

اثر ضد درد عصاره برگ گیاه رازک (*Humulus Lupulus*) در موش سوری نر

دکتر بهروز خاکپور طالقانی (PhD)^۱ - سعیده جهان پناه (MSc)^۲ - دکتر محمد رستم پور (PhD)^۳ - دکتر ملک معین انصار (PhD)^۴ - ادریس مهدوی (MSc)^۳

* نویسنده مسئول: گروه بیوشیمی - بیوفیزیک، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

پست الکترونیک: ansar_moiien@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۴/۰۷/۲۲ تاریخ ارسال: ۹۴/۱۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۳

چکیده

مقدمه: گیاهان یکی از مهم‌ترین بن‌مایه‌های دارویی هستند و در پزشکی سنتی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند. با توجه به این‌که بیشتر داروهای ضد درد موجود عوارض جانبی دارند، امروزه یافتن عوامل ضد درد جدید با عوارض کمتر بایسته به نظر می‌رسد.

هدف: ارزیابی اثر ضد درد برگ گیاه رازک (*Humulus lupulus*) بر موش سوری نر با آزمون‌های سنجش درد

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، موش‌های سوری نر نژاد NMRI به ۱۸ گروه ۷ تایی تقسیم شدند: کنترل (سالمین نرمال به صورت تزریق درون صفاقی (i.p.)، کنترل مثبت (مرفین ۲/۵ mg/kg بصورت زیرجلدی)، دریافت‌کننده دوزهای مختلف رازک (۵۰، ۲۵، ۱۰ mg/kg) (i.p.)، LD₅₀ عصاره آبی - الکلی برگ رازک محاسبه شد. سپس، آزمون‌های پس کشیدن دم، فازهای حاد و مزمن فرمالین و رایتینگ (۶ گروه برای هر آزمون) برای ارزیابی درد استفاده شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS ۲۲ مورد واکاوی آماری شد. نتایج با آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و به دنبال آن آزمون تکمیلی Tukey سنجیده شد. $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری انتخاب شد.

نتایج: در آزمون پس کشیدن دم، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های دریافت‌کننده رازک در دوزهای مختلف و گروه کنترل ایجاد نشد. در آزمون فرمالین همه دوزهای رازک نتوانست درد را در هر دو فاز حاد و مزمن در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌دار کاهش دهد ($P < 0.001$). در آزمون رایتینگ نیز تعداد پیچش شکمی موش‌ها در تمامی گروه‌های دریافت‌کننده عصاره رازک نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.001$). در هر سه آزمون، مرفین باعث کاهش معنی‌دار درد شد ($P < 0.001$).

نتیجه‌گیری: تزریق (i.p.) عصاره آبی - الکلی برگ رازک باعث کاهش درد در موش‌های سوری نر می‌شود.

کلید واژه‌ها: تست فرمالین/ درد/ (رازک)/ عصاره گیاه / موش‌ها

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره بیست و پنجم، شماره ۹۹، صفحات: ۱-۹

مقدمه

نزدیک ۶۳۵ میلیارد دلار در سال برای درمان درد مزمن هزینه می‌شود (۵). در ایران مطالعات گسترده‌ای در مورد میزان شیوع درد، انجام نشده است (۶). مطالعه‌ای در ایران در سال ۱۳۹۳ نشان داده که کم‌ر درد بیشترین شیوع درد (۵۱/۶٪) را دارد (۷). گیاهان یکی از مهم‌ترین منابع دارویی هستند و امروزه تعدادی از داروهای مؤثر بر درد از گیاهان بدست می‌آیند. از برتری‌های استفاده از گیاهان دارویی، نزدیک به فایده بودن و دسترسی آسان به آنهاست (۸). رازک (*Humulus lupulus*) یا Hops، یک گیاه پیچک بالارونده وابسته به خانواده شاهدانه (*Cannabaceae*) است که در مناطق معتدل جهان

درد، کارآزمایی چندبعدی با جنبه‌های روانشناسانه، رفتاری و فیزیولوژی است (۱) و یکی از علل عمده رنج، ناتوانی، ناراحتی و از کارافتادگی در جوامع بشری به شمار می‌آید. بنابراین، همیشه بشر در پی یافتن راه حلی برای کاهش یا از بین بردن درد بوده است (۲). برپایه تعریف انجمن بین‌المللی مطالعه درد (IASP)، درد، حس و تجربه عاطفی ناخوشایندی است که با آسیب راستین یا نهفته بافت همراه بوده و نتیجه فرآیندهای پیچیده نوروشیمی در دستگاه عصبی محیطی و مرکزی است (۳). در کشورهای پیشرفته، شیوع درد مزمن از ۱۰/۱ تا ۵۵/۲ درصد گزارش شده است (۴) و در آمریکا

۱. مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۲. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۳. گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۴. دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران ۱

مواد و روش‌ها

جانوران، در این مطالعه تجربی، برای بررسی اثر عصاره برگ رازک بر درد، از ۱۲۶ سر موش سوری نر نژاد NMRI در محدوده وزنی ۴۰-۲۵ گرم استفاده شد. موش‌ها در شرایط استاندارد با درجه حرارت محیطی $22 \pm 2^\circ\text{C}$ و چرخه نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. از غذای استاندارد خوراک دام پارس، برای تغذیه موش‌ها به روش *Ad libitum* استفاده شد. برای سازگاری با محیط جدید، موش‌ها ۳ روز پیش از آزمایش، هر روز ۱۵ دقیقه به محل آزمایش آورده می‌شدند. از هر جانور تنها یک بار استفاده شد و از دستورکار کار با جانوران آزمایشگاهی نوشته شده در جزوه اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی گیلان در همه، آزمون‌ها پیروی شد.

روش تهیه عصاره، برگ‌های رازک، اوایل تابستان از ارتفاع ۵۸ متری سطح دریا در استان گیلان گردآوری و پس از پاک کردن، در سایه و در دمای ۲۴ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد طی ۷ روز خشک شد (شماره هرباریومی ۵۲۳۸ دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد کرج). برگ خشک شده گیاه پودر شد و صد گرم از آن را در ۳۰۰ سی‌سی حلال آبی-الکلی (اتانولی) ۸۰ درصد حل کرده، سپس با دستگاه استخراج سوکسله عصاره‌گیری کردیم. عصاره با آون و در حرارت ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد طی ۳ روز خشک کرده، سپس استفاده شد. **گروه‌های آزمایش**، حیوانات در هر آزمون، به صورت تصادفی به ۶ گروه ۷ تایی زیر بخش شدند: گروه کنترل (گروه دریافت‌کننده سالین نرمال 10 ml/kg به صورت درون صفاقی (i.p.) و ۳۰ دقیقه پیش از آزمون)، گروه‌های دریافت‌کننده دوزهای مختلف رازک ($25, 10\text{ mg/kg}$ ، $100, 50$)، به صورت i.p. و ۳۰ دقیقه پیش از آزمون) و گروه کنترل مثبت (دریافت‌کننده مرفین $2/5\text{ mg/kg}$ (تهیه شده از شرکت تماد، ایران) به صورت زیر جلدی و ۱۵ دقیقه پیش از آزمون)

آزمون پس‌کشیدن دم، آزمایش با دستگاه Tail flick، مدل TF-5500 ساخت شرکت برج صنعت ایران انجام شد. نور متمرکز شعاعی به سطح کوچکی از انتهای دم (۱ تا ۲ سانتی‌متری انتهایی) تابانده شده و زمان رفلکس پس‌کشیدن

می‌روید (۹-۱۱). گل‌آذین جنس ماده این گیاه به دلیل کاربرد فراوان در طب سنتی، مورد توجه ویژه محققین قرار گرفته و گزارش شده که آثار ضدالتهابی و خواب‌آوری دارد (۱۱). مطالعه بر بخش‌های گوناگون گیاه رازک منجر به شناسایی بیش از ۱۰۰۰ ماده شیمیایی دربردارنده روغن‌های فرار، آلفا و بتااسیدها و فلاونونوئیدها و پلی‌فنول‌های پرنیله، اجزای دارویی مانند برگرفته‌های فلاون‌ها، کالکون‌ها، فلوروگلوکوسینول و مولکول‌های کوچک مانند هومولون‌ها، لوپولون‌ها، ایزوهومولون‌ها و زاتوهومول‌شد (۱۵-۱۱). رازک ویژگی شبه استروژنی، اثر اشتها‌آور، آنتی‌اکسیدان، ضد میکروب، ضد سرطان، ضد قارچ، ضد افزون کردن و ضد HIV دارد (۱۱، ۱۲، ۱۵). همچنین، می‌توان به آثار ضد مخروط گیاه (۱۶)، خواب‌آوری (۱۷)، افزایش حجم شیره معده (۱۸)، کاهش مقاومت انسولین (۱۹) و اثر ضدالتهابی (۲۰) آن اشاره کرد. امکان دارد اثر ضددردی عصاره مخروط رازک از راه سیستم ضد درد اپیوئیدی باشد. (۱۲)

روش معمول کنترل فارماکولوژی درد، استفاده از داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی (NSAIDs)، اپیوئیدها و نیز داروهای کمکی همراه مانند ضدافسردگی‌ها (۲۱ و ۲۲) و کورتیکواستروئیدهاست (۲۳). استفاده از این داروها به دلیل دارا بودن عوارض جانبی جدی مانند اختلال دستگاه گوارش، آسیب کلیه، درنگ تنفسی، تهوع، کاهش هوشیاری، بی‌بوست و همچنین، تحمل نسبت به دارو (Drug Tolerance)، با محدودیت همراه است (۲۴ و ۲۵). بنابراین، امروزه یافتن عوامل ضد درد جدید با اثرات جانبی کمتر، بویژه استفاده از داروهای گیاهی امری ضروری و رایج به نظر می‌رسد (۲۶). تا آنجا که مطالعات ما نشان می‌دهد، تنها سه مطالعه بر اثر ضددردی رازک انجام شده که آن نیز تنها منحصر به مخروط این گیاه بوده‌اند (۱۲، ۲۷ و ۲۸). با توجه به اینکه ماده کافئیک اسید تنها در برگ این گیاه یافت می‌شود (۲۹) و اثر ضد درد دارد (۳۰)؛ همچنین، در هیچ یک از مطالعات نامبرده، اثر ضد درد برگ رازک بررسی نشده، بر آن شدیم تا اثر ضد درد برگ این گیاه را ارزیابی کنیم.

سپس میزان مرگومیر حیوانات، به مدت ۴۸ ساعت پس از تزریق عصاره ارزیابی و LD₅₀ به روش آنالیز Log dose-probit تعیین شد.

آنالیز آماری

نرمال بودن داده‌ها با آزمون Kolmogorov Smirnov ارزیابی شد. نتایج کمی به صورت Mean ± SEM گزارش شد. برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و به دنبال آن از تست تکمیلی Tukey استفاده شد. همه داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ واکاوی شد. $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری انتخاب شد.

نتایج

آزمون پس کشیدن دم، درصد MPE هیچ کدام از دوزهای مصرفی عصاره برگ رازک (۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg)، در زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق، در مقایسه با گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری ایجاد نکرد و عصاره گیاه در این آزمون سبب کاهش درد نشد. مرفین (۲/۵ mg/kg) به عنوان کنترل مثبت باعث افزایش درصد MPE و دیرکرد رفلکس پس کشیدن دم شد که در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود ($P < 0.001$) (جدول ۱).

آزمون فرمالین، تزریق درون صفاقی عصاره برگ رازک در همه دوزهای مصرفی (۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg) در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری در هر دو فاز آزمون فرمالین ایجاد کرد ($P < 0.001$) و زمان سپری شده برای لیسیدن و گاز گرفتن پای تزریق شده را کاهش داد. مرفین ۲/۵ mg/kg توانست درد را در هر دو فاز حاد و مزمن کاهش دهد. شکل ۱ اثر ضد دردی عصاره آبی الکلی برگ رازک را بر آزمون فرمالین نشان می‌دهد. دوز ۱۰ mg/kg عصاره، نخستین دوزی بود که توانست درد را در هر دو فاز حاد و مزمن کاهش دهد و از نظر توان اثر ضد دردی، مشابه اثر دوز ۲/۵ mg/kg مورفین (ضد درد استاندارد) بود.

دم اندازه‌گیری شد. شدت محرک حرارتی، برای ایجاد دیرکرد ۴-۲ ثانیه‌ای تنظیم شد. برای پیشگیری از آسیب بافتی در پی بی‌دردی، cut off time (بیشینه زمان تابش نور) ۱۰ ثانیه در نظر گرفته شد (۳۱). این آزمون دو بار به فاصله ۵ دقیقه انجام و میانگین زمانی آن به عنوان زمان پیش از مصرف دارو (T₀) تعیین شد. ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق عصاره، رفلکس پس کشیدن دم دوباره اندازه‌گیری شد. میزان بی‌دردی بر اساس درصد (Maximum Possible Effect) MPE برای زمان‌های یاد شده برپایه رابطه زیر محاسبه شد.

$$\%MPE = [(T_1 - T_0) / (T_2 - T_0)] \times 100$$

T₀ = زمان پیش از مصرف دارو

T₁ = زمان پس از مصرف دارو

T₂ = cut off time

آزمون فرمالین: درد با تزریق ۲۰ میکرولیتر فرمالین ۱٪ به صورت S.C. به کف پای چپ موش ایجاد شد. نرمال سالین، دوزهای مختلف رازک و مرفین پیش از آزمون تزریق شدند. سپس، هر موش در قفس پلکسی گلاس قرار داده شد و مدت لیسیدن یا گاز گرفتن پای تزریق شده، به عنوان شاخص پاسخ درد، در فواصل زمانی ۵ دقیقه و به مدت ۳۰ دقیقه ثبت شد. پس از تزریق فرمالین، دو فاز درد ایجاد می‌شود: فاز اول (حاد یا نوروزنیک)، ۵ دقیقه اول پس از تزریق فرمالین و فاز دوم (مزمن یا التهابی) که فاصله بین ۳۰-۱۵ دقیقه پس از تزریق است (۲۵).

آزمون رایتینگ: تک دوز ۱۰ ml/kg استیک اسید گلاسیال ۰/۶ درصد به صورت i.p. به موش تزریق شد. نرمال سالین، عصاره برگ رازک در دوزهای مختلف و مرفین پیش از آزمون تزریق شد. تعداد کشش (گرفتگی) شکمی حیوانات بی‌درنگ پس از تزریق اسید استیک در فواصل ۵ دقیقه‌ای به مدت ۳۰ دقیقه شمارش و گردایش آنها محاسبه شد (۳۲).

مطالعه سمیت حاد

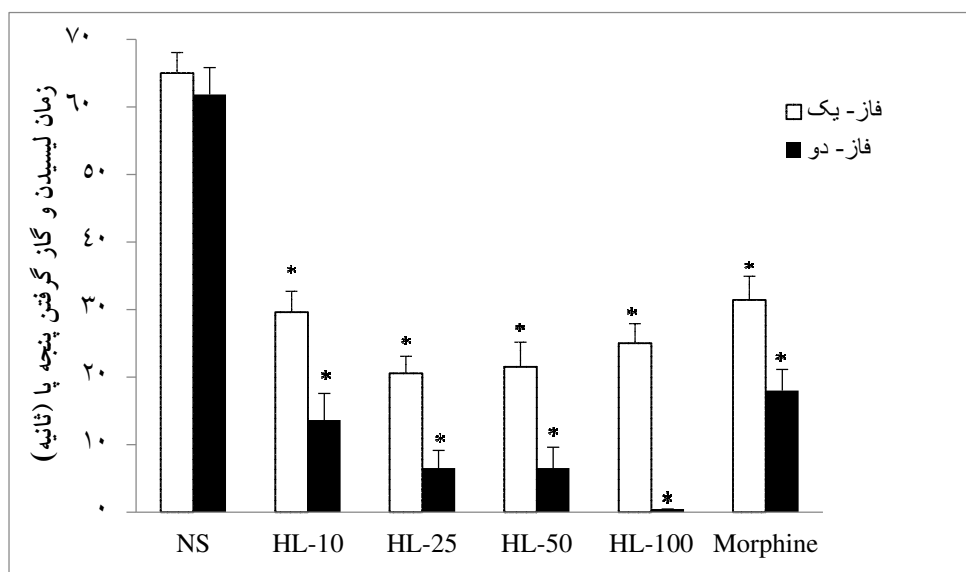
سمی بودن حاد در موش‌های سوری، به روش i.p. بررسی شد. دوزهای مختلف عصاره آبی-الکلی رازک (۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۳۰۰ mg/kg) به صورت درون صفاقی تزریق و

جدول ۱. اثر عصاره برگ رازک (i.p.) و مرفین (s.c.) بر آزمون پس کشیدن دم در موش سوری نر

گروه‌ها (ml/kg)	%MPE		
	۱۲۰ دقیقه	۶۰ دقیقه	۳۰ دقیقه
نرمال سالین (۱۰)	۴/۸۵±۱/۹۹	۴/۴۴±۱/۳۳	۵/۸۹±۲/۰۱
رازک (۱۰)	۵/۴۷±۱/۵۷	۶/۶۶±۱/۴۲	۵/۷۲±۱/۶۷
رازک (۲۵)	۸/۸۵±۱/۵۷	۴/۷۹±۱/۶۵	۳/۶۷±۱/۱۱
رازک (۵۰)	۹/۱۴±۰/۸۰	۸/۴۶±۱/۴۷	۱۰/۳۴±۲/۳۳
رازک (۱۰۰)	۱۰/۶۰±۱/۷۹	۸/۹۸±۲/۲۷	۷/۸۵±۲/۱۰
مرفین (۲/۵)	۷/۵۷±۵/۹۶*	۵/۱/۳۷±۵/۶۴*	۳۹/۷۸±۳/۶۲*

%MPE (Percent of Maximum Possible Effect) درصد حداکثر اثر احتمالی عصاره برگ رازک بر درد در آزمون پس کشیدن دم ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق. تمامی داده‌ها بصورت Mean ± SEM گزارش شده‌اند. (n=۷)

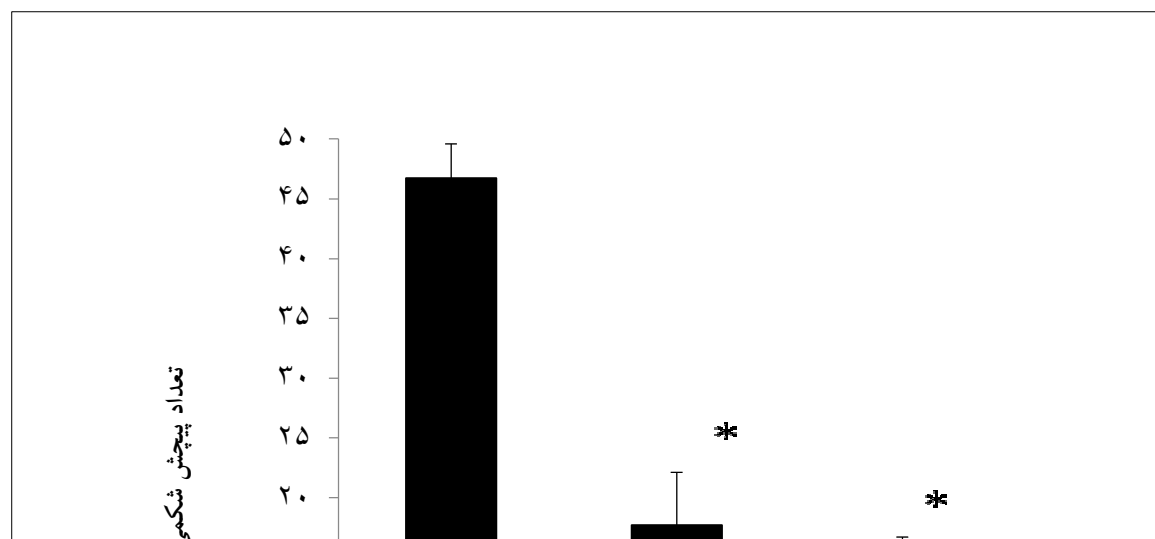
* P < ۰/۰۰۱ در مقایسه با نرمال سالین.



شکل ۱. اثر عصاره برگ رازک (i.p.) و مرفین (s.c.) بر درد در آزمون فرمالین در موش سوری نر. تزریق فرمالین، ۳۰ دقیقه بعد از تزریق دوزهای مختلف رازک و نرمال سالین انجام گرفت. مدت زمان لیسیدن و گاز گرفتن پای هر موش در فازهای اول (حاد) و دوم (مزمن)، اندازه‌گیری شد. تمامی داده‌ها به صورت Mean ± SEM گزارش شده‌اند. (نرمال سالین = NS، رازک = HL) (n=۷). * P < ۰/۰۰۱ در مقایسه با نرمال سالین.

سمیت حاد، LD₅₀ این عصاره در تزریق درون صفاقی، ۹۰۲ mg/kg تعیین گردید. با توجه به اینکه بالاترین دوز مصرفی در این مطالعه ۱۱٪ مقدار LD₅₀ عصاره برگ رازک بود، بنابراین تمامی دوزهای مصرفی در این مطالعه را می‌توان بی‌خطر فرض نمود.

آزمون رایتینگ، شکل ۲ اثر ضد دردی عصاره آبی-الکلی برگ رازک بر کشش بدن و پیچش شکمی ناشی از اسید استیک ۰/۶٪ را نشان می‌دهد. در این آزمون، عصاره رازک در تمامی دوزهای تزریق شده (۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ mg/kg)، تعداد کشش پاهای عقبی و انقباضات شکمی ناشی از اسید استیک را در مقایسه با گروه کنترل (P < ۰/۰۰۱) و مرفین درد ناشی از اسید استیک را به‌طور معنی‌داری کاهش داد.



شکل ۲. اثر عصاره رازک (i.p.) و مرفین (s.c.) بر درد در آزمون رایتینگ در موش سوری نر. تزریق اسید استیک ۳۰ دقیقه بعد از تزریق دوزهای مختلف رازک و نرمال سالین انجام گرفت. تعداد پیچش و کشش ناشی از اسید استیک در هر موش، به مدت ۳۰ دقیقه اندازه گیری شد. تمامی داده‌ها به صورت Mean \pm SEM گزارش شده‌اند. (n=۷)، (نرمال سالین = NS، رازک = HL) * P < ۰/۰۰۱ در مقایسه با نرمال سالین

از گیاه برای عصاره‌گیری اشاره نشده و همچنین غلظت‌های بالاتر این عصاره بررسی نشده‌است، مقایسه ریزینانه با نتایج ما امکان‌پذیر نیست. اما شاید این ناهمسانی به دلیل تفاوت در نوع عصاره مصرفی باشد که در مطالعه حجازیان از نوع آبی و در این مطالعه آبی-الکلی بوده‌است.

اثر ضددردی عصاره این گیاه در هر دو فاز آزمون فرمالین، ممکن است به دلیل وجود ترکیب گیاهی باشد که می‌تواند درد را هم از راه محیطی و هم مرکزی (با اثر بر فیبرهای آوران اولیه) کاهش دهد. از این عوامل در رازک، فلاونونوئیدها هستند که ویژگیان ضد درد و ضد التهاب دارند. این ترکیب‌های پلی‌فنل طبیعی، از سد خونی- مغزی عبور می‌کنند و به واسطه مکانیسم‌های مختلف از جمله اپیوئیدی، α_2 -آدرنرژیک و مهارگیرنده‌های $GABA_A$ ، انتقال درد را در مسیر مرکزی کنترل می‌کنند. فلاونونوئیدها می‌توانند با مهار سیکلوآکسیژناز در بافت ملتهب، بازدارنده تشکیل پروستاگلاندین‌ها شده و موجب پیشگیری از انگیزش گیرنده‌های درد در مسیر محیطی شوند (۳۵). از عوامل دیگر می‌توان به اسید کافئیک اشاره کرد که خاصیت ضد درد داشته و آثار ضد درد خود را هم از راه مکانیسم‌های محیطی و هم مرکزی انجام می‌دهد. این ماده تنها در برگ گیاه رازک یافت می‌شود و مکانیسم عمل آن می‌تواند چه بسا مربوط به آبشار

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه برای نخستین بار اثر ضددردی عصاره آبی-الکلی برگ گیاه رازک بررسی شد. یافته‌های، نشان داد که تزریق درون صفاقی عصاره برگ در هر دو فاز آزمون فرمالین و همچنین آزمون رایتینگ اثر ضددردی دارد ولی در آزمون پس کشیدن دم بی‌تأثیر است.

آزمون فرمالین دو فاز مشخص حاد و مزمن درد دارد. به درد فاز اول، درد غیرالتهابی نیز گفته می‌شود که با انگیزش مستقیم گیرنده‌های محیطی درد همراه است و فیبرهای آوران نخست را فعال می‌کند. درد فاز دوم یا درد التهابی، با التهاب موضعی و رهایی میانجی‌های التهابی مانند برادی کینین، هیستامین، ماده P، پروستاگلاندین، سروتونین و نیز حساس شدن مرکزی باز شناخته می‌شود. این آزمون نه تنها روش مناسبی برای سنجش اثر ضددردی مواد و داروها محسوب می‌شود، بلکه در مشخص شدن سازوکار آثار ضد درد آنها نیز سودمند است (۳۳ و ۳۴). در این مطالعه تزریق i.p. عصاره برگ رازک، در هر دو فاز آزمون فرمالین موجب کاهش معنی‌دار درد شد. حجازیان و مهدوی گزارش کرده‌اند که تزریق i.p. عصاره آبی رازک در دوز ۸ mg/kg، بر فاز حاد ناشی از فرمالین بی‌تأثیر است ولی در فاز مزمن، موجب بی‌دردی می‌شود (۲۸). با توجه به این‌که در مطالعه بالا، به بخش استفاده شده

اثر ضد درد عصاره رازک در آزمون رایتینگ تا حدودی ناشی از مواد استروژنی موجود در آن باشد. لازم به یادآوری است که مطالعه‌ای بر تزریق *i.p.* رازک در آزمون رایتینگ صورت نگرفته است، اما در یک مطالعه نشان داده شده که تجویز دهانی عصاره مخروط رازک، موجب بی‌دردی در آزمون رایتینگ می‌شود (۱۲).

در آزمون پس کشیدن دم، تزریق *i.p.* دوزهای مختلف عصاره برگ رازک تأثیری بر آستانه درد نداشت. به طور اساسی آزمون پس کشیدن دم، برای اندازه‌گیری کیفی درد و ارزیابی فعالیت ضد درد در حیوانات آزمایشگاهی بکار می‌رود که در آن پاسخ به استرس گرمایی وارد شده به دم بررسی می‌شود (۴۲). نشان داده شده که آزمون پس کشیدن دم، مکانیسم‌های نخاعی را درگیر می‌کند (۴۳). چون عصاره برگ رازک بر آستانه درد در این آزمون بی‌تأثیر بود، به نظر می‌رسد تأثیر عصاره با مکانیسم‌های نخاعی صورت نگرفته است. با توجه به نقش فیبرهای آوران اولیه در آزمون پس کشیدن دم و نیز فاز اول آزمون فرمالین و در نظر گرفتن این‌که در این مطالعه، عصاره برگ رازک بر آزمون پس کشیدن دم بی‌تأثیر بود اما توانست درد را در فاز اول فرمالین کاهش دهد، دور از چشمداشت نیست که اثر ضد درد رازک با بستن مسیرهای درد محیطی و بدون دخالت ساز و کارهای مرکزی اعمال شود.

توانایی عصاره رازک در مهار درد در هر دو فاز آزمون فرمالین و کاهش پیچش شکمی ناشی از استیک اسید تأییدکننده اثر ضد درد عصاره برگ گیاه رازک است. با توجه به آن‌که داروهای ضد درد اپیوئیدی و ضد التهاب غیراستروئیدی عوارض جانبی دارند و همچنین رازک مورد پذیرش پزشکی سستی بوده و مصرف مقادیر کم آن در انسان ایجاد سمیت نمی‌کند (۱۰)؛ بنابراین، رازک با داشتن اثرات ضد درد شاید بتواند جایگزین احتمالی برای داروهای شیمیایی باشد.

این مقاله در برگرفته از یک پایان‌نامه در دانشگاه علوم پزشکی گیلان می‌باشد. نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

لیپوآکسیژناز، سیکلوآکسیژناز یا گیرنده‌های اپیوئیدی باشد (۲۹). بنابراین، می‌توان پیشنهاد کرد که بخشی از اثرات ضد درد عصاره برگ رازک احتمالاً با کاهش تحریک‌پذیری اعصاب حسی، مهار مستقیم گیرنده‌های درد در محیط یا مهار رهایش نوروپپتیدهای پیش‌التهابی صورت گیرد.

در این مطالعه، تزریق عصاره رازک توانست تعداد پیچش شکمی ناشی از اسید استیک را در آزمون رایتینگ به صورت معنی‌دار کاهش دهد. آزمون رایتینگ یک الگوی درد احشایی است که حساسیت (*sensitivity*) بسیار بالا ولی ویژگی (*specificity*) پایین دارد (۳۶) و پیشنهاد می‌شود که آزمون فرمالین برای تکمیل آن استفاده شود. اسید استیک تزریق شده به حفره صفاقی می‌تواند منجر به افزایش فرآورده‌های سیکلوآکسیژناز و لیپوآکسیژناز شود و نیز رهایی میانجی‌های التهابی دیگر مثل ماده *P*، سروتونین، هیستامین، برادی‌کینین، *IL-1β*، *IL-8*، *TNF-α* را نیرو بخشد و با القای نفوذپذیری مویرگ، درد التهابی ایجاد کند (۳۷ و ۲). با توجه به این‌که تزریق *i.p.* رازک توانست تعداد پیچش شکمی حیوان را به طور معنی‌داری کاهش دهد، می‌توان گفت که مکانیسم عمل رازک احتمالاً به واسطه مهار سیکلوآکسیژناز، لیپوآکسیژناز و سنتز میانجی‌های التهابی مثل پروستاگلاندین‌ها و سایر مواد درون‌زا در بافت‌های محیطی باشد. فلاونوئیدهای مختلف، گلیکوزیدها و آگلیکون‌ها در رازک وجود دارند (۳۸) و نشان داده شده که این ترکیب‌ها اثرات نهفته ضد التهابی و ضد درد دارند (۳۵). همچنین، همان‌طور که گفته شد کافئیک اسید موجود در برگ رازک خواص ضد درد دارد که این کار با اثر برگ‌گیرنده‌های اپیوئیدی صورت می‌گیرد. نشان داده شده که تحریک گیرنده‌های اپیوئیدی محیطی بر پایانه حسی عصب، رهایی نوروپپتیدهایی مانند ماده *P* را کاهش می‌دهد (۳۹). بنابراین، ممکن است اسید کافئیک با اثر بر گیرنده‌های اپیوئیدی و در نتیجه کاهش رهایی ماده *P* بتواند بخشی از اثرات ضد درد خود را در این آزمون نشان دهد. از سوی دیگر عصاره رازک دارای ماده *۸- فنیل نارینجین* است که اثر استروژنی دارد (۴۰). با توجه به این‌که استروژن در مهار سیکلوآکسیژناز نقش دارد (۴۱)، ممکن است

- Hampton T. Pain and the Brain: Researchers Focus on Tackling Pain Memories. JAMA (The Journal of the American Medical Association) 2005;293(23):2845-6.
- Bahmani M, Shirzad H, Majlesi M, Shahinfard N, Rafieian-kopaei. A review study on analgesic application of iranian medicinal plants. Asian Pac J Med 2014;7(1):S43-S53.
- Steed CE. The anatomy and physiology of pain. Basic sci 2009;27(12):507-11.
- Clay FJ, Watson WL, Newstead SV, McClure RJ. A systematic review of early prognostic factors for persisting pain following acute orthopedic trauma. Pain Res Manag 2012;17(1):35-44.
- Gatchel RJ, McGeary DD, McGeary CA, Lippe B. Interdisciplinary chronic pain management: past, present, and future. Am Psychol 2014;69(2):119-30.
- Asghari moghadam MA, Karami B, Rezaei S. Prevalence of pain in a lifetime, chronic pain continuously and some of the features associated with it. J Psychology 2002; 6(1): 30-51.[Text in persian]
- Azizpour Y, Hemmati F, Sayehmiri K. Prevalence of one-year back pain in Iran: a systematic review and metaanalysis. Iran Occupational Health 2014; 11(1):1-12. [Text in persian]
- Singh E, Sharma S, Dwivedi J, Sharma S. Diversified potentials of *Ocimum sanctum* Linn (Tulsi): An exhaustive survey. J Nat Prod Plant Resour 2012;2(1):39-48.
- Spinella M. The Psychopharmacology of Herbal Medicine : Plant Drugs That Alter Mind, Brain, and Behavior 2001.
- Koetter U, Biendl M. Hops (*Humulus lupulus*): A Review of its Historic and Medicinal Uses. Herbal Gram 2010; (87):44-57.
- Zanoli P, Zavatti M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. J Ethnopharmacol 2008;116(3):383-96.
- Park SH, Sim YB, Kang YJ, Kim SS, Kim CH, Kim SJ, et al. Hop Extract Produces Antinociception by Acting on Opioid System in Mice. Korean J Physiol Pharmacol 2012;16(3):187-92.
- Čeh B, Kač M, Košir IJ, Abram V. Relationships between Xanthohumol and Polyphenol Content in Hop Leaves and Hop Cones with Regard to Water Supply and Cultivar. Int J Mol Sci 2007;8(9):989-1000.
- Gatica-Arias A, Farag MA, Stanke M, Matoušek J, Wessjohann L, Weber G. Flavonoid production in transgenic hop (*Humulus lupulus* L.) altered by PAP1/MYB75 from *Arabidopsis thaliana* L. Plant Cell Rep 2012 ;31 (1):111-9.
- Yamaguchi N, Satoh-Yamaguchi K, Ono M. In vitro evaluation of antibacterial, anticollagenase, and antioxidant activities of hop components (*Humulus lupulus*) addressing acne vulgaris. Phytomedicine 2009;16(4):369-76.
- Negri G, di Santi D, Tabach R. Bitter acids from hydroethanolic extracts of *Humulus lupulus* L., Cannabaceae, used as anxiolytic. Brazilian J Pharmacognosy 2010;20(6):850-9.
- Schiller H, Forster A, Vonhoff C, Hegger M, Biller A, Winterhoff H. Sedating effects of *Humulus lupulus* L. extract Phytomedicine 2006;13(8):535-41.
- Kurasawa T, Chikaraishi Y, Naito A, Toyoda Y, Notsu Y. Effect of *Humulus lupulus* on Gastric Secretion in a Rat Pylorus-Ligated Model. Biol Pharm Bull 2005;28(2):353-7.
- Yajima H, Ikeshima E, Shiraki M, Kanaya T, Fujiwara D, Odai H, et al. Isohumulones, bitter acids derived from hops, activate both peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma and reduce insulin resistance. J Biol Chem 2004;279(32):33456-62.
- Konda VR DA, Darland G, Bland JS and Tripp ML. Rho iso-alpha acids from hops inhibit the GSK-3/NF-κB pathway and reduce inflammatory markers associated with bone and cartilage degradation. J Inflamm (Lond) 2009;6(26):doi: 10.1186/476-9255-6-26.
- Duncan B. The problem of pain: relief without opiates? Pain management. Of Substance : The National Magazine on Alcohol, Tobacco and Other Drugs 2012; 10(3):10-3.
- Lussier D, Huskey AG, Portenoy RK. Adjuvant Analgesics in Cancer Pain Management. Oncologist 2004;9(5):571-91.
- Sreekeesoon DP, Mahomoodally MF. Ethnopharmacological analysis of medicinal plants and animals used in the treatment and management of pain in Mauritius. J Ethnopharmacol 2014;157:181-200.
- Stein Ch, Clark JD, Oh U, Vasko MR, Wilcox GL, Overland AC, et al. Peripheral Mechanisms of Pain and Analgesia. Brain Res Rev 2009;60(1):90-113.
- Farshchi A, Ghiasi G, MalekKhatabi P. Antinociceptive Effect of Promethazine in Mice. Iran J Basic Med Sci 2009;12(3-4):140-5.
- Nouri MHK, Namvaran A. Antinociceptive effect of *Matricaria chamomilla* on vincristine-induced peripheral neuropathy in mice. African J Pharm Pharmacol 2012;6(1):24-9.
- Hejazian SH. Evaluate the analgesic opiate receptors of hops (*Humulus lupulus* L.) extract in mice. Iranian J Med Aroma Plant 2007;23(2): 166-73
- Hejazian SH, Mahdavi SM. Comparison Between the Analgesic Effect of *Humulus Lupulus* (Hops) Extract and Morphine in Mice. J Rafsanjan UNIMED SCI 2006; 5(4): 273-8. [Text in persian]
- Abram V CB, Vidmar M, Hercezi M, Lazi C N, Valentina Bucika SSMz, Iztok J. Košir B, Milica Kač CA Lea Demšara NsPU. A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop

- leaves and hop cones. *Indust Crop Prod* 2015;64:124-34.
30. Gamaro GD, Suyenaga E, Borsoi M, Lermen J, Pereira P, Ardenghi P. Effect of Rosmarinic and Caffeic Acids on Inflammatory and Nociception Process in Rats. *ISRN Pharmacol* 2011 ; 2011(1):1-6.
31. Keyhanfar F, Shamsi Meymandi M, Sepehri Gh, Rastegaryanzadeh R, Heravi G. Evaluation of Antinociceptive Effect of Pregabalin in Mice and its Combination with Tramadol using Tail Flick Test. *IJPR* 2013;12(3):483-93.
32. Le Bars D, Gozariu M, Caden SW. Animal model of nociception. *Pharmacol Rev* 2001;53(4):5.652-97.
33. Lino CS, Gomes PB, Lucetti DL, Diógenes JP, Sousa FC, Silva MG, et al. Evaluation of Antinociceptive and Antiinflammatory Activities of the Essential Oil (EO) of *Ocimum micranthum* Willd. from Northeastern Brazil. *Phytother Res* 2005;19(8):708-12.
34. Lima Saraiva S, Costa Saraiva HC, Cabral Silva J, de Lima JT, de Siqueira-Filho JA, Fonseca Damasceno PK, et al. Antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae) in mice. *J Med Plant Res* 2012;6(40):5330-6.
35. Pourmotabbed A, Farshchi A, Ghiasi G, Malek Khatabi P. Analgesic and Anti-inflammatory Activity of *Teucrium chamaedrys* Leaves Aqueous Extract in Male Rats. *Iran J Basic Med Sci* 2010;13(3):119-25.
36. Kataria S, Shrivastava B, Kaur D, Sharma P. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Crotalaria burhia* Buch.-Ham. whole plant. *Indian J Nat Prod Resour* 2012; 3(2):189-96.
37. Hamid RA, Foong CP, Ahmad Z, Hussain MK. Antinociceptive and anti-ulcerogenic activities of the ethanolic extract of *Annona muricata* leaf. *Rev bras farmacogn* 2012 ; 22(3):630-41.
38. Shishegar R, Rezaie A, Nazeri M. Study of Sedation, Pre-Anesthetic and Anti-Anxiety Effect of Hop (*Humulus lupulus* L.) Extract Compared with diazepam in Rats. *J Anim Vet Adv* 2012; 11(14): 25.
39. Sawynok J. Topical and Peripherally Acting Analgesics. *Pharmacol Rev* 2003;55(1):1-20.
40. Chadwick LR, Pauli GF, Farnsworth NR. The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (Hops) with an emphasis on estrogenic properties. *Phytomedicine* 2006;13(1-2):1.
41. Geary GG, Krause DN, Duckles SP. Estrogen reduces mouse cerebral artery tone through endothelial NOS and cyclooxygenase- dependent mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279(2):511-9.
42. Kiron SS NK, Rajagopal PL , Saritha M , Narayaswamy VB. Analgesic activity study *Polygonom glabrum* wild in rodents. *RJPBCS* 2012 ;3 (3):1157-64.
43. Lopes SC, Silva AV, Arruda BR, Morais TC, Rios JB, Trevisan MT, et al. Peripheral antinociceptive action of mangiferin in mouse models of experimental pain: Role of endogenous opioids, KATP-channels and adenosine. *Pharmacol Biochem Behav* 2013;110(2013):19-26 .

The Antinociceptive Effect of Humulus Lupulus Leaf Extract in Male Rats

Khakpour Taleghani B (PhD)^{1,2}- Jahan panah S (MSc)² - Rostampour M (PhD)^{1,2} - *Ansar M M (PhD)^{1,3} - Mahdavi E (MSc)⁴

*Corresponding Address: Department of Biochemistry-Biophysics, Guilan University of medical Sciences, Rasht, Iran.

Email: ansar_moien@yahoo.com

Received: 14/Oct/2015 Revised: 01/Feb/2015 Accepted: 02/Feb/2016

Abstract

Introduction: Plants are one of the most important sources of medicines and have been considered by traditional medicine researchers. Most pain medications have side effects, nowadays, and it seems essential to find new analgesics with limited side effects.

Objective: The aim of this study was to evaluate the analgesic effect of Humulus lupulus (hops) leaf on pain in rats.

Materials and Methods: In this experimental study, male NMRI rats were divided into 18 groups, 7 in each: control (saline i.p. injection), positive control (morphine 2.5 mg.kg, s.c.), and hops extract groups (10, 25, 50 & 100 mg.kg, i.p.). LD50 of hops leaf hydro-alcoholic extract was calculated. Then, Tail flick, acute and chronic phases of formalin and writhing tests (6 groups each test) were used to assess pain. The results were analyzed using one-way ANOVA, followed by post hoc Tukey test. P<0.05 was chosen as the significance level.

Results: In the tail flick test, there was no difference between hops extract groups and controls. In the formalin test, pain was reduced in both acute and chronic phases by the extract (10, 25, 50 & 100 mg.kg) significantly (P<0.001). In writhing test, the extract reduced the number of abdominal contractions in comparison with control group significantly (P<0.001). Pain was significantly reduced by morphine in all tests (P<0.001).

Conclusion: Our results showed the antinociceptive effect of hops leaf Hydro-alcoholic extract after i.p. injection.

Conflict of interest: none declared

Key words: Formalin test\ (Humulus lupulus)\ Mice\ Pain\ Plant Extract

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 99, Pages: 1-9

Please cite this article as: Khakpour Taleghani B, Jahan panah S, Rostampour M, Ansar M M, Mahdavi E. The Antinociceptive Effect of Humulus Lupulus Leaf Extract in Male Rats. J of Guilan Univ of Med Sci 2016; 25(99):1-9. [Text in Persian]

1. Neuroscience research centre, School of Medicine, Guilan University of medical Sciences, Rasht, Iran
2. Department of physiology, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.
3. Department of Biochemistry, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.
4. Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Iran Rasht, Iran