www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 67, No.5, P: 1400-1415
Sep-Nov2024

مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۶۷، شماره ۵
آذر-دی ۱۴۰۳، صفحه ۱۴۱۵-۱۴۰۰

مقاله اصلی

بررسی اثرات ضد دردی عصاره هیدروالکلی گیاه مورینگا (*Moringa oleifera*) در موش صحرایی نر

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۰۹- تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۳۰

حمیده خواجه [۱]
صالحه گنجعلی [۲]
مهین ریگی [۳]
لیلا قفقازی [۴]
ایوب مزارعی [۵*]

[۱] کارشناس ارشد پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل، ایران
[۲] استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل، ایران
[۳] گروه علوم آبزیان، پژوهشکده تالاب بین المللی هامون، پژوهشگاه زابل، ایران
[۴] دانش اموخته تولید محصولات گلخانه‌ای گروه علوم باغبانی، ایران، دبیر دبیرستان فرزانگاه زینب (س)، مدیریت آموزش و پرورش زابل، ایران
[۵] دانش اموخته دکتری بیوتکنولوژی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل، ایران

Email: mazaraie70@gmail.com

خلاصه

مقدمه: عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای صناعی ضد درد در کاربرد بالینی و استقبال روز افزون بیماران از طب سنتی و محصولات طبیعی منجر به جلب توجه محققان به بررسی و مطالعه اثرات داروهای ضد درد طبیعی ومقایسه انها با داروهای سنتیک و شیمیایی شده است؛ .لذا هدف از این مطالعه بررسی برخی ترکیبات شمیمایی و اثر ضد دردی عصاره گیاه مورینگا در موش صحرایی نر می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی از ۳۶ سر موش صحرایی نر در ۶ گروه شامل: کنترل، گروه‌های تیمار شده با عصاره (به ترتیب به ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ mg/Kg)، مرفین (۱ mg/Kg) و نالوکسان ۱ mg/Kg به همراه دوز ۳۰۰ mg/Kg عصاره استفاده شد. محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کل به ترتیب با روش‌های معرف فولین-سیوکالتیو و رنگ سنجی کلرید آلومینیوم، فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) سنجیده شد. به منظور ارزیابی اثرات ضددردی عصاره از آزمون‌های ریتینگ، تیل فلیک و فرمالین استفاده و داده‌های بدست آمده با کمک آزمون آماری تحلیل واریانس یکطرفه و سپس آزمون دانکن مورد مقایسه و بررسی قرار گرفتند.

نتایج: نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد به طوری که بیشترین میزان ترکیبات فوق طی غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم عصاره حاصل شد. در تست ریتینگ عصاره هیدروالکلی برگ مورینگا به طور معنیداری تعداد انقباضات القاء شده به وسیله اسید استیک را مهار و همه دوزهای عصاره فعالیت ضد دردی نشان دادند (به ترتیب $p<0.05$، $p<0.01$ و $p<0.01$). در تست تیل‌فلیک دوزهای ۲۰۰ و ۳۰۰ عصاره توانستند پاسخ تاخیری پرش دم را از ۰/۰۱ ± ۲/۸۳ ثانیه در گروه کنترل را به ترتیب به ۰/۹ ± ۵/۶۶ و ۱/۰۵ ± ۶/۲۶ برساند ($p<0.01$). در تست فرمالین تزریق تمامی دوزها عصاره سبب کاهش معنی دار درد مزمن و حاد در مقایسه با گروه کنترل گردید به طوری که بیشترین فعالیت ضد دردی مربوط به دوز ۳۰۰ میلیگرم بر کیلوگرم عصاره بود که امتیاز درد در فاز حاد و مزمن را تقریبا به میزان ۱ واحد و ۱/۲ واحد در مقایسه گروه کنترل کاهش داد.

نتیجه‌گیری: داده‌های حاصله پیشنهاد دهنده اثر ضد دردی عصاره هیدروالکلی برگ مورینگا است، که ممکن است به واسطه هر دو مکانیسم مرکزی و محیطی باشد. وجود فلاونوئیدها ممکن است مسئول ایجاد فعالیت ضد دردی این گیاه باشد و لذا با انجام تحقیقات تکمیلی می‌توان از آن به عنوان یک داروی ضد دردی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: اثرات ضد درد، ترکیبات پلی فنولیک، گیاهان دارویی، عصاره هیدروالکلی

مقدمه

درد یکی از مشکلات اصلی و اساسی در جوامع امروزی بوده و علیرغم آن که هشداری برای آسیب‌های بافتی است اما وجود آن احساس ناخوشایندی است که انسان را وادار می‌کند برای مقابله با آن از روش‌های مختلف درمانی استفاده نماید (۱). برای کنترل درد بیشتر از داروهای ضدالتهاب غیر استروئیدی و یا داروهای اوپیوئیدی استفاده می‌شود (۲)؛ داروهای اوپیوئیدی اثرات خود را با اثر بر سه گیرنده اوپیوئیدی مو، کاپا و دلتا واقع در سیستم عصبی مرکزی به ویژه نخاع شوکی و ساقه مغز اعمال می‌کنند، اما با القای تحمل و وابستگی فیزیکی و همچنین افزایش حساسیت نسبت به درد یا هایپرآلرژی باعث بروز اثرات ناخواسته می‌شوند (۳) که مصرف طولانی مدت آن‌ها منجر به القای وابستگی و تحمل می‌شود بنابراین باید در مصرف آنها احتیاط نمود (۴، ۵). از طرفی، داروهای ضد درد ملایمتر مانند داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی (NSAIDs) اثر خود را از طریق جلوگیری از سنتز ایکوزانوئیدها (مانند پروستاگلاندین‌ها) توسط مهار آنزیم سیکلواکسیژناز (Cyclo-oxygenase- COX) اعمال می‌کنند و باعث مهار درد در مراحل اولیه آن و در قسمت محیطی می‌شوند (۶) که استفاده طولانی مدت از آنها منجر به ایجاد تحمل یا وابستگی نمی‌شود، اما با مهار COX باعث بروز عوارض گوارشی مانند خونریزی در دستگاه گوارش می‌شوند (۷، ۸) و همچنین واکنش‌های آلرژیک به ویژه آنژیوادم برونکواسپاسم و بثورات جلدی ،سردرد ،سرگیجه، گیجی، اختلالات شنوایی نظیر وزوز گوش از دیگر عوارض مهمی است که از این دسته دارویی گزارش شده است (۹). به همین دلیل همواره محققان در پی یافتن داروهای جدیدی در زمینه کاهش درد هستند تا عوارض کمتری نسبت به داروهای موجود داشته باشند یکی از راه کارهای ممکن جهت دستیابی به داروهای ضد درد با کارایی بالا و آثار محدود کننده کمتر، توجه به گیاهان دارویی و مواد طبیعی است که امروزه یک استراتژی تحقیقاتی پرثمر در راه تهیه داروهای ضد درد جدید محسوب می‌شود (۱، ۱۰).

استفاده از گیاهان دارویی به منظور درمان درد و التهاب در طب سنتی ایران نوعی رسم و عادت می باشد حال آنکه در بیشتر موارد منشا و اساس فعالیت این گیاهان ناشناخته مانده است. لیکن ارزیابی اثرات داروشناسی عصاره خالص این گیاهان می‌تواند به عنوان یک راهبرد پژوهشی منطقی به منظور یافتن داروهای جدید باشد (۱۱، ۱۲) و تحقیقات متعددی در مورد اثرات ضد دردی گیاهان دارویی در ایران و جهان صورت می‌گیرد که از جمله می‌توان به نتایج مطالعه محققانی همچون Hajhashemi و همکاران (۷) که اثر ضد دردی و ضد التهابی عصاره هیدروالکلی و اسانس Pinus eldarica در مدل‌های حیوانی مطالعه، Seddighfar و همکاران (۱۳) که اثرات ضد دردی عصاره‌های هیدروالکلی پنیرک قرمز، زیره سیاه و یونجه در موش صحرایی بررسی و Tajmirali و همکاران (۱۴) که اثر ضد دردی اسانس مرزه بختیاری در موش سوری مطالعه کرده اند اشاره کرد؛ این محققین در نتایج خود اظهار کردند که عصاره هیدروالکلی و اسانس گیاهان مذکور دارای خواص ضد دردی است و می‌تواند جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی ضد درد باشد. در پژوهش دیگری اثر ضد التهابی و ضد دردی حلال‌های مختلف برگ Moringa stenopetala Bak موش صحرایی نر بررسی و گزارش شد که عصاره گونه Stenopetala درخت مورینگا دارای خواص ضد دردی و ضد التهابی است می‌تواند منبع بالقوه ای برای توسعه داروهای ضد درد و ضد التهابی جدید باشد (۱۵). مورینگا یکی از گیاهانی است که در طب سنتی به عنوان ضد درد معرفی شده و استفاده می‌شود (۱۶، ۱۷).

مورینگا تنها جنس از خانواده گیاهان گلدار Moringaceae است که دارای ۱۳ گونه می‌باشد و رایج‌ترین گونه آن با نام علمی *Moringa oleifera* Lam شاخته می‌شود که در مناطق استوایی و نیمه گرمسیری یافت و بومی مناطق هند، پاکستان، بنگلادش، افغانستان و مالایا است (۱۸، ۱۹). تمام قسمت‌های درخت مورینگا دارای خواص دارویی هستند که عمدتاً برای اهداف دارویی استفاده می‌شوند اما برگ‌های آن با غنای

استثنایی از ترکیبات گیاهی فعال بیولوژیکی مفیدترین قسمت آن می‌باشد (۱۷، ۲۰) که براساس مطالعات گذشته عصاره برگ‌های مورینگا الیفرا همچنین حاوی تانن ها، ساپونین ها، فلاونوئیدها، ترپنوئید ها و گلیکوزیدها هستند که به عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی دارای خواصی چون ضد میکروبی، ضد قارچی، ضدسرطانی تسکین دهنده درد، مهارکننده سیستم عصبی مرکزی، ادرارآور، ضد التهابی و مدیریت کننده پرکاری تیروئید است (۲۱، ۲۲). از این رو با توجه به کاربردهای مختلف درمانی گیاه مورینگا در طب سنتی و خواص دارویی آن، تحقیق حاضر با هدف تعیین اثرات ضددردی برگ گیاه مورینگا با استفاده از تست‌های ریتینگ، تیل فلیک و فرمالین در موش صحرایی نر انجام شد.

مواد و روش

در این مطالعه تجربی مقدار ۱/۵کیلوگرم برگ تازه گیاه مورینگا در تیرماه سال ۱۴۰۱ تهیه و سپس توسط گیاهشناس دانشگاه زابل مورد تایید قرار گرفت.پس از جداسازی دمبرگ‌ها، برگ‌ها در دمای اتاق (۲۵درجه) و در سایه خشک گردید و سپس توسط آسیاب مکانیکی به صورت پودر خشک درآمد. مقدار ۱۵۰ گرم از پودر خشک شده گیاه را در یک لیتر اتانول ۷۰ درصد به مدت ۷۲ ساعت بروی شیکر قرارداده تا مواد موثره‌ی مورد نیاز استخراج شوند. مخلوط حاصل پس از صاف شدن در دستگاه روتاری قرار داده شد و سپس حلال آن جدا گردید و به مدت یک هفته در زیر هود در درون پتری دیش به منظور خشک شدن قرار داده شد.پس از گذشت یک هفته آنچه در ته ظرف باقی مانده بود(عصاره گیاه) به منظور تیمار رت های نر، دوزهای مختلف عصاره در مقدار مناسب سرم فیزیولوژی (کلروسدیم ۰/۹درصد) حل شد.

حیوانات:

حیوانات: ۳۶ سر موش صحرایی نر نژادویستار (۲۵۰-۲۲۰ گرم) از انیستیتو پاستور ایران خریداری شدند و در شرایط استاندارد اتاق حیوانات تحت دوره نوری ۱۲ساعت روشنایی و ۱۲ساعت تاریکی (شروع دوره روشنایی از ساعت ۷صبح) شرایط دمایی ۱ C ± ۲۲ سانتی‌گراد) و رطوبت نسبی ۵۵-۵۰ درجه نگهداری شدند.حیوانات با دسترسی آزاد به آب و غذا مخصوص، در قفس‌های فلزی نگه داری و حداقل ۲ساعت قبل از انجام آزمایش به شرایط آزمایشگاه عادت داده شدند، آزمایش مورد نظر بین ساعات ۸ صبح تا ۱۲:۰۰ظهر انجام می‌شد. آزمایشات بر طبق دستورالعمل‌های اخلاقی انجمن بین المللی مطالعه درد در مورد حیوانات آزمایشگاهی انجام شد (۲۳). حیوانات در ۶ گروه ۶ تایی شامل: گروه کنترل (تحت اثر نرمال سالین)، گروه تحت اثر مرفین (۱ میلی‌گرم بر کیلو گرم)، گروه‌های تیمار شده با دوزهای کم، متوسط و زیاد گیاه مورینگا (به ترتیب به ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ mg/Kg) و گروه تیمار شده با نالوکسان ۱ mg/Kg به همراه دوز ۳۰۰ mg/Kgعصاره تقسیم شدند.

آزمون های درد:

تست ریتینگ(Writhing test): عموما به منظور ارزیابی ترکیباتی که دارای فعالیت ضددردی محیطی می‌باشند از تست ریتینگ استفاده می‌شود که در تشخیص درد مرکزی از محیطی بسیار سودمند است (۲۴). در روز آزمایش به منظور عادت دادن حیوانات به محیط، هریک از آنها ۳۰ دقیقه قبل از شروع آزمایش درجعبه استاندارد شیشه ای قرار داده شدند. عصاره هیدرو الکلی ریشه گیاه مورینگا در مقادیر مشخصی از سرم فیزیولوژیک استریل حل و با دوزهای ۱۰۰ ،۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن با غلظت ۰/۶درصد تزریق شد و بلافاصله پس از تزریق درون صفاقی اسید استیک، تعداد انقباضات شکمی (به گونه ای که هردو پای موش کاملا کشیده گردد) به مدت ۳۰ دقیقه شمارش گردید در ضمن هر حیوان فقط یکبار مورد استفاده قرار گرفت (۲۵). در گروه کنترل نیز بعد از تزریق درون صفاقی سالین تست ریتینگ انجام شد.

تست فرمالین: در این آزمایش از مدل پیشنهادی Dennis و Dubuisson (۲۶) به منظور ارزیابی درد مزمن استفاده شد. بدین صورت که حیوانات ۱ ساعت قبل از تست به منظور عادت کردن با شرایط آزمایش به داخل جعبه مخصوص تست فرمالین منتقل شدند، این جعبه مخصوص از جنس پلکسی گلاس و در ابعاد ۳۰× ۳۰ ×۳۰ شده بود و به منظور مشاهده بهتر حرکات حیوان، آینه‌ای با زاویه ۴۵ درجه زیر آن و روبروی فرد مشاهده

کننده قرار می‌گرفت. ۳۰ دقیقه پس از تزریق درون صفاقی داروها، ۵۰ میکرولیتر فرمالدیید ۲/۵ درصد به کف پای راست حیوان به صورت زیرجلدی تزریق شد و حیوان مجددا به جعبه مخصوص تست برگردانده شد و رفتار حیوان مورد بررسی قرار گرفت و به صورت زیر برای مدت ۶۰ دقیقه نمره گذاری شد، به نحوی که هر ۱۵ ثانیه یک بار پاسخ حرکتی درد به صورت اعداد۰، ۱، ۲ و ۳ گردید: عدد صفر، در مواردی که حیوان هنگام راه رفتن تعادل کامل داشت و وزنش روی هر دو پا توزیع شده بود؛ عدد ۱، برای هنگامی که حیوان وزن بدن خود را روی پای تزریق شده، تحمل نمی کرد و یا از پای تزریق شده مراقبت می‌کرد؛ عدد ۲، برای وقتی که حیوان پنجه دردناک را بلند می‌کرد و هیچ گونه تماسی با کف محفظه نداشت؛ عدد ۳، برای زمانی که حیوان پنجه دردناک را می‌لیسید، می‌جوید یا به شدت تکان می‌داد. میانگین ۵ دقیقه ابتدای هر تست به عنوان فاز اول تست فرمالین (فازحاد) و میانگین دقایق ۶۰-۱۵ تست به عنوان فاز دوم تست فرمالین (فازمزمن) محسوب شد.

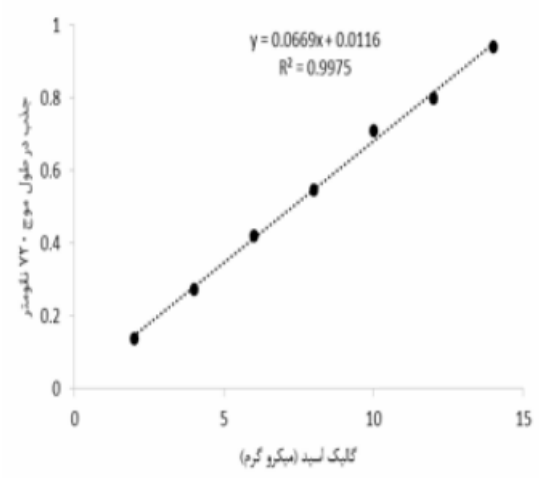
تست تیل فلیک (Tail flick test): این تست به منظور بررسی اثرات ضددردی مرکزی داروها و ترکیبات شیمیایی استفاده می‌شود. در واقع این تست به داروهایی حساس است که روی سیستم عصبی مرکزی عمل می‌کنند (۲۷). این آزمایش با استفاده با استفاده از دستگاه پرش دم، مدل TF-5500 ساخت شرکت صنعت ایران، بر اساس مدل ارائه شده قبلی انجام شد (۲۸). شدت نور مورد استفاده برابر با ۷ بود (درجه روی دستگاه) و از مدت زمان مرجع ۱۰ ثانیه به عنوان زمان قطعی نوردهی (Cut off time) استفاده شد یعنی چنانچه حیوان تا مدت ۱۰ ثانیه پس از تابش نور سوزان، دم خود را نمی‌کشید به منظور جلوگیری از آسیب بافتی محرک قطع می‌شد. حیوان به صورت افقی در محفظه مخصوص نگهداری قرار گرفته بود و دم آن آزاد بود. مدت زمان تاخیر در کشیدن دم در سه مرتبه و به فاصله دو دقیقه قبل و ۲۰ دقیقه بعد از تزریق دارو یا عصاره اندازه گیری شد و میانگین آنها به عنوان زمان تاخیر قبل و بعد از دارو محسوب و ثبت گردید. همچنین مورفین به صورت درون صفاقی به حیوانات تزریق شده و زمان پس کشیدن دم در آنها ثبت شد.

داروها: مرفین سولفات و نالوکسان، از دارو پخش (ایران) و اسید استیک و فرمالین از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

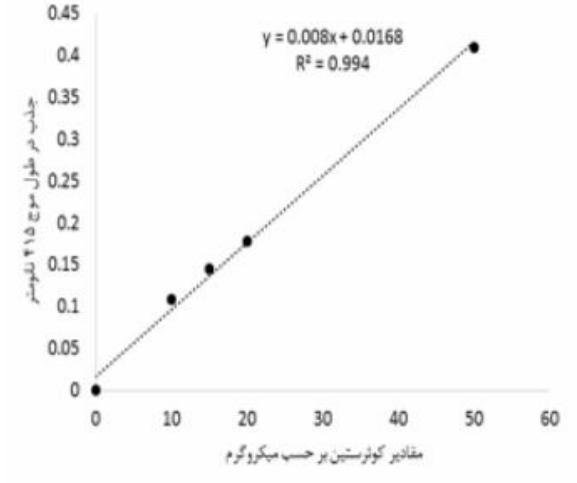
تست‌های فیتوشیمیایی

تعیین محتوی کل ترکیبات فنولی: اندازه‌گیری مقادیر فنل تام با روش Ordone و همکاران (۲۹) انجام شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره با ۲۵ میلی‌لیتر واکنش‌گر ۰/۲ نرمال فولین سیوکالتیو به مدت ۵ دقیقه با یکدیگر توسط همزن مخلوط شدند. سپس ۲ میلی لیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد با غلظت ۷۵ گرم در لیتر به محلول اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر با طول موج ۷۶۰ نانومتر در مقابل بلانک (متانول) اندازه گیری گردید. مقادیر فنول تام در نمونه عصاره‌های گیاهی بر حسب منحنی استاندارد گالیک اسید (میلی‌گرم در گرم عصاره) بیان شد (شکل ۱).

تعیین محتوای فلاونوئیدی عصاره: میزان محتوای فلاونوئید نمونه عصاره های گیاهی با روش رنگ سنجی ارزیابی شد (۳۰). طبق این روش، در لوله آزمایش ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل و۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد به آن اضافه گردید. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر محلول پتاسیم استات ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به این مخلوط اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر قرائت شد و میزان فلاونوئید با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره بدست آمد (شکل ۲).



نمودار ۱: منحنی استاندارد گالیک اسید جهت اندازه گیری مقادیر فنول



نمودار ۲: منحنی استاندارد کوئرستین جهت اندازه گیری مقادیر فلاونوئید

تعیین فعالیت آنتی رادیکالی به روش DPPH: برای اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی مقدار ۴۰ میلی‌گرم عصاره وزن ودر ۲۵ سی سی متانول حل گردید. بدین ترتیب مقدار ۱سی سی از این محلول را برداشته و با DPPH (با غلظت ۰/۱میلی مول) به حجم ۴ سی سی رسانده و بعد از مدت زمان ۶۰ دقیقه در دمای اتاق، جذب نوری نمونه ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شدند.

$Sc\ (\%) = [(Ao-As)/A0] \times 100$

Ao = جذب کنترل (حاوی تمامی واکنش‌گرها به غیر از نمونه آزمایش)

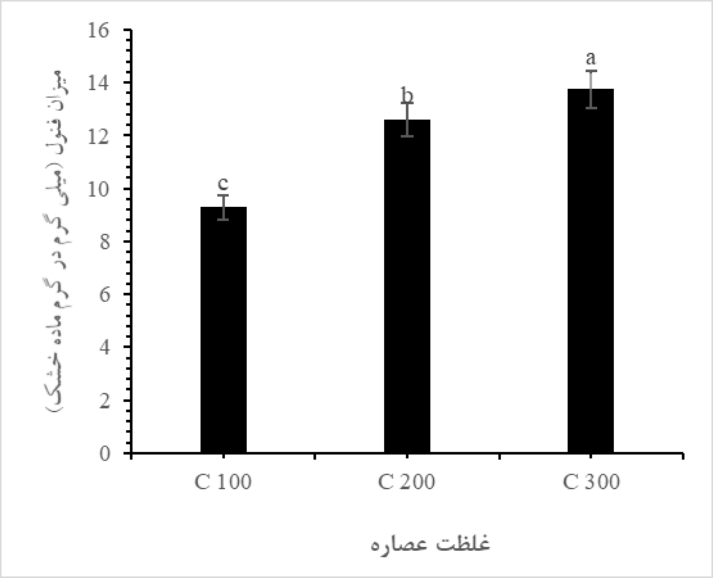
As = جذب نمونه آزمایش

%Sc = بیانگر مقداری از عصاره که قادر به جذب درصدی از رادیکال آزاد می‌باشد (۳۱).

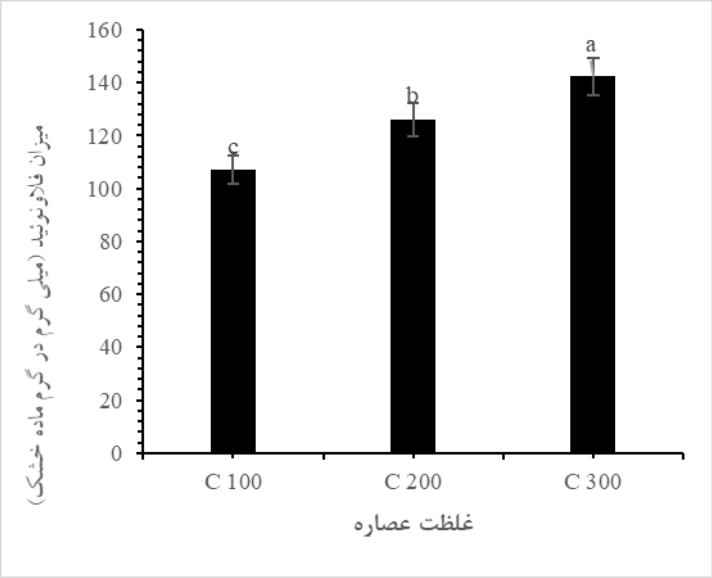
تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های حاصل از تست‌های درد با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه و به دنبال آن، آزمون توکی تجزیه و تحلیل شدند و $p<0.05$ معنی‌داری دار در نظر گرفته شد. همچنین میزان ترکیبات فنلی کل، میزان به دام اندازی رادیکال‌های آزاد و میزان ترکیبات فلاونوئیدی کل، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین (با روش توکی) با استفاده از نرم افزارهای EXCEL و SAS 9.1 انجام شد.

نتایج وبحث

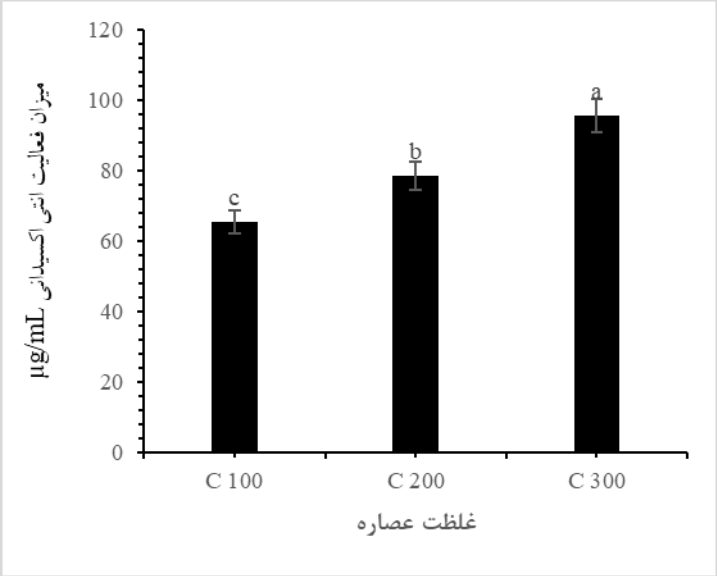
نتایج حاصل از تجزیه واریانس‌داده‌ها نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف بر مقدار کل ترکیبات فنلی، فلاونوئید کل و مهار رادیکال‌های آزاد، در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند از طرفی نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بین غلظت های مختلف از نظر میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئید کل و مهار رادیکال‌های آزاد تفاوت معنی‌داری وجود دارد بطوری بیشترین میزان فوق طی غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم عصاره بدست آمد. بر اساس نتایج این تحقیق مشخص شد که بین غلظت‌های مختلف عصاره گیاه مورینگا، از نظر میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اختلاف معنی‌داری وجود دارد، به طوری که بیشترین میزان ترکیبات فنلی (۱۳/۷۴۷ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک)، فلاونوئیدی (۱۴۲/۴ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۹۵/۶۵۲ µg/mL) طی غلظت ۳۰۰ عصاره حاصل شد.



نمودار ۳: اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه مورینگا بر میزان ترکیبات فنولی



نمودار ٤: اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه مورینگا بر میزان ترکیبات فلاونوئیدی

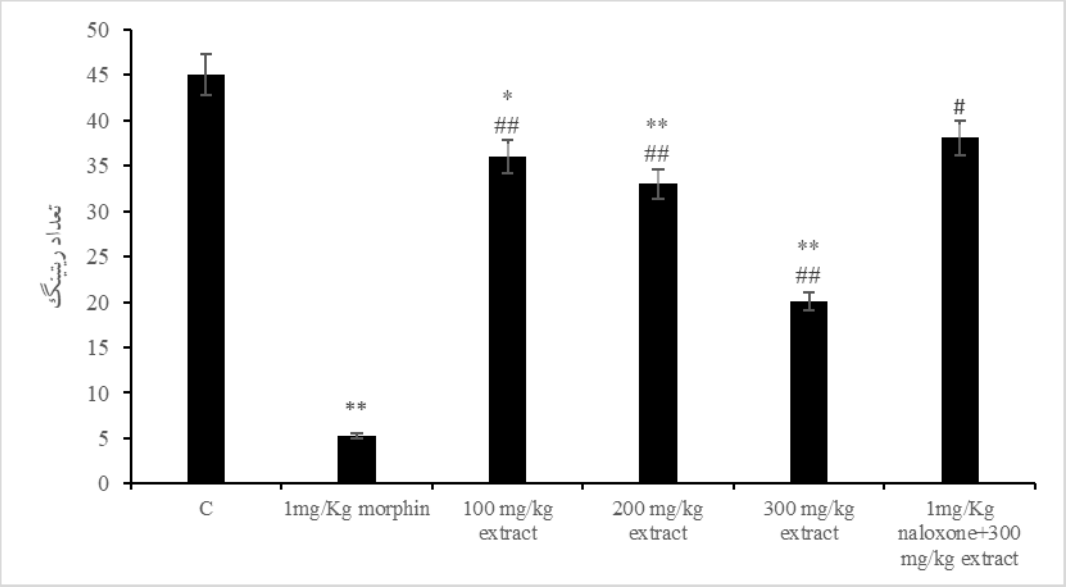


نمودار ۵: اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه مورینگا بر میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی

تست ریتینگ:

نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق دوزهای ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با $p<0.01$ و دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با $p<0.05$ عصاره هیدروالکلی گیاه مورینگا در مقایسه با گروه کنترل اثر معنی‌داری در کاهش درد دارد به طوری که طی تزریق دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره میزان درد نسبت به سطح کنترل به ترتیب کاهشی حدودا ۲۰، ۲۶/۶۴ و ۵۵/۵۵ درصدی نشان داد همچنین با مقایسه دوزهای مختلف عصاره مشخص شد عصاره هیدروالکلی مورینگا به صورت وابسته به دوز، منجر به کاهش تعداد رایت‌ها

در هر سه دوز به کار رفته نسبت به سطح کنترل شد به طوری که موثرترین دوز، ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره بود (نمودار ۱). همچنین استفاده از مورفین سبب کاهش ۴۰ واحدی تعداد انقباضات شکمی نسبت به گروه کنترل گردید ($p<0.01$). از طرفی با مقایسه دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ عصاره و نالوکسان به همراه عصاره mg/kg ۲۰۰ نسبت به گروه مورفین به ترتیب کاهش معنیداری را سطح $p<0.01$، $p<0.01$، $p<0.01$ و $p<0.05$ نشان دادند (نمودار ۶).



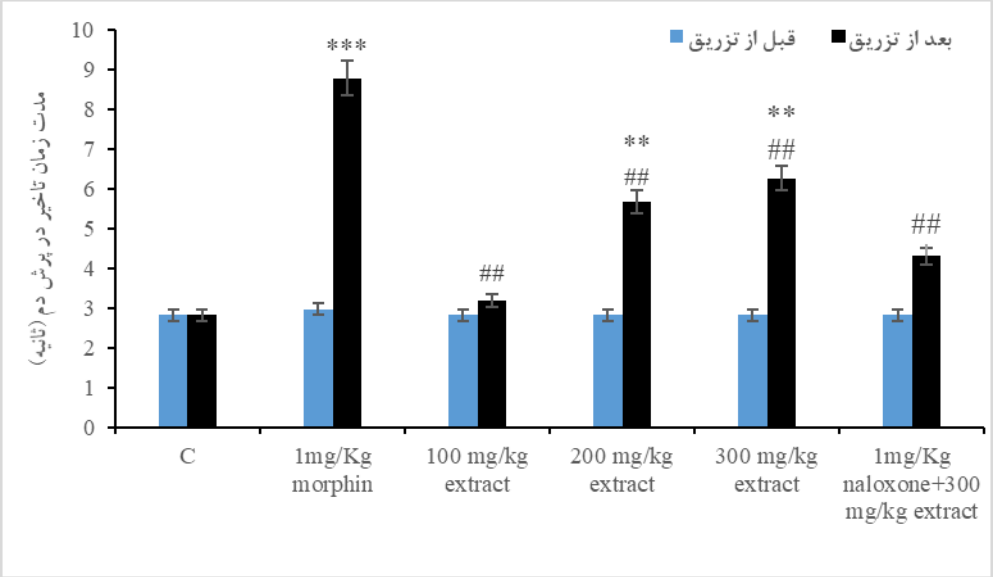
نمودار ٦- مقایسه میانگین تعداد ریتینگ موش صحرایی نر با غلظت‌های مختلف عصاره‌ی برگ گیاه مورینگا در آزمون اسید استیک.

$P<0.05$*، $P<0.01$** و $P<0.001$*** اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل.

$P<0.05$#، $P<0.01$## و $P<0.001$### اختلاف معنی‌دار با گروه مورفین.

تست تیل فلیک

در تست تیل فلیک استفاده از دوزهای ۳۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره هیدروالکلی گیاه مورینگا اثر ضد دردی معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($p<0.01$ و $p<0.01$) با مقایسه دوزهای مختلف عصاره مشخص شد مدت زمان عکس العمل پرش دم در موش طی کاربرد غلظت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ عصاره هیدروالکلی مورینگا به صورت وابسته به دوز، بوده به طوری که موثرترین دوز، غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم عصاره بود که مدت زمان عکس العمل پرش دم در موش را از ۰/۰۱ ± ۲/۸۳ ثانیه در گروه کنترل را به ۱/۰۵ ± ۶/۲۶ رساند این این در حالی است که استفاده از دوزهای ۱۰۰ میلی‌گرم در این تست اثر ضد دردی معنی داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان نداد. از طرفی استفاده توام نالوکسان به همراه دوز بالای عصاره سبب برگرداندن اثرات ضد دردی عصاره شد. استفاده از مورفین سبب افزایش مدت زمان عکس العمل پرش دم در موش از موش را از ۰/۰۲ ± ۲/۹۷ ثانیه در گروه کنترل را به ۱/۰۵ ± ۸/۷۸ ثانیه رساند (نمودار ۷)



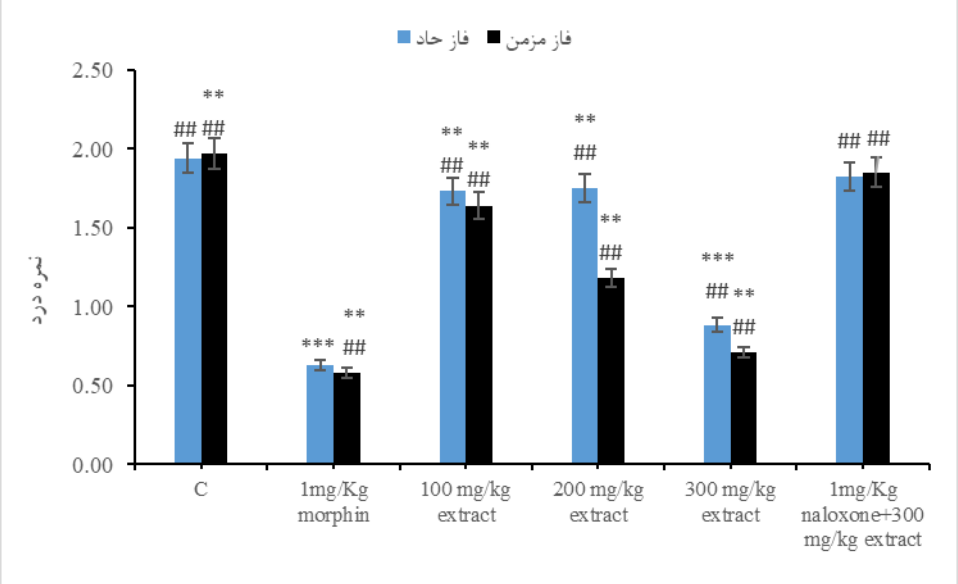
نمودار ۷- مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف عصاره در تست تیل فلیک.

*P<0.05، **P<0.01 و ***P<0.001 اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل.

#P<0.05، ##P<0.01 و ###P<0.001 اختلاف معنی‌دار با گروه مورفین.

تست فرمالین

نتایج حاصل از تست فرمالین در نمودار ۸ نشان داد که تزریق دوز ۱۰۰ و ۲۰۰میلی گرم بر کیلو گرم عصاره در فاز مزمن و حاد اثر ضد دردی معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد (p<0.01 و p<0.01). کاربرد غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، امتیاز درد در فاز حاد و مزمن را به ترتیب از ۰/۰۱ ± ۱/۹۴ و ۰/۰۱ ± ۱/۹۶ واحد به ۰/۰۹ ± ۱/۷۳ و ۰/۰۸ ± ۱/۶۴ واحد رساند در حالی که کاربرد طی کاربرد دوز ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره امتیاز درد در فاز حاد و مزمن را نسبت به سطح کنترل به ترتیب ۰/۰۱۱ ± ۱/۷۵ و ۰/۰۱ ± ۱/۱۸ کاهش داد. از طرفی تزریق دوز ۳۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم عصاره در هر دو فاز مزمن و حاد درد اثر ضد دردی معنی داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد (p<0.001) و امتیاز درد در فاز حاد و مزمن را تقریبا به میزان ۱ واحد و ۱/۲ واحد در مقایسه گروه کنترل کاهش داد. در این تست نیز استفاده توام عصاره با دوز بالا به همراه نالوکسان اثرات ضد دردی را برعکس نمود. همچنین استفاده از مورفین نیز همانند دوز ۳۰۰ میلی گرم عصاره توانست اثر ضد دردی معنی داری را در هر دو فاز مزمن و حاد درد در مقایسه با گروه کنترل نشان دهد (p<0.001).



نمودار ۸- مقایسه میانگین نمره درد موش صحرایی نر در غلظت‌های مختلف عصاره‌ی برگ گیاه مورینگا در تست فرمالین.

*P<0.05، **P<0.01 و ***P<0.001 اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل.

#P<0.05، ##P<0.01 و ###P<0.001 اختلاف معنی‌دار با گروه مورفین.

بحث

گیاهان دارویی از ابتدایی ترین روش‌ها برای مقابله با بیماری‌ها و تسکین درد بوده‌اند (۱۵، ۳۲، ۳۳) عقیده بر این است که اغلب ترکیبات طبیعی و به خصوص گیاهان طبی می‌توانند منبع یافتن ترکیبات جدید باشند، به دلیل اینکه برخی ترکیبات مشهور دارویی فعلی مثل آسپیرین ،آتروپین مورفین و کوکائین از گیاهانی که به عنوان ضد درد استفاده می‌شده‌اند به دست آمده است (۳۴) مصرف مواد شیمیایی و گیاهی یکی از روش‌هایی است که در کنترل درد قدمتی کهن دارد (۳۵) وجود عوارض جانبی کم یا نداشتن عوارض جانبی علت برتری قابل ملاحظه گیاهان دارویی نسبت به داروهای شیمیایی ضددرد است (۳۶) از این رو استفاده از گیاهان دارویی به عنوان ترکیباتی با منشاء طبیعی، با اثرات جانبی کم و به جای درمان‌های شیمیایی به نظر مطلوب‌تر می‌آیند (۳۷). بالا بودن میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در این مطالعه با یافته‌های پیشین محققان مبنی بر اینکه گونه‌های مختلف گیاه مورینگا سرشار از پروتئین، اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و دارای سطوح بالایی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی می‌باشند همخوانی دارد (۳۸، ۳۹، ۴۰).

بررسی‌های مختلف حاکی از آن است که گیاهان دارویی یک منبع بالقوه از آنتی اکسیدان‌ها، پلی فنول‌های فلاونوئیدی، پلی فنول‌های غیر فلاونوئیدی و اسیدهای فنولی یا دی ترین‌های فنولی هستند (۴۱) که به دلیل وجود کثرت ترکیبات ثانوی ترپنوییدی، فلاونوییدی و فنلی، عصاره‌های حاصله از آن‌ها در تسکین دردهای کوتاه و طولانی مدت نقش بسزایی دارند (۴۲). آنتوسیانین‌ها، فلاونوییدها و پلی فنل ها به دلیل داشتن خواص ضدالتهابی ضد سرطانی، ضد دیابتی، ضد حساسیت ضد دردی دارای فعالیت های آنتی اکسیدانی و خواص آنتی اکسیدانی هستند (۴۳، ۴۴) این ترکیبات با قابلیت حذف رادیکال‌های آزاد و کاتیون های دو ظرفیتی اثر خود را اعمال می‌کند (۲۶، ۴۵).

اثبات شده است که درد در حیوانات را فقط می‌توان به وسیله آزمایش پاسخ آنها تخمین زد زیرا درد نمی‌تواند به طور مستقیم مورد ارزیابی قرار گیرد (۴۶)؛ از این رو در این تحقیق از تست ریتینگ، تست تیل فلیک و آزمون فرمالین به منظور بررسی اثر ضد دردی عصاره هیدروالکلی گیاه مورینگا استفاده گردید. تست ریتینگ یکی از مهم ترین تست‌هایی است که به منظور غربالگری ترکیبات ضد دردی احتمالی استفاده

می‌شود و در آن از اسید استیک رقیق شده به منظور ارزیابی فعالیت ضد دردی محیطی استفاده می‌شود (۳۹). در تحقیق حاضر تزریق عصاره هیدروالکلی گیاه مورینگا در تست ریتینگ همانند مطالعات قبلی انجام شده بر روی گیاهان دارویی مانع دل پیچه ناشی از اسید استیک گردید و به طور معنیداری سبب کاهش در تعداد ریتینگ (انقباضات شکمی) در مقایسه با گروه کنترل شد (۷، ۳۹، ۴۷). از این رو با توجه به این مسئله می‌توان اثرات ضد دردی محیطی را برای عصاره گیاه مورینگا پیشنهاد کرد و لذا حدس زده می‌شود که اثرات تسکینی آن با مکانیزم‌های محیطی حمایت می‌گردد. در این مدل به نظر می‌رسد که اثرات ضددردی محیطی گیاه مورینگا به طور غیر مستقیم به وسیله مدیاتورهای داخلی نظیر برادی ،کینین سرتونین هیستامین، ماده p و پروستاگلاندین‌ها ایجاد شده باشد چرا که همه این مدیاتورها با تحریک نورون‌های دردزای محیطی در ارتباط می‌باشند (۴۸، ۴۹، ۵۰).

تزریق درون صفاقی اسید استیک می‌تواند سبب ایجاد التهاب حاد صفاق می‌شود (۱۲). در گزارشی اظهار شد که در مایع صفاقی آزادسازی واسطه‌های فوق هیستامین سروتونین، سایتوکین ها، ایکوزانوئیدها و پروستاگلاندین‌ها طی تزریق اسید استیک ممکن است موجب افزایش نفوذپذیری عروق شود (۵۱) که این افزایش در پروستاگلاندین E2 و پروستاگلاندین F2α ممکن است با تست ریتینگ در ارتباط باشد (۷، ۵۲). پروستاگلاندین‌ها به عنوان یک عامل اصلی در التهاب به صورت مستقیم سبب تحریک رسپتورهای درد و بالابردن حساسیت آنها به سایر عوامل، مانند برادی کینین می‌گردند (۵۳، ۵۴). همچنین گزارش شده است که پروستاگلاندین‌ها در ایجاد حس درد نقش داشته و دارای اثرات مهم داخل سلولی هستند، اما بعضی از آنها هم در شرایط فیزیولوژیکی و هم در شرایط پاتولوژیک به داخل مایعات موضعی بافتی و گردش خون آزاد و از طریق اتصال به گیرنده‌های مرتبط با G پروتئین‌ها و افزایش میزان cAMP به داخل سلول‌ها، سبب ایجاد حس درد می‌شوند (۵۵). بنابراین می‌توان این احتمال را داد که تجویز عصاره گیاه مورینگا از انتشار این واسطه‌ها کاسته و سبب کاهش سنتز و ترشح پروستاگلاندین ها شده باشد و در این ارتباط مطالعات مختلفی نیز اثرات ضد التهابی برخی گونه‌های گیاه مورینگا را گزارش کرده‌اند (۱۵، ۳۹).

بخش دیگری از اثرات ضد دردی گیاه مورینگا را می توان به وجود ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها نسبت داد؛ این ترکیبات دارای اثرات ضد دردی و ضد التهابی بوده و تاثیر مستقیم آن‌ها بر سنتز پروستاگلاندین ها مشخص شده است (۵۶، ۵۷). فلاونوئیدها موادی تولید می‌کنند که با تاثیر بر روی گیرنده‌های ضد درد، سبب ایجاد پاسخ ضد دردی می‌شوند. بنابراین این احتمال را می‌توان مطرح کرد که اثرات ضد دردی گیاه مورینگا ممکن است وابسته به حضور ترکیبات پلی‌فنولی و فلاونوئیدی آن باشد (۵۸، ۵۹). این ترکیبات با مهار آنزیم سیکلواکسیژناز تولید پروستاگلاندین‌ها درپاسخ به محرک‌های التهابی را مهار و در نتیجه ازحساس شدن گیرنده‌های درد که به وسیله این مولکول‌ها به وجود می‌آید جلوگیری می‌شود و متعاقبا احساس دردی را که به همراه این پاسخ‌ها می‌باشد کم می‌کنند (۶۰، ۶۱). از طرفی اثرات ضد دردی آنتوسیانین‌ها و پلی فنل‌ها را توان به مهار سیکلواکسیژنازها و لیپواکسیژنازها رتبط دانست اثرات ضد التهابی در عصاره گیاهان با افزایش پروستاگلاندین‌ها ارتباط مستقیم دارد، و این عمل را از طریق مهار سیتوکین های التهابی مترشحه از ماکروفاژها مهار کاتکول متیل ترانسفراز و حفظ کانکول آمین‌ها تکمیل کنند (۵۸، ۶۲). احتمالات دیگری نیز مانند جلوگیری از آزاد شدن گابا، فعال کردن سیستم نور و آدرنرژیک و سیستم سروتوژنیک می توان در نظر گرفت (۴۸). بر اساس نتایج این مطالعه فعالیت ضد دردی عصاره مورینگا طی کاربرد نالوکسان مهار شد که با یافته‌های نتایج مطالعه Golshani و Mohammadi (۴۷) که گزارش کردند فعالیت ضد دردی عصاره گیاه بالنگو در تست ریتینگ توسط نالوکسان مهار می‌شود مطابقت دارد. یکی از داروهای آنتاگونیست سیستم اوپیوئیدی نالوکسان می باشد که از فعال شدن رسپتورهای اوپیوئیدی جلوگیری می‌کند (۶۳، ۶۴).

بنابراین به نظر می رسد که اثر عصاره گیاه در تسکین درد به واسطه گیرنده‌های اوپیوئیدی باشد (۶۵).

تست تیل فلیک یکی دیگر از پارامترهای مهم در ارزیابی فعالیت ضددردی می‌باشد که در آن از تحریکات حرارتی استفاده می‌شود (۲۸، ۶۶). نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که تزریق دوزهای متوسط و زیاد عصاره هیدروالکلی گیاه مورینگا موجب کاهش درد ناشی از محرک حرارتی در آزمون تیل فلیک می گردد از آنجا که تست تیل فلیک به منظور بررسی رفلکس های نخاعی و شناسایی مسیر ضد دردی مرکزی استفاده می شود (۴۶، ۴۷)، می‌توان این این احتمال را داد که عصاره گیاه مورینگا دارای اثرات ضددردی مرکزی می‌باشد.

به منظور ارزیابی اثرات ضد دردی محیطی (حاد) و مرکزی (مزمن) تست فرمالین آزمونی معتبر می‌باشد فاز اول فاز نوروژنیک (حاد) می‌باشد که در چند دقیقه اول پس از تزریق کف پایی فرمالین رخ می‌دهد و نسبتا زود گذر بوده و به‌علت اثر مستقیم ماده محرک فرمالین بر فیبرهای عصبی حساس نوع C می‌باشد که در پیرامون نورون‌های فعال درد ایجاد می‌شود و در فاز مزمن (تاخیری) درد یک فرایند التهابی است که ناشی از آزاد شدن واسطه‌های دردزایی همچون هیستامین روستاگلاندین سروتونین و برادی کینین (۷) و فعال سازی نورون‌های شاخ شکمی در سطح نخاع ایجاد می شود (۶۶).

در مطالعه ای که توسط Khan و همکاران (۶۷) انجام شد اثر ضد دردی گیاه *Polygonatum verticillatum* با استفاده از تست فرمالین به اثبات رسید و طی آن مشخص شد عصاره این گیاه سبب کاهش درد در فاز مزمن تست فرمالین می گردد و عمدتا این اثرات از طریق فلاونوئیدها و آلکالوئیدهای موجود در عصاره عمل می‌کنند که تاییدی بر یافته‌های این تحقیق می‌باشد. فلاونوئیدها دسته ای از ترکیبات شیمیایی هستند که یک هسته فنیل بنزوپیرین دارند و فعالیت ضد التهابی آنها وابسته به مهار متابولیسم اسید آراشیدونیک است اسید آراشیدونیک در شکل گیری واسطه‌های التهابی پروستاگلاندین‌ها و لکوترین‌ها تأثیر دارد (۶۸). از طرفی فلاونوئیدها یکی از مهارکننده‌های آنزیم سنتز کننده نیتریک اکساید به شمار می روند. با توجه به حضور فلاونوئیدها در عصاره گیاه مورینگا احتمالاً میتوان پیشنهاد کرد که اثرات ضددردی آن میتواند به علت مهار آنزیم‌های سنتز کننده نیتریک اکساید باشد که مانع تولید نیتریک اکساید میشوند که به دنبال تزریق فرمالین افزایش می یابد. از آنجا که نیتریک اکساید میانجی پردردی است. بنابراین کاهش آن منجر به فعالیت ضد دردی می‌شود (۴۵). یکی دیگر از عوامل درد، استرس اکسیداتیو است که طی آن رادیکال‌های آزاد و محصولات آن مانند قبیل آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن بر فعالیت‌های آنتی اکسیدانی غلبه می‌کنند که در این شرایط سیستم آنتی اکسیدانی قادر به مقابله با آن نیست (۶۹) از آنجایی که ترکیباتی چون فنول و فلاونوئید دارای آنتی اکسیدانی می‌باشند و اثرات آنتی اکسیدانی این ترکیبات در مطالعات پیشین گزارش شده است (۷۰)، لذا اثرات ضد دردی عصاره گیاه مورینگا می‌تواند به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره و ترکیبات آن باشد، مطالعات گذشته وجود فلاونوئیدها و تری ترینوئیدها را در این گیاه به اثبات رسانده است و خاصیت ضد اکسیداسیونی این ترکیبات نیز گزارش شده است (۲۲، ۲۳).

نتیجه گیری

نتایج حاصل از تست‌های ریتینگ، تیل فلیک و فرمالین اثرات ضد دردی گیاه مورینگا را تایید می‌نماید بنابراین می‌توان اثرات ضد دردی محیطی و مرکزی را برای عصاره پیشنهاد کرد اما استفاده از آن به عنوان یک داروی تسکین دهنده درد، نیاز به تحقیقات تکمیلی در زمینه فارماکولوژی و سم شناسی مواد موثره در گیاه دارد. به علاوه شناخت دقیق مکانیسم‌های فیزیولوژیک درگیر نیز می‌تواند گامی به سوی یافتن داروهای بهتر برای تسکین درد باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از تمامی همکاران محترم پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی دانشگاه زابل که صمیمانه در اجرای این پژوهش مساعدت نمودند، قدردانی می‌شود.

References

1. Pashmforosh M, Rajabi Vardanjani H, Rajabi Vardanjani H, Pashmforosh M, Khodayar MJ. Topical anti-inflammatory and analgesic activities of Citrullus colocynthis extract cream in rats. Medicina. 2018 Jul 29;54(4):51.
2. Ferrante C, Recinella L, Locatelli M, Guglielmi P, Secci D, Leporini L, Chiavaroli A, Leone S, Martinotti S, Brunetti L, Vacca M. Protective effects induced by microwave-assisted aqueous Harpagophytum extract on rat cortex synaptosomes challenged with amyloid β-peptide. Phytotherapy Research. 2017 Aug;31(8):1257-64.
3. Mangione MP, Crowley-Matoka M. Improving pain management communication: how patients understand the terms “opioid” and “narcotic”. Journal of general internal medicine. 2008 Sep; 23:1336-8.
4. Busse JW, Wang L, Kamaleldin M, Craigie S, Riva JJ, Montoya L, Mulla SM, Lopes LC, Vogel N, Chen E, Kirmayr K. Opioids for chronic noncancer pain: a systematic review and meta-analysis. Jama. 2018 Dec 18; 320(23):2448-60.
5. Law PY, Loh HH, Wei LN. Insights into the receptor transcription and signaling: implications in opioid tolerance and dependence. Neuropharmacology. 2004 Jan 1; 47:300-11.
6. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. Pharmacological reviews. 2004 Sep 1;56(3):387-437.
7. Hajhashemi V, Zolfaghari B, Amin P. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and essential oil of Pinus eldarica in animal models. Avicenna journal of phytomedicine. 2021 Sep;11(5):494.
8. Rostom A, Dubé C, Lewin G, Tsertsvadze A, Barrowman N, Code C, Sampson M, Moher D. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors for primary prevention of colorectal cancer: a systematic review prepared for the US Preventive Services Task Force. Annals of internal medicine. 2007 Mar 6;146(5):376-89.
9. Arzi A, Houshmand G, Goudarzi M, Khadem Haghighian H, Rashidi Nooshabadi MR. Comparison of the analgesic effects of royal jelly with morphine and aspirin in rats using the formalin. Journal of Babol University of Medical Sciences. 2015 Feb 10;17(2):50-6.
10. Calixto JB. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. Journal of ethnopharmacology. 2005 Aug 22; 100(1-2):131-4.
11. Bazafkan MH, Hardani A, Zadeh MR, Zargar AA, Moradi N, Jalali N. The effects of aqueous extract of celery leaves (Apium Gravelens) on the delivery rate, sexual ratio, and litter number of the female rats. Jentashapir Journal of Health Research. 2014 Oct 1; 5(5).
12. Mohammadi S, Zarei M, Zarei MM, Salehi I. Effect of hydroalcoholic leaves extract of Rhus Coriaria on pain in male rats. Anesthesiology and pain medicine. 2016 Feb; 6(1).
13. Seddighfar, M., Mirghazanfari, S. M., & Dadpay, M. (2020). Analgesic and anti-inflammatory properties of hydroalcoholic extracts of Malva sylvestris, Carum carvi or Medicago sativa, and their combination in a rat model. Journal of integrative medicine, 18(2), 181-188.
14. Tajmirali S, Setorki M, Hoooshmandi Z. Analgesic effect of Satureja bachtiarica Bunge essential oil using formalin test in mice. Experimental animal Biology. 2020 Aug 22; 9(1):103-10.
15. Tamrat Y, Nedi T, Assefa S, Teklehaymanot T, Shibeshi W. Anti-inflammatory and analgesic activities of solvent fractions of the leaves of Moringa stenopetala Bak (Moringaceae) in mice models. BMC complementary and alternative medicine. 2017 Dec; 17: 1-0.
16. Geremew H, Shibeshi W, Engidawork E, Tamiru W. Evaluation of Analgesic and Anti-inflammatory activity of Moringa stenopetala Bak. (Moringaceae) in mice. Ethiopian Pharmaceutical Journal. 2015; 31:15–26
17. Mahdi HJ, Khan NA, Asmawi MZ, Mahmud R, Vikneswaran A, Murugaiyah L. In vivo anti-arthritic and anti-nociceptive effects of ethanol extract of Moringa oleifera leaves on complete Freund's adjuvant (CFA)-induced arthritis in rats. Integrative medicine research. 2018 Mar 1; 7(1):85-94.
18. Gopalakrishnan L, Doriya K, Kumar DS. Moringa oleifera: A review on nutritive importance and its medicinal application. Food science and human wellness. 2016 Jun 1;5(2):49-56.

19. Minaiyan M, Asghari G, Taheri D, Saeidi M, Nasr-Esfahani S. Anti-inflammatory effect of Moringa oleifera Lam. seeds on acetic acid-induced acute colitis in rats. Avicenna journal of phytomedicine. 2014 Mar;4(2):127.
20. Teixeira EM, Carvalho MR, Neves VA, Silva MA, Arantes-Pereira L. Chemical characteristics and fractionation of proteins from Moringa oleifera Lam. leaves. Food chemistry. 2014 Mar 15; 147:51-4.
21. Jaiswal D, Rai PK, Mehta S, Chatterji S, Shukla S, Rai DK, Sharma G, Sharma B, Watal G. Role of Moringa oleifera in regulation of diabetes-induced oxidative stress. Asian Pacific journal of tropical medicine. 2013 Jun 1;6(6):426-32.
22. Raafat K, Hdaib F. Neuroprotective effects of Moringa oleifera: Bio-guided GC-MS identification of active compounds in diabetic neuropathic pain model. Chinese journal of integrative medicine. 2017 Dec 12:1-0.
23. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain. 1983;16(2): 109-11.
24. Collier HO, Dinneen LC, Johnson CA, Schneider C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. British journal of pharmacology and chemotherapy. 1968 Feb;32(2):295.
25. Jensen TS, Yaksh TL. I. Comparison of antinociceptive action of morphine in the periaqueductal gray, medial and paramedial medulla in rat. Brain research. 1986 Jan 15;363(1):99-113.
26. Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. pain. 1977 Oct 1;4:161-74.
27. Bentley GA, Newton SH, Starr J. Evidence for an action of morphine and the enkephalins on sensory nerve endings in the mouse peritoneum. British Journal of Pharmacology. 1981 Jun;73(2):325-32.
28. D'Amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation. J Pharmacol Exp Ther. 1941 May 1;72(1):74-9.
29. Ordone AL, Gomez JD, Vattuone MA. Antioxidant activities of Sechium edule swartz extracts. Food Chemistry. 2008 Aug 1; 97: 452-458.
30. Chang YL, Kim DO, Lee KW, Lee HJ, Lee CY. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. Journal of Agricultural and food chemistry. 2002 Jun 19;50(13):3713-7.
31. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil. Phytotherapy research. 2000 Aug;14(5):323-8.
32. Heidari MR, Vahedian MO, Moamenzadeh S, HayatbakhshAbbasi MM. The analgesic effect and possible mechanism of colchicum Szovitsii Methanolic extract in mouse. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences. 2005;4(1):25-33.
33. Abdolmaleki A, Fereidoni M, Farhadi Moghadam B, Asgari A. Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of Hydroalcoholic Extract of Salvia multicaulis on Male Rats. Quarterly of the Horizon of Medical Sciences. 2015 Jul 10;21(2):121-128.
34. Verdi J, Kamalinezhad M, Sabet Kasaei M, Sharif SH.Analgesic Effect Of Aqueous Satureja Hortensis L. Seed Extract In Male Rat. Physiol Pharmacol J. 2004;8(2):163-
35. Vaezi G, Tavasoli Z, Ranjbar-Bahadori S. Study on the different dosages of Elaeagnus angustifolia aqueous extract with and without morphine on the antinociceptive rate in mice.
36. Taherian AA, Etemadi H, Sadeghi HA. Assessment of aqueous extract of seed of Cuminum cyminum L. on neurogenic and inflammatory pain in mice. Journal of medicinal plants. 2007 Dec 10;6(24):44-50.
37. Verpoorte R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. Drug discovery today. 1998 May 1;3(5):232-8.
38. Abdull Razis AF, Ibrahim MD, Kntayya SB. Health benefits of Moringa oleifera. Asian pacific journal of cancer prevention. 2014;15(20):8571-6.
39. Hussein MC, Bektas N, Ozturk Y, Arslan R. Antinociception Induced by Moringa Stenopetela (Baker f.) Cufod. Leaves Extract and Possible Mechanisms of Action. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2022 Feb 23;58:e18578.
40. Mohammed S, Manan FA. Analysis of total phenolics, tannins and flavonoids from Moringa oleifera seed extract. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2015;7(1):132-5.
41. Nouri S KA, Kolahi M, Mirzajani R, Seyednejad SM. Phytochemical studies, antioxidants and various optimization methods in order to determine the best method of extracting curcumin extract ethanol from the plant Curcuma longa L. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants 2016; 11 (3): 1-11.

42. Aitbaba A, Sokar Z, Chait A. Analgesic and anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract of Astragalus ibrahimianus. ||| Bangladesh Journal of Pharmacology. 2023 Jun 9; 18(2):41-8.
43. Obi A, Egwurugwu JN, Ojefa SO, Ohamaeme MC, Ekweogu CN, Ogunnaya FU. Immunomodulatory effects of hydromethanolic extract of Moringa oleifera leaf on male wistar rats. Nigerian Journal of Experimental and Clinical Biosciences. 2018 Jan 1;6(1):26-32.
44. Zafra-Stone S, Yasmin T, Bagchi M, Chatterjee A, Vinson JA, Bagchi D. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. Molecular nutrition & food research. 2007 Jun;51(6):675-83.
45. Parveen Z, Yulin D, Muhammad KS, Rongji D, Waqar A, Yu Hong Y. Antiinflammatory and analgesic activities of Thesium chinense Turcz extracts and its major lavonoids, kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside. Yakugaku Zasshi. 2007;127(8):1275-9.
46. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. Pharmacological reviews. 2001 Dec 1;53(4):597-652.
47. Golshani Y, Mohammadi S. Evaluation of antinociceptive effect of methanolic extract of Lallemantia iberica in adult male rats. Armaghane danesh. 2015 Mar 10;19(12):1058-68.
48. Fields, HL, Basbaum, AI. Central nervous system mechanisms of pain modulation. in: PD Wall, R Melzack (Eds.) Textbook of pain. 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994.p.243–257.
49. Malpezzi-Marinho, E. L., Molska, G. R., Freire, L. I., Silva, C. I., Tamura, E. K., Berro, L. F., ... & Marinho, E. A. V. Effects of hydroalcoholic extract of Solidago chilensis Meyen on nociception and hypernociception in rodents. BMC complementary and alternative medicine. 2019. Nov 25; 19, 1-9.
50. Negus SS, Vanderah TW, Brandt MR, Bilsky EJ, Becerra L, Borsook D. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: recent advances and future challenges. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2006 Nov 1;319(2):507-14.
51. Saghaei F, Motamedi S. The antinociceptive and anti-inflammatory effects of hydro alcoholic extract of Satureja bachtiarica on mouse. Journal of Medicinal Herbs,. 2017 Sep 23;8(3):179-84.
52. Tanideh N, Nematollahi SL, Hosseini SV, Hosseinzadeh M, Mehrabani D, Safarpour A, Sepehrimanesh M, Koohi-Hosseinabadi O, Najibi A. The healing effect of Hypericum perforatum extract on acetic acid-induced ulcerative colitis in rat. Ann Colorectal Res. 2014 Dec;2(4):e25188.
53. Hochain P, Capet C, Colin R. Digestive complications of aspirin. La Revue de Médecine Interne. 2000 Mar 1;21:50s-9s.
54. Toker G, Küpeli E, Memisoğlu M, Yesilada E. Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of Tilia argentea (silver linden). Journal of ethnopharmacology. 2004 Dec 1;95(2-3):393-7.
55. Telleria-Diaz A, Schmidt M, Kreusch S, Neubert AK, Schache F, Vazquez E, Vanegas H, Schaible HG, Ebersberger A. Spinal antinociceptive effects of cyclooxygenase inhibition during inflammation: Involvement of prostaglandins and endocannabinoids. Pain. 2010 Jan 1;148(1):26-35.
56. Alcaraz MJ, Hoult JR. Actions of flavonoids and the novel anti-inflammatory flavone, hypolaetin-8-glucoside, on prostaglandin biosynthesis and inactivation. Biochemical pharmacology. 1985 Jul 15; 34(14):2477-82.
57. Mahmoodi M, Mohammadi S, Zarei M. Antinociceptive effect of hydroalcoholic leaf extract of tribulus terrestris L. in male rat. Journal of Babol University of Medical Sciences. 2013 Nov 10;15(6):36-43.
58. Behzadi Rad N, Valizadeh Z, Rafeei Rad M. Effect of Hydroalcoholic Extract of Dodoneae viscosa on Pain and Anxiety in Male Rats. Journal of Medicinal Plants. 2018 Dec 10;17(68):157-65.
59. Joshi SD, Kulkarni VD, Kulkarni VH, Vagdevi HM, Vaidya VP, Veerapur VP, Badiger AM. Anti-nociceptive activity of various extracts of Dodonaea viscosa (L). Jacq., leaves. Journal of natural remedies. 2006 Jun 1;6(2):135.
60. Agrawal AD. Pharmacological activities of flavonoids: a review. Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol. 2011 Sep;4(2):1394-8.
61. Katzung BG. Basic and clinical pharmacology, New York, Conn Appleton and lang co. Nor walk, connecticl. 1995;466.
62. Rang HP, Ritter JM. Text book of pharmacology. New York: Churchill Livingston. 1999; 3:148-633.

63. Khani A, Khani S, Zarei S, Abedi H, Sadghi N, Ranjbar A. The mechanism of analgesic effect of Salvia macrosiphon methanol extract in formalin model in male rat. Pars Journal of Medical Sciences. 2022; 19(3): 22-29.
64. Asgari Nematian M, Mohammadi S. The analgesic effect of Echinophora platyloba hydroalcoholic extract in male rats. Journal of Babol University of Medical Sciences. 2016 May 10;18(5):31-7.
65. Fallahzadeh AR, Zarei M, Mohammadi S. Preliminary phytochemical screening, analgesic and anti-inflammatory effect of Eryngium pyramidale Boiss. & Husson essential oil in male rat. Entomology and Applied Science Letters. 2016; 3(5-2016):140-7.
66. Nascimento GE, Hamm LA, Baggio CH, De Paula Werner MF, Iacomini M, Cordeiro LM. Structure of a galactoarabinoglucuronoxylan from tamarillo (Solanum betaceum), a tropical exotic fruit, and its biological activity. Food chemistry. 2013 Nov 1;141(1):510-6.
67. Khan H, Saeed M, Khan MA, Dar A, Khan I. The antinociceptive activity of Polygonatum verticillatum rhizomes in pain models. Journal of ethnopharmacology. 2010 Feb 3;127(2):521-7.
68. Alibabaei Z, Pilehvarian AA, Shirani M, Kheiri S, Taji F, Asgari A, et al. Effect of Euphorbia helioscopia on acetic acid-induced abdominal constrictions in Balb/c mice. Journal Shahrekord University of Medical Sciences. 2010 Feb 25;11(4):9-14.
69. Zargari F. The role of oxidative stress and free radicals in diseases. Razi Journal Medical Sciences. 2022; 27(2):10-22
70. Hemmati Hassan Gavyar P, Armand N. Composition of essential oil, antioxidant activity and pheniol and flavonoied content of different part of Postia puberula at post flowering stage. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology). 2021; 34(3): 806-818.

Original Article

Antinociceptive effect of hydroalcoholic extract of Moringa (*Moringa oleifera*) in Male Rats

Received: 30/08/2024 - Accepted: 21/10/2024

Hamide Khajeh[1]
Salehe Ganjali[2]
Mahin Rigi[3]
Leila Ghafghazi[4]
Ayoub mazarei [5*]

[1] M. Sc. OF Agricultural Biotechnology Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran
[2] Assistant Professor Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Zabol, Iran
[3] Department of Aquatic Science, Hamon International Wetland Research Institute, Zabol Research Institute, Zabol , Iran
[4] Leila Ghafghazi4 :M. Sc. Graduate of Greenhouse Production Production, Department of Department of Horticultural Science. High School Secretary Zeinab, Zabul Education Management, Iran
[5] PhD Graduate of Biotechnology, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Zabol, Iran

Email: mazaraie70@gmail.com

Abstract

Introduction: The side effects of synthetic analgesics in clinical use as well as patients' growing interest in traditional medicine and natural products have drawn researchers' attention to studying the effects of natural pain relievers and comparing them with chemical and synthetic drugs. The aim of this study is to investigate some of the Chemical compounds and antinociceptive effects of hydroalcoholic extract of Moringa leaf on male rats.

Methods: In the present experimental study, 36 adult male rats were divided into 6 groups: control group, groups treated with the extract (100, 200 and 300 mg/kg), morphine (1 mg/kg) and naloxone (mg/kg) in combination with 300 mg/kg extract. The analgesic effects of HRC were assessed with writhing, tail-flick and formalin tests. The data were compared and investigated by One-way ANOVA and the Duncan test.

Results: The results showed that with increasing concentration of the extract compared to normal levels, the amount of phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity were increased; So that the highest amount of the above compounds was obtained during the concentration of 300 mg of the extract. In the Writhing test Moringa leaf extract significantly inhibited the number of contractions induced by acetic acid and All doses of HRC showed antinociceptive activity. In addition, doses of 200 and 300 mg/kg of the extract in tail flick test decreased the latency time from 2.83±0.01 to 5.66±0.9 and 6.26±1.05 sec in the control group ($p<0.01$), respectively. in addition, in the formalin test the extract decreased acute and chronic pain in all used concentrations compared to the control group. So that the highest effect was observed at dose of 300 mg/kg which reduced the pain score in the acute and chronic phase by approximately 1 unit and 1.2 unit compared to the control group.

Conclusion: The obtained data suggested that the analgesic effects of hydroalcoholic extract of Moringa oleifera may be mediated via both peripheral and central mechanisms. The presence of polyphenolic compounds might be responsible for the antinociceptive activity of this plant and therefore, by conducting additional research, it might be used as an analgesic drug.

Keywords: Analgesic effect, Polyphenolic compounds, Medicinal plant, Hydroalcoholic Extract.