیه التهاب بریده، تکه تکه و در محلول استات سولفاته (استون و سولفات سدیم ۱٪ به نسبت ۳ به ۱/۵) قرار گرفته و نهایتاً جذب نوری محلول بدست آمده سنجیده شد. در حیوانات مورد درمان، عصاره الکلی میوه گیاه زرشک مشابه

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.13.1.4.9]

دوزهای قبلی حدود ۳۰ دقیقه قبل از تزریق ماده رنگی به حیوانات تزریق شد. در انتها با ۳۰ دقیقه فاصله زمانی از ایجاد التهاب، میزان التهاب اندازه‌گیری شد (۱۷). لازم به ذکر است همزمان برای تایید یافته های حاصل از جذب نوری ماده ایوانس قطر پای حیوانات در گروههای کنترل و درمان قبل و ۳۰ دقیقه بعد از تزریق عصاره گیاه به وسیله دستگاه کولیس اندازه گیری گردید. تفاوت قطر پای گروههای درمان نسبت به گروه کنترل به عنوان درصد تغییرات قطر پا در گروههای عصاره گرفته، در نظر گرفته شد.

ایجاد التهاب حاد در صفاق: در زیرگروه التهاب مزمن از هشت موش صحرایی استفاده شد. برای ایجاد التهاب در صفاق، اسید استیک ۰/۰۷٪ با حجم ml/kg ۱۰ بصورت داخل صفاقی تزریق شد. پس از گذشت حدود ۳۰ دقیقه دقیقاً مطابق روش توضیح داده شده قبلی، ماده رنگی آبی ایوانس تزریق و سپس مایع صفاق جمع‌آوری و جذب نوری آن قرائت شد. در این آزمون هم در گروه درمان همان دوزهای قبلی عصاره در گروههای جداگانه موشها بصورت داخل صفاقی تزریق شد. در انتها با ۳۰ دقیقه فاصله زمانی از ایجاد التهاب، میزان التهاب اندازه‌گیری شد.

ایجاد التهاب مزمن از طریق کاشت پنبه در ناحیه کشاله ران: برای انجام این آزمون در ابتدا موش‌ها با داروی کتامن (۱۰۰ mg/kg) بیهوش شدند. بعد از آن با ایجاد یک شکاف کوچک در ناحیه کشاله ران (در دو طرف)، قطعه‌ای از پنبه رول (دندانپزشکی) با وزن mg ۳۰ آغشته به آمپی‌سیلین در این ناحیه کاشته شد. پس از بخیه کردن ناحیه برش خورده و به هوش آمدن، موشها بمدت ۷ روز در آزمایشگاه حیوانات نگهداری شده و پس از آن با بیهوشی مجدد و برش ناحیه کشاله ران پنبه‌های کاشته شده بیرون آورده شدند. پنبه‌ها پس از خشک شدن به مدت ۲۴ ساعت در درجه حرارت ۶۰ درجه سانتیگراد، وزن شده و تفاوت وزن پنبه قبل و بعد از کاشت به عنوان میزان التهاب در نظر گرفته شد. در گروه درمان، موثرترین دوز عصاره گیاه (۳۰۰ mg/kg, i.p) هر دو روز یک‌مرتبه به حیوان تجویز شد (۱۷).

آزمون درد فرمالین: در این آزمون برای ایجاد درد از محلول فرمالین ۲/۵ درصد با حجم ۵۰ میکرولیتر استفاده شد. فرمالین با دوز مورد نظر به کف یکی از پاهای عقب حیوان زیرجلدی تزریق گردید. سپس برای ثبت پاسخ رفتاری درد، بلافاصله موش در ظرف مخصوص پلکسی‌گلاس (Plexy Glass) که در زیر آن آینه‌ای با زاویه ۴۵ درجه برای مشاهده دقیق‌تر حیوان قرار گرفته، گذاشته شد. میزان شدت درد حیوان به ترتیب با اعداد صفر (بدون علامت)، ۱ (لنگ زدن هنگام حرکت)، ۲ (بالا گرفتن پای تزریقی هنگام حرکت) و ۳ (لیسیدن یا گاز گرفتن پای فرمالین گرفته) رتبه بندی شد. با سنجش درد حیوان هر ۱۵ ثانیه یک بار و تعیین میانگین درد در هر دقیقه آزمون در ۶۰ دقیقه با ۶۰ میانگین تکمیل شد. موشهای گروههای کنترل و آزمون، به مدت ۱۵ دقیقه قبل از آزمون فرمالین، جهت آشنایی با محیط در ظرف مورد آزمایش قرار گرفتند. دقایق ۱ تا ۱۵ پس از تزریق عمدتاً شدت درد بالا رفته (درد حاد) و سپس نزول می کند. افزایش مجدد شدت درد که از دقایق پس از ۱۵ تا ۶۰ ادامه می‌یابد بعنوان درد مزمن در نظر گرفته شد. دقایق ۴۰-۱۵ و ۶۰-۴۰ هم به ترتیب بعنوان فاز اولیه (Early phase) و ثانویه (Late phase) درد التهابی یا مزمن در نظر گرفته شدند. سپس گروهها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه مورد مقایسه قرار گرفته و $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر عصاره الکلی میوه زرشک بر میزان التهاب (جذب نوری) ناشی از تزریق فرمالین: مقایسه داده‌های جذب نوری محلول جدا شده از پای حیوانات گروه کنترل با گروههای عصاره گرفته نشان داد که تزریق عصاره گیاه زرشک در دوزهای ۱۵۰ و ۳۰۰ mg/kg حدود ۲۰ دقیقه قبل از تزریق فرمالین توانسته میزان جذب نوری مایع جدا شده از پای کنترل را به ترتیب به ۰/۱۵±۰/۰۲ و ۰/۱۶±۰/۰۱ برساند که نسبت به گروه ملتهب (۰/۱±۰/۰۳) دارای کاهش معنی دار هستند ($p<0/05$ و $p<0/01$) (جدول شماره ۱). همچنین جذب نوری محلول جدا شده از پای حیوانات بدون درمان که فقط تزریق فرمالین داشته‌اند (۰/۲۷±۰/۳) نسبت به گروه کنترل (۰/۱±۰/۰۳) افزایش معنی‌دار نشان داد ($p<0/05$).

اثر عصاره گیاه زرشک بر میزان افزایش قطر پای ناشی از تزریق فرمالین: افزایش قطر پا به دنبال تزریق فرمالین در گروه ملتهب و درمان با دوز ۷۵ mg/kg تفاوت معنی داری نشان نداد. درصد تغییرات قطر پا در گروههای درمانی ۱۵۰ و ۳۰۰ mg/kg عصاره زرشک به ترتیب (۰/۱۳±۰/۹) و (۰/۱۴±۰/۷) بود که نسبت به گروه کنترل (۰/۱۱±۱/۱۸) کاهش معنی‌دار داشته است ($P<0/05$ و $p<0/01$) (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: مقایسه میزان التهاب (جذب نوری مایع جدا شده از پا) ناشی از تزریق فرمالین در سه گروه کنترل، ملتهب و درمان شده با عصاره گیاه زرشک

گروه‌های آزمون	نتیجه حاصل از آزمون جذب نوری مایع جدا شده از پا	درصد تغییرات قطر پا (میلیمتر)
کنترل	۰/۱±۰/۰۳	-
ملتهب	۰/۲۷±۰/۰۳ *	۱/۱۸±۰/۱۱
زرشک (۷۵ mg/kg)	۰/۲۱±۰/۰۲۹	۱/۱۱±۰/۰۹
زرشک (۱۵۰ mg/kg)	۰/۱۵±۰/۰۲ ##	۰/۹±۰/۱۳ *
زرشک (۳۰۰ mg/kg)	۰/۱۶±۰/۰۱ #	۰/۷±۰/۱۴ **

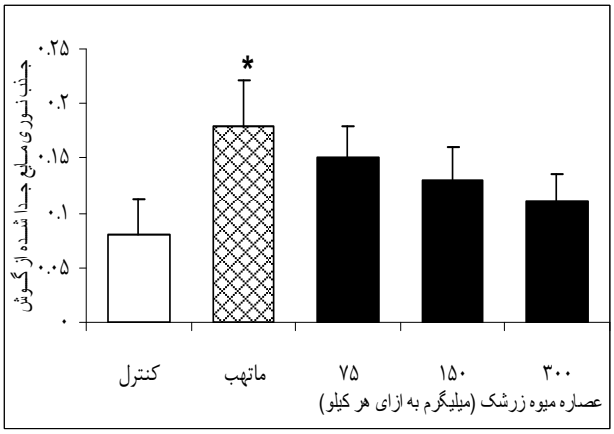
($n = 9-12$). * و # برترتیب تفاوت با گروه کنترل و ملتهب می باشد ($p<0/05$).
در ستون راست جدول مقایسه درصد تغییرات قطر پای ملتهب شده توسط فرمالین در گروههای کنترل و درمان نشان داده شده است. * نشان دهنده درصد اختلاف با گروه ملتهب می باشد ($p<0/05$).

اثر عصاره الکلی میوه زرشک بر التهاب ناشی از تزریق گزیلن در گوش: میزان جذب نوری محلول مستخرج از گوش بین گروه کنترل التهابی و گروه درمان شده با عصاره در هیچیک از دوزهای کاربردی تفاوت معنی‌داری نداشت. درحالی‌که فرمالین در گروه التهابی، میزان جذب نوری (۰/۱۸±۰/۰۴) را نسبت به گروه کنترل (۰/۰۸ ±۰/۰۳) افزایش معنی‌دار داده‌است (نمودار ۱).

اثر عصاره الکلی میوه زرشک بر التهاب صفاقی: داده‌های ناشی از جذب نوری مایع جمع شده از صفاق بدنبال ایجاد التهاب به کمک تزریق اسید استیک در این ناحیه نشان داد که عصاره گیاه زرشک در دوز ۳۰۰ mg/kg

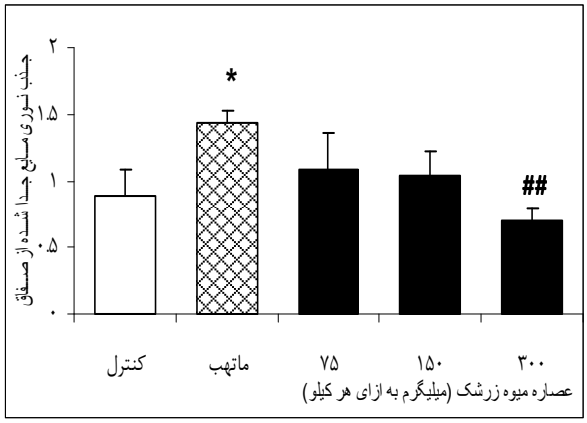
[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.13.1.4.9]

توانسته است میزان جذب نوری مایع صفاقی را از ۰/۱±۱/۴۳ در گروه التهابی به مقدار ۰/۰۹±۰/۷ برساند (p<۰/۰۱) (نمودار ۲). درحالی‌که تزریق اسید استیک در گروه التهابی، میزان جذب نوری مایع صفاق را از میزان ۲±۰/۸۹در گروه کنترل به مقدار ۰/۱±۱/۴۳ تغییر داد (p<۰/۰۵).



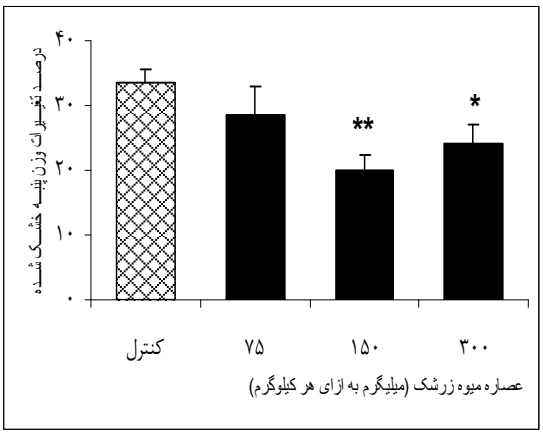
نمودار ۱: مقایسه جذب نوری ماده رنگی در محلول مستخرج از قطعات گوش حیوانات در دو گروه کنترل و درمان.

همانطور که ستونهای شکل (میانگین±انحراف معیار) نشان می‌دهد عصاره گیاه در هیچیک از دوزهای کاربردی نتوانسته است میزان التهاب گوش ناشی از تزریق گزیلن را نسبت به گروه التهابی به صورت معنی‌دار کاهش دهد (n=۱۰-۱۲). p<۰/۰۵ * نسبت به گروه کنترل.



نمودار ۲: مقایسه جذب نوری محلول آبی ایوانس نشان می‌دهد که عصاره گیاه زرشک در دوز ۳۰۰ mg/kg قادر است التهاب ناشی از تزریق اسید استیک در ناحیه صفاق را بصورت بارز کاهش دهد. n = ۹-۱۲، p<۰/۰۵ * نسبت به گروه کنترل و p<۰/۰۱ ## نسبت به گروه ملتهب.

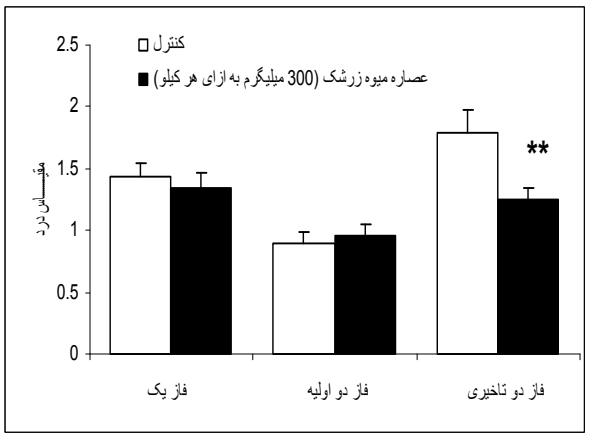
اثر عصاره الکلی میوه زرشک بر التهاب مزمن: وزن پلیت کاشته شده در ناحیه کشاله ران موش‌های گروه عصاره گرفته با گروه کنترل نشان داد که در گروههای درمانی ۱۵۰ و۳۰۰ mg/kg بترتیب ۲/۲۷±۱۱ و ۲/۸۴±۲۴/۱۵ بود که نسبت به گروه کنترل (۲/۱۴±۳۳/۴) کاهش معنی‌دار داشته است (p<۰/۰۱ و p<۰/۰۵) (نمودار ۳).



نمودار ۳: التهاب مزمن ناشی از کاشت پلیت در ناحیه کشاله ران موش‌های صحرایی.

همانطور که شکل نشان می‌دهد مقایسه وزن پلیت‌ها قبل و بعد از التهاب در گروه درمان با دوزهای۱۵۰ و ۳۰۰ mg/kg تغییر معنی‌دار ایجاد کرده است. ستونها میانگین درصد تغییرات وزن پلیت±انحراف معیار می‌باشند (n= ۹-۱۲). p< ۰/۰۵ * و p<۰/۰۱** نسبت به گروه کنترل.

اثر تزریق عصاره گیاه زرشک بر میزان درد حاد و مزمن ناشی از تزریق فرمالین: میزان درد مزمن فاز ثانویه ناشی از تزریق فرمالین طی درمان با دوز موثره گیاه زرشک (۳۰۰ mg/kg) به شکل معنی داری کاهش یافته است. میزان کاهش درد مزمن بدنبال تزریق عصاره از مقدار ۰/۱۸±۱/۷۹ در گروه کنترل به ۰/۱±۱/۲۵ در گروه درمان رسید (p<۰/۰۱). عصاره گیاه زرشک در درد حاد و فاز اولیه درد مزمن تاثیری نداشته است (نمودار ۴).



نمودار۴: مقایسه درد حاد و مزمن در گروه های کنترل و درمان با عصاره. فاز دوم درد مزمن بصورت معنی دار توسط تزریق عصاره گیاه کاهش یافته است. (n= ۹-۱۲). p<۰,۰۱ نسبت به گروه کنترل.**

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از آزمایشات با التهاب ایجاد شده توسط فرمالین نشان داد که عصاره گیاه قادر است التهاب ناشی از تزریق فرمالین در کف پای حیوانات را بطور

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.13.1.4.9]

مشخص کاهش دهد. این نتیجه با اطلاعات موجود در طب سنتی ایران که زرشک را بعنوان گیاه ضد التهاب معرفی می‌نماید (۱) همخوانی دارد. همچنین اثر ضد التهابی و ضد دردی زرشک با تحقیقات دیگردر یک راستا است (۵و۴). در یک مطالعه مشاهده شده است که عصاره زرشک قادر است فعالیت ERK و p38 MAPK را که از واسطه های درگیر در التهاب هستند کنترل نماید (۲۰-۱۸و۶). لذا میتوان احتمال داد که مکانیسم اثر عصاره زرشک از طریق این واسطه ها باشد. از طرف دیگر با توجه به اینکه التهاب ناشی از تزریق فرمالین (در فاز التهابی تزریق فرمالین) بیشتر بعلت آزاد شدن واسطه‌های التهابی محیطی می‌باشد (۲۱) و این واسطه‌ها به دنبال فاز اول فرمالین یا فاز حاد که در آن گیرنده‌های درد تحریک می‌شوند آزاد می‌گردد (۲۲) می‌توان چنین استدلال کرد که با توجه به گزارشهای موجود راجع به اثرات ضددردی و ضد التهابی گیاه زرشک (۴)، احتمالاً عصاره گیاه زرشک از طریق مهار آزاد سازی واسطه‌های التهابی محیطی توانسته است میزان التهاب را کاهش دهد. در تایید این مطلب، مهار آزادسازی پروتئین فعال کننده (Activating protein 1, AP1 توسط عصاره گیاه زرشک در مهار سلول های هپاتومای انسانی ذکر شده است (۵). اثر ضد التهابی عصاره الکلی ریشه زرشک و نیز آلکالوئید اصلی آن بربرین در التهاب حاد و مزمن نشان داده شده است (۷).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر پا هم در راستای نتایج آزمایشات التهاب فرمالینی می باشد. بطوری‌که کاهش اندازه قطر پا اگرچه در دوزهای بالای عصاره اتفاق می‌افتد ولی موید تولید کمتر واسطه‌های التهابی در نتیجه تزریق عصاره زرشک بدنبال تزریق فرمالین می‌باشد. از طرفی کاهش معنی‌دار التهاب صفاق نشان دهنده تاثیر بارز عصاره بکار رفته در کاهش پریتونیت حاصل از تزریق اسیداستیک می باشد. با توجه به اینکه در التهاب ناشی از تزریق اسید استیک، اسید با افزایش نفوذپذیری غشاء مویرگی ناحیه صفاق سبب بالا رفتن نفوذپذیری مویرگی می‌گردد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً عصاره گیاه توانسته است از میزان افزایش نفوذپذیری عروقی صفاق بدنبال تزریق اسید استیک به مقدار معنی‌داری بکاهد. با مقایسه داده‌های التهاب فرمالینی و داده‌های مزبور نتیجه گرفته می‌شود که به احتمال زیاد کاهش نفوذپذیری عروقی یکی دیگر از مکانیسم‌هایی باشد که عصاره گیاه زرشک در کاهش میزان التهاب انجام می‌دهد. در مورد التهاب مزمن در ناحیه کشاله ران حیوان، عصاره گیاه زرشک توانسته است این نوع التهاب را به مقدار معنی‌داری کاهش دهد. با توجه به آزاد شدن واسطه‌های التهابی در التهاب بخصوص نوع مزمن (۲۳)

چنین نتیجه گرفته می‌شود که عصاره گیاه به مقدار معنی‌داری از آزاد شدن این واسطه‌ها جلوگیری نموده است. در مورد نتایج بی اثر بودن عصاره گیاه بر التهاب حاد گوش می‌توان گفت با توجه به تاثیر کم عصاره گیاه زرشک در التهاب ناشی از تزریق گزیلن در گوش اگرچه این نوع التهاب از نوع حاد می‌باشد (میزان التهاب حاد در آزمون‌های دیگر این مطالعه کاهش یافته است) اما شاید میزان التهاب ایجاد شده در گوش توسط گزیلن بیش از حد قدرت عصاره برای اعمال اثر بوده است. اگرچه خونرسانی کمتر در ناحیه گوش را هم نمی‌توان از نظر دور داشت. با توجه به نتایج این مطالعه و با مشاهده اثرات ضد التهابی عصاره، احتمال اثر گذاری عصاره بر میزان درد هم به ذهن خطور می کند. تایید این فرضیه با آزمون درد حاد و مزمن فرمالینی صورت پذیرفت. کاهش درد مزمن فرمالینی (اگرچه فقط در انتهای فاز II دیده می شود) نشان از اثر ضد دردی این عصاره دارد. اگرچه اثرات ضد التهابی این گیاه می‌تواند در اثرات ضد دردی آن نقش داشته باشد، نمی‌توان نقش آنالژزیک این گیاه را در تخفیف التهاب از نظر دور داشت. گزارش Fatehi و همکاران حاکی از افزایش خروج پتاسیم از سلولهای ایزوله موش صحرایی در نتیجه تزریق عصاره زرشک است که می‌تواند بیانگر مکانیسم عمل ضد دردی آن باشد (۲۴).

اگرچه در این مطالعه در مورد شناسایی اجزای موثره میوه زرشک آزمونی صورت نگرفته اما حدود ۲۲ آلکالوئید در ریشه، برگ و میوه این گیاه شناسایی شده‌است که در درمان بیماریهای مختلف کاربرد داشته است (۱۲). همچنین مشاهده شده که آلکالوئیدهای گیاه زرشک قادرند ایمنی بواسطه سلولهایT را افزایش دهند (۳). همچنین خاصیت آنتی اکسیدانی و حفاظت سلولی عصاره الکلی ریشه زرشک گزارش شده‌است (۲۵).

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که احتمالا اثرات محرک سیستم ایمنی از جمله پاسخ ضد التهابی این گیاه به واسطه ترکیب موثره این گیاه یعنی آلکالوئید بربرین(Berberine) (۲) به واسطه اثر آنتی‌اکسیدانی آن باشد. در مطالعه ما اثر ضد التهابی میوه زرشک بررسی شد اما گزارش Yesilada نشان می‌دهد که اثرات ضد درد و ضد التهاب و ضد تب توسط ریشه این گیاه ظاهر می‌شود (۴). تحقیق همسو با آزمون ما در مورد اثر میوه زرشک روی سیستم ایمنی مربوط به Tomosaka و همکاران است که خاصیت آنتی اکسیدانی و حفاظت سلولی میوه زرشک را نشان داده‌اند (۱).

در کل داده‌های این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره الکلی گیاه زرشک قادر است درد و التهاب حاد و مزمن را کاهش دهد. با توجه به کاهش میزان پریتونیت و قطر افزایش یافته پای فرمالینی به ترتیب می‌توان به احتمال کاهش نفوذپذیری عروقی و تولید واسطه های درد و التهاب بعنوان مهمترین عوامل تخفیف دهنده التهاب و بدنبال آن درد اشاره کرد. در مورد میزان و مقدار رهایش واسطه‌های التهابی درگیر در روند التهاب و میزان اثر عصاره گیاه بر این واسطه‌ها بایستی تحقیقات تکمیلی (بخصوص ایمونولوژیک) انجام پذیرد. همچنین در مورد مکانسیم بی دردی وابسته به التهاب یا غیر از آن بررسی های جانبی لازم است.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از خانم فریبا انصاری کارشناس بخش عصاره‌گیری گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی شاهد که در تهیه عصاره گیاه زرشک زحمت فراوانی کشیده‌اند قدردانی می‌گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.13.1.4.9]

Effect of Alcoholic Extract of Berberis Vulgaris Fruit on Acute and Chronic Inflammation in Male Rats

Z. Kiasalari (PhD) [1], M. Khalili (PhD) [1*], P. Ahmadi (MD)[2]

1. Department of Physiology, Herbal Medicine and Neuroscience Research Center, Shahed University,Tehran, Iran
2. School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

J Babol Univ Med Sci;13(1);Jan 2011

Received: May 22nd 2010, Revised: Aug 4th 2010, Accepted: Oct 6th 2010.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Inflammation is a side effect of many diseases that could yield immune system disability. The recognized acute and chronic inflammations are the main factors for permanence of infection and long lasting in recovery of disease. Regarding to incomplete treatment of inflammation by using chemical drugs and alkaloid compounds of barberry (berberis vulgaris) root bark such as Berberine that have strong anti-inflammatory property, in the present study, the anti-inflammatory effect of alcoholic extract of berberis vulgaris fruit using experimental methods is examined.

METHODS: In this research as an experimental study, 86 male NMRI rats weighting 300-350 gr were chosen at random, and were divided into five groups: 1-control (only Evans blue), 2-sham (inflamed without treatment) 3, 4 and 5- treatment groups which received the alcoholic extract of barberry at doses of 75, 150 and 300 mg/kg intraperitoneally. Each of groups was subjected to three methods in order to measure the acute inflammation (formalin injection to paw, xylane to ear and intraperitoneally received acetic acid), and one group was examined with chronic inflammation (implantation of cotton in groin border of rats). Finally in a complementary assessment, the analgesic effect of the most effective dose of extract was evaluated using formalin test.

FINDINGS: Effective doses of 150 and 300 mg/kg of berberis vulgaris fruit extract could change significantly the light absorption of inflamed foot, from 0.1±0.03 in control group to 0.15±0.02 and 0.16±0.01 respectively ($p<0.05$). In addition, 300 mg/kg dose of extract, increased the light absorption of peritoneal fluid significantly from 1.43±0.1 in control group relative to 0.7±0.09 in experimental group ($p<0.05$). Chronic inflammation has decreased significantly from 33.4±2.14 in control group relative to experimental groups (20.11±2.27 and 24.15±2.84, respectively) ($p<0.01$, $p<0.05$). Finally, the late phase of chronic pain has decreased significantly by dose of 300 mg/kg from 1.79± 0.18 (control) to 1.25± 0.1 ($p<0.01$).

CONCLUSION: Our result shows that alcoholic extract of barberry in medium and maximum doses is able to decrease the formalin and acetic acid injection-induced inflammation in foot and peritoneum significantly and also can decrease an external body-induced chronic inflammation as well. In addition, the reduction of late phase of chronic pain in parallel with chronic inflammation suppression is considerable.

KEY WORDS: *Inflammation, Pain, Berberis vulgaris fruit, Rat.*

[*]**Corresponding Author;**
Address: Department of Physiology, School of Medicine, Shahed University, Shahid Abdollahzadeh St., Keshavarz Blvd., Tehran, Iran
Tel: +98 21 88964792
E-mail: najafabady@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.13.1.4.9]

References

1. Khorasani A. Treasure of pharmacy. 3rd ed. Tehran, Islamic Revolution Education Publisher 1991; pp:324-5. [in Persian]
2. Pizzorno JE, Murray MT. Text book of natural medicine. 3rd ed. St. Louis, Elsevier 2006; pp: 1, 1014-16.
3. Ivanovska N, Philipov S, Hristova M. Influence of Berberine on T-cell Mediated Immunity. Immunopharmacol Immunotoxicol 1999; 21(4): 771-86.
4. Yesilada E, Kupeli E. Berberis Crataegina DC. Root exhibit potent anti-inflammatory analgesic and febrifuge effects on mice and rats. J Ethnopharmacol 2002;79(2):237-48.
5. Fukuda K, Hibiya Y, Mutoh M, Koshiji M, Akao S, Fujiwara H. Inhibition of activator protein 1 activity by Berberine in human hepatoma cells. Planta Med 1999;65(4):381-3.
6. Cui G, Qin X, Zhang Y, Gong Z, Ge B, Zang YQ. Berberine differentially modulates the activities of ERK, p38 MAPK, and JNK to suppress Th17 and Th1 T cell differentiation in type 1 diabetic mice. J Biol Chem 2009;284(41): 28420-9.
7. Ivanovska N, Philipov S. Study on the anti-inflammatory action of Berberis vulgaris root extract, alkaloid fractions and pure alkaloids. Int J Immunopharmacol 1996;18(10):553-61.
8. Zargari A. Medicinal plants. 2nd ed. Tehran, Tehran University Publication 1991; p: 356. [in Persian]
9. Imanshahidi M, Hosseinzadeh H. Pharmacological and therapeutic effects of Berberis vulgaris and its active constituent, berberine. Phytother Res 2008;22(8):999-1012.
10. Tomosaka H, Chin YW, Salim AA, Keller WJ, Chai H, Kinghorn AD. Antioxidant and cytoprotective compounds from Berberis vulgaris (barberry). Phytother Res 2008; 22(7):979-81.
11. Bashir S, Gilani AH, Siddiqui AA, et al. Berberis vulgaris root bark extract prevents hyperoxaluria induced urolithiasis in rats. Phytother Res 2010;24(8):1250-5.
12. Arayne MS, Sultana N, Bahadur SS. The berberis story: Berberis vulgaris in therapeutics. Pak J Pharm Sci 2007; 20(1):83-92.
13. Noori S, Naderi GA, Hassan ZM, Habib Z, Bathaie SZ, Hashemi SM. Immunosupressive activity of molecule isolated from Artemisia annua on DTH responses compared with cyclosporine A. Int Immunopharmacol 2004;4(10-11):1301-6.
14. Allison AC. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. Immunopharmacology 2000;47(3):63-83.
15. Amanlou M. An anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of hydroalcolic extract of Satureja khuzistanica Jamzad extract. J Pharm Sci 2005;8(1): 102-6.
16. Ramgolam V, Ang SG, Lai YH, Loh CS, Yap HK. Traditional Chinese medicines as immunosuppressive agent. Ann Acad Med Singapore 2000;29:11-6.
17. Gupta M, Mazumder UK, Gomathi P, Thamil Selvan V. Antiinflammatory evaluation of leaves of Plumeria acuminate. Complement Altern Med. 2006;6:36.
18. Obata K, Noguchi K. MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. Life Sci 2004;74(21): 2643-53.
19. Aley KO, Martin A, McMahon T, Mok J, Levine JD, Messing RO. Nociceptor sensitization by extracellular signal-regulated kinases. J Neurosci 2001;21(17):6933-9.
20. Ji RR, Samad TA, Jin SX, Schmoll R, Woolf CJ. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. Neuron 2002;36(1):57-68.
21. Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. Pain 1992;51(1):5-17.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.13.1.4.9]

22. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. Pain 1989;38(3):347-52.
23. Hosseinzadeh H, Ramezani M, Salmani G. Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of Zataria multifera Boiss extract in mice and rat. J Ethnopharmacol 2000;73(3):379-85.
24. Fatehi M, Saleh TM, Fatehi-Hassanabad Z, Farrokhfal K, Jafarzadeh M, Davodi S. A pharmacological study on Berberis vulgaris fruit extract. J Ethnopharmacol 2005;102(1):46-52.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.13.1.4.9]