

Original Paper

## Anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of *Ruscus aculeatus L* hydroalcoholic extract in male NMRI mice

Tara Daniari (M.Sc), M.Sc in Animal Physiology, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

ORCID ID: 0000-0002-8524-6602

\*Mina Ramezani (Ph.D), Corresponding Author, Associate Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. E-mail: m.ramezani@iauctb.ac.ir

ORCID ID: 0000-0002-9982-1276

Bahareh Pakpour (Ph.D), Assistant Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

ORCID ID: 0000-0001-6352-036X

---

### Abstract

**Background and Objective:** Due to the properties of herbal remedies and their lesser side effects than chemical drugs, much attention has now been paid to herbal treatments. The aim of this study was done to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract of aerial parts of *Ruscus aculeatus*.

**Methods:** This experimental study was performed on 80 male NMRI mice (6-8 weeks) weighing 23-25 gr. Animals were randomly allocated into 5 groups including: control group (distilled water), positive control group (morphine 10 mg/kg/bw in pain test and dexamethasone 15 mg/kg/bw in inflammatory test) and three groups receiving 75, 150 and 300 mg/kg/bw Hydroalcoholic extract of *Ruscus aculeatus L*. The pain was evaluated by formalin test and an investigation of inflammation conducted by xylene induced ear-edema.

**Results:** The hydroalcoholic extract of *Ruscus aculeatus L* significantly reduced acute pain at 300 mg/kg/bw in compared to control group ( $P<0.05$ ). Inhibition percent was 60% for acute pain and 85% in morphine group. Also, this plant caused significant reduction of formalin induced chronic pain at 150 and 300 mg/kg/bw doses in compared to the control group ( $P<0.05$ ). At 150 and 300 mg/kg doses of *Ruscus aculeatus L*, inhibition of chronic pain was 71%, and 94%, respectively in compared with 97% inhibition in morphine group.

**Conclusion:** Hydroalcoholic extract of *Ruscus aculeatus L* at the dose of 300 mg/kg/bw reduces acute and chronic pain and at the dose of 150 mg/kg/bw reduces acute pain in laboratory animals.

**Keywords:** Inflammation, Pain, Hydroalcoholic extract, *Ruscus aculeatus L*, Mice

---

Received 21 Oct 2018

Revised 23 Dec 2018

Accepted 5 May 2019

Cite this article as: Tara Daniari, Mina Ramezani, Bahareh Pakpour. [Anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of *Ruscus aculeatus L* hydroalcoholic extract in male NMRI mice]. J Gorgan Univ Med Sci. 2020 Winter; 21(4): 47-52. [Article in Persian]

## اثر ضد دردی و ضدالتهابی عصاره هیدروالکلی گیاه کوله خاس (*Ruscus aculeatus L*)

### در موش کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI

ORCID ID: 0000-0002-8524-6602

تارا دانیاری، کارشناس ارشد فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

ORCID ID: 0000-0002-9982-1276

\* دکتر مینا رضانی، دانشیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

ORCID ID: 0000-0001-6352-036X

دکتر بهاره پاکپور، استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** گیاه کوله خاس (*Ruscus aculeatus L*) از تیره مارچوبه در درمان بعضی از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های عروقی، لنفاوی و هموروئید مورد بررسی قرار گرفته است. این مطالعه به منظور تعیین اثر ضد دردی و ضدالتهابی عصاره هیدروالکلی گیاه کوله خاس در موش کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI انجام شد.

**روش بررسی:** این مطالعه تجربی روی ۸۰ سر موش کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI با سن تقریبی ۸-۶ هفته و وزن ۲۵-۲۳ گرم انجام شد. حیوانات برای هر تست به‌طور تصادفی به ۵ گروه ۸ تایی شامل گروه شاهد (دریافت کننده آب مقطر)، گروه کنترل مثبت (دریافت کننده مورفین با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در تست درد و دریافت کننده دگزامتازون با دوز ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در تست التهاب) و همچنین سه گروه دریافت کننده دوزهای ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی گیاه کوله خاس تقسیم شدند. بررسی درد توسط تست فرمالین و بررسی التهاب با تورم گوش القاشده با زایلین انجام شد.

**یافته‌ها:** عصاره هیدروالکلی کوله خاس باعث کاهش آماری معنی‌دار درد حاد در دوز ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به گروه شاهد گردید ( $P < 0/05$ ). درصد مهار درد حاد ۶۰ درصد در مقایسه با ۸۵ درصدی مهار درد توسط مورفین تعیین شد. همچنین این گیاه سبب کاهش آماری معنی‌دار درد مزمن ناشی از فرمالین در دوزهای ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به گروه شاهد گردید ( $P < 0/05$ ). دوز ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره به ترتیب باعث مهار ۷۱ درصدی و ۹۴ درصدی درد مزمن در مقایسه با ۹۷ درصدی کاهش درد توسط مورفین شدند.

**نتیجه‌گیری:** عصاره هیدروالکلی گیاه کوله خاس در دوز ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن باعث کاهش درد حاد و مزمن و در دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن سبب کاهش درد حاد در حیوانات آزمایشگاهی می‌گردد.

**کلید واژه‌ها:** التهاب، درد، عصاره هیدروالکلی، گیاه کوله خاس، موش کوچک آزمایشگاهی

\* نویسنده مسؤول: دکتر مینا رضانی، پست الکترونیکی [m.ramezani@iauctb.ac.ir](mailto:m.ramezani@iauctb.ac.ir)

نشانی: تهران، میدان پونک، بلوار امام حسن (ع)، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، گروه زیست شناسی، صندوق پستی ۷۶۷-۱۳۱۸۵، تلفن و نمابر ۰۲۱-۴۴۶۰۰۱۸۴

وصول مقاله: ۱۳۹۷/۷/۲۹، اصلاح نهایی: ۱۳۹۷/۱۰/۲، پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۲/۱۵

### مقدمه

بر اساس تعریف انجمن بین‌المللی مطالعه درد، درد یک احساس ناخوشایند و تجربه ذهنی است که با آسیب بالقوه یا واقعی بافتی ارتباط پیدا می‌کند. بر اساس این تعریف فرد می‌تواند بین دو نوع درد حاد (سریع) و مزمن (آهسته) تفاوت قایل شود. بیشتر بیماری‌های بدن منجر به درد می‌شود. انتشار درد با فعال شدن رسیپتورهای فیزیولوژیکی که نوسیسپتور نام دارد؛ آغاز می‌شود (۱ و ۲). درد حاصل از آسیب بافتی ناشی از محرک‌های شیمیایی، حرارتی، الکتریکی و مکانیکی است (۳).

التهاب به دو نوع مزمن و حاد تقسیم می‌شود. التهاب حاد پاسخ اولیه در مقابل آسیب بافتی است و وقتی ظاهر می‌شود که سلول‌های ایمنی در پاسخ به مواد محرک داخلی یا خارجی فعال شده باشند.

نتیجه این پاسخ می‌تواند مفید یا مضر باشد (۴).

التهاب مزمن از عوارض شایع بسیاری از بیماری‌ها است. یافته‌ای که در بسیاری از بیماری‌های شایع و مهم جوامع بشری مثل چاقی، دیابت و بیماری‌های عصبی مشاهده می‌شود. به همین دلیل، مطالعات مختلفی بر روی علل و اثرات آن بر بدن در شرایط مختلف پاتولوژیک انجام و پیشنهاد شده است که التهاب مزمن خفیف در پاتونز ایجاد این بیماری‌ها یا عوارض آنها نقش زیادی دارد (۳). مصرف داروهای ضد درد و ضد التهاب شیمیایی در مدت زمان طولانی باعث وابستگی یا عوارض جانبی شدید می‌شود. در صورتی که داروهای گیاهی به علت داشتن مواد موثر طبیعی و ترکیبات خاص این عوارض را نداشته و از تجمع مواد سمی در بدن جلوگیری کرده و باعث ایجاد تعادل بیولوژیکی می‌شود (۵).

شده از انستیتو پاستور کرج، در گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی طی سال ۱۳۹۶ انجام گردید. مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق (IR.IAU.SRB.REC.1397.120) دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی قرار گرفت.

پروتکل اخلاقی کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. یک هفته قبل از شروع آزمایش، موش‌ها در اتاق حیوانات در شرایط غذایی یکسان و دمای  $21 \pm 3$  درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند تا با محیط سازگار شوند.

**روش تهیه عصاره هیدروالکلی:** از اندام‌های هوایی گیاه کوله خاس (ساقه و برگ) استفاده شد. گیاه از کلاردشت که منطقه‌ای در استان مازندران است؛ جمع‌آوری شد. این گیاه در تمام فصول سبز است؛ اما زمان گلدهی آن مهر و آبان است. گیاه توسط واحد گیاه‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی تهران مرکزی شناسایی شد. سپس در سایه خشک و آسیاب گردید. برای عصاره‌گیری از اتانول ۷۰ درصد به روش پرکولاسیون استفاده گردید.

پس از عصاره‌گیری از هر ۲۰۰ گرم پودر گیاه کوله خاس، ۰/۲ گرم عصاره هیدروالکلی تولید شد.

**تست درد:** برای انجام تست درد ابتدا حیوان برای انطباق با شرایط محیط به مدت ۱۰ دقیقه در زیر قیف شیشه‌ای بر روی دستگاه تست درد قرار گرفت. برای تعیین اثر ضد دردی از آزمون فرمالین استفاده شد.

در آزمایش درد، موش‌ها به ۵ گروه ۸ تایی به شرح زیر تقسیم شدند.

گروه شاهد اول: دریافت کننده آب مقطر.

گروه کنترل مثبت اول: دریافت کننده مورفین با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به عنوان یک داروی شناخته شده ضد درد.

گروه تیمار اول: دریافت کننده عصاره هیدروالکلی کوله خاس با دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم.

گروه تیمار دوم: دریافت کننده عصاره هیدروالکلی کوله خاس با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم.

گروه تیمار سوم: دریافت کننده عصاره هیدروالکلی کوله خاس با دوز ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم.

سپس تست فرمالین از آنها به عمل آمد. همه تزریقات به صورت تک دوز و داخل صفاقی ۱۵ دقیقه قبل از تست فرمالین انجام شد (۱۴).

بلافاصله پس از تزریق، مجدداً حیوان برای انطباق با محیط در زیر قیف شیشه‌ای قرار داده شد. دستگاه تست درد یک جعبه شیشه‌ای به ابعاد  $30 \times 30 \times 30$  سانتی‌متر بود که قیف شیشه‌ای در سطح فوقانی قرار داشت و به منظور مشاهده بهتر حرکات، آینه‌ای با

گیاه کوله خاس یکی از گیاهان مثبت درمانی معرفی شده که در درمان بیماری‌های عروقی و لنفاوی مورد بررسی قرار گرفته و همچنین در درمان بواسیر نیز یک داروی مدر و ملین عنوان شده است. همچنین خواص مدر و ضدالتهابی یک ساپونین استروئیدی جدا شده از شیره ریزوم گیاه کوله خاس گزارش شده است (۶). به نظر می‌رسد که اندام‌های هوایی گیاه کوله خاس نیز دارای این خواص باشد.

کوله خاس با نام علمی *Ruscus aculeatus* L از خانواده Asparagaceae است. جنس *Ruscus* L متعلق به تیره مارچوبه، دارای شش گونه است که در سراسر دنیا پراکنده‌اند و دارای مشتقات استروئیدی، ساپونینی و گلیکوزیدی است. *Ruscus aculeatus* تنها گونه این جنس است که در ایران رشد می‌کند و به وفور در جنگل‌های شمالی و دره‌های مرطوب یافت می‌شود (۷). کوله خاس گیاهی پایا، چوبی، ایستاده با بوته‌های بهم‌فشرده، برگ‌ها با انشعابات کوتاه، نوک تیز، مثلثی و دارای گل‌های سبز رنگ کوچک و میوه‌هایی به رنگ قرمز مرجانی است (۸).

مطالعات آزمایشگاهی نشان داده عصاره این گیاه سبب تحریک گیرنده‌های آلفا آدرنژیک در ماهیچه‌های صاف دیواره عروق می‌گردد و در نتیجه باعث تقویت عروق سیاه رگی می‌گردد. ساپونین‌های کوله خاس هنگامی که به صورت دهانی مصرف شوند؛ جذب شده و برای درمان نارسایی عروقی قلبی مفید است (۹). تحقیقات زیادی در خصوص جدا سازی ترکیبات ساپونینی و استروئیدی از ریزوم گیاه انجام شده است. در مطالعاتی ۶ ساپونین اسپیرواستان و ۵ ساپونین فرواستان شناسایی شد (۱۰ و ۱۱). در تحقیق دیگری دو مشتق استروئیدی سولفات‌ها از این گیاه جداسازی و شناسایی گردید (۱۲).

ترکیبات شیمیایی عصاره *Ruscus aculeatus* L ترکیبی از استرول‌ها، اسیدهای چرب، مواد فنولی مانند اسید اسکوربیک، بتاکاروتن، کلسیم، کبالت، فیبر، اسید گلیکولیک، آهن، منیزیم، منگنز، فسفر، ریوفلاوین پتاسیم، روسکوژنین و روتینو است که اجزای فعال اولیه صابون‌های استروئیدی شناخته شده به نام روسکوژنین و نوروسکوژنین هستند. بیشتر اثر درمانی این گیاه به وجود ساپونین‌های استروئیدی است که تا ۶ درصد از وزن خشک گیاه را شامل می‌شود (۱۳). این مطالعه به منظور تعیین اثر ضد دردی و ضدالتهابی عصاره هیدروالکلی گیاه کوله خاس در موش کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI انجام شد.

### روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۸۰ سر موش کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI با سن تقریبی ۸-۶ هفته و وزن ۲۵-۲۳ گرم خریداری

خاس با دوز ۷۵ میلی گرم بر کیلو گرم.  
 گروه تیمار پنجم: دریافت کننده عصاره هیدرو الکلی کوله  
 خاس با دوز ۱۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم.  
 گروه تیمار ششم: دریافت کننده عصاره هیدرو الکلی کوله  
 خاس با دوز ۳۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم.  
 پس از تزریق و گذشت مدت زمان ۳۰ دقیقه برای اعمال اثر  
 تیمار، مقدار ۰/۰۳ ml زایلین به عنوان ماده التهاب آور، به سطح  
 قدامی و خلفی لاله گوش راست حیوان مالیده شد.  
 پس از گذشت مدت زمان دو ساعت، حیوانات کشته شدند و با  
 استفاده از چوب پنبه سوراخ کن، برش های ۷ میلی متری از هر دو  
 گوش حیوان تهیه و وزن شد. اختلاف وزن برش های گوش های  
 چپ و راست هر حیوان، میزان التهاب ایجاد شده در گوشی که  
 زایلین به آن تزریق شده بود را نشان می داد. در این مقایسه اختلاف  
 وزن بیشتر، نشان دهنده التهاب بیشتر است.  
 داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-16 و آزمون آنالیز  
 واریانس یک طرفه و آزمون توکی در سطح معنی داری کمتر از  
 ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

#### یافته ها

عصاره هیدرو الکلی کوله خاس باعث کاهش آماری معنی دار  
 درد حاد در دوز ۳۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن نسبت به گروه  
 شاهد گردید ( $P < ۰/۰۰۱$ ) (جدول یک). درصد مهار درد حاد ۶۰  
 درصد در مقایسه با ۸۵ درصدی مهار درد توسط مورفین تعیین شد.  
 همچنین این گیاه سبب کاهش آماری معنی دار درد مزمن ناشی

زاویه ۴۵ درجه زیر آن و روبروی مشاهده کننده قرار داشت.  
 ۳۰ دقیقه پس از تزریق عصاره، ۰/۰۲ میلی لیتر فرمالین ۲/۵ درصد به  
 زیر پوست کف پای راست حیوان به صورت زیرجلدی تزریق شد.  
 حیوان مجدداً در دستگاه تست درد در زیر قیف شیشه ای قرار داده  
 شد تا رفتار های حیوان مورد بررسی قرار گیرد. میانگین زمان  
 لیسیدن پا (Licking time) در فاصله زمانی ۱۵-۰ دقیقه به عنوان فاز  
 اول درد (درد حاد) و ۳۵-۲۰ دقیقه به عنوان فاز دوم درد (درد  
 مزمن) در نظر گرفته شد. بر این اساس فعالیت و حرکات موش در  
 هر ۱۵ ثانیه بررسی شد و امتیازدهی به روش زیر انجام شد.  
 امتیاز صفر: زمانی که موش به طور طبیعی روی پای خود قرار  
 می گیرد.  
 امتیاز یک: زمانی که پای موش مختصری روی زمین قرار دارد.  
 امتیاز دو: زمانی که پای حیوان از زمین کنده شده است.  
 امتیاز سه: زمانی که موش پای خود را گاز می گیرد یا لیس  
 می زند.

اعداد به دست آمده در مدت زمان های تعیین شده، محاسبه شد و  
 میانگین آنها ثبت گردید.

**تست التهاب:** برای سنجش میزان التهاب، موش ها به ۵ گروه ۸  
 تایی به شرح زیر تقسیم شدند.  
 گروه شاهد دوم: دریافت کننده آب مقطر.  
 گروه کنترل مثبت دوم: دریافت کننده دگزامتازون با دوز ۱۵  
 میلی گرم بر کیلو گرم به عنوان داروی شناخته شده ضد التهاب.  
 گروه تیمار چهارم: دریافت کننده عصاره هیدرو الکلی کوله

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار مدت زمان لیسیدن پا در بازه زمانی درد حاد و مزمن گروه های مورد مطالعه

گروه ها (n=۸)	درد حاد		درد مزمن	
	میانگین و انحراف معیار مدت زمان لیسیدن پا (ثانیه)	درصد مهار نسبت به شاهد	میانگین و انحراف معیار مدت زمان لیسیدن پا (ثانیه)	درصد مهار نسبت به شاهد
شاهد اول	۱۱/۲±۰/۴۹	-	۹/۱±۱/۲	-
کنترل مثبت اول	۱/۷±۰/۷۵ *	۸۵	۰/۲۵±۰/۱۶ *	۹۷
تیمار اول	۱۰/۱±۰/۸۹	۱۰/۹	۵/۳±۱/۸	۴۱
تیمار دوم	۸/۵±۰/۷۰	۲۴	۲/۶±۰/۸۴ *	۷۱
تیمار سوم	۴/۵±۰/۹۶ *	۶۰	۰/۵±۰/۱۸ *	۹۴

گروه شاهد اول: دریافت کننده آب مقطر؛ گروه کنترل مثبت اول: دریافت کننده مورفین با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلو گرم؛ گروه های تیمار اول، دوم  
 و سوم به ترتیب دریافت کننده عصاره هیدرو الکلی کوله خاس با دوزهای ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم  
 \*  $P < ۰/۰۰۱$  معنی داری در مقایسه با گروه شاهد اول

جدول ۲: میانگین و انحراف معیار تفاوت وزن گوش ها در تست زایلین گروه های مورد مطالعه

گروه ها (n=۸)	میانگین و انحراف معیار تفاوت وزن گوش ها (گرم)	درصد مهار نسبت به شاهد
شاهد دوم	۲/۴±۰/۵۱	-
کنترل مثبت دوم	۰/۹۲±۰/۱ *	۶۲
تیمار چهارم	۱/۱۸±۰/۴۳	۵۱
تیمار پنجم	۱/۴۱±۰/۶	۴۱
تیمار ششم	۱/۶±۰/۳۳	۳۳

گروه شاهد دوم: دریافت کننده آب مقطر؛ گروه کنترل مثبت دوم: دریافت کننده دگزامتازون با دوز ۱۵ میلی گرم بر کیلو گرم؛ گروه های تیمار  
 چهارم، پنجم و ششم به ترتیب دریافت کننده عصاره هیدرو الکلی کوله خاس با دوزهای ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم  
 \*  $P < ۰/۰۰۱$  معنی داری در مقایسه با گروه شاهد دوم

از فرمالین در دوزهای ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به گروه شاهد گردید ( $P < 0/001$ ) (جدول یک). دوز ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره به ترتیب باعث مهار ۷۱ درصدی و ۹۴ درصدی درد مزمن در مقایسه با ۹۷ درصدی کاهش درد توسط مورفین شدند.

بین گروه کنترل مثبت و گروه های دریافت کننده دوزهای ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره، تفاوت آماری معنی داری یافت نشد.

در تست التهاب، اگرچه گروه های دریافت کننده عصاره کاهش التهاب را نسبت به گروه کنترل نشان دادند؛ ولی این کاهش از نظر آماری معنی دار نبود (جدول ۲).

### بحث

با توجه به نتایج این مطالعه عصاره هیدروالکلی گیاه کوله خاس در دوز بالا در مهار دردهای حاد و مزمن به طور معنی داری موثر بود. به طوری که در دوز ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره، باعث مهار ۶۰ درصد درد حاد در مقایسه با ۸۵ درصدی مهار درد توسط مورفین شد. همچنین دوز ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره به ترتیب باعث مهار ۷۱ درصد و ۹۴ درصد درد مزمن در مقایسه با ۹۷ درصدی کاهش درد توسط مورفین شد.

یکی از ویژگی های تست فرمالین این است که چونندگان دو پاسخ جداگانه به درد نشان می دهند که این دو پاسخ دو مکانیسم دارد. مرحله اول بلافاصله بعد از تزریق فرمالین ظاهر می شود که به مدت ۳ الی ۵ دقیقه طول می کشد. ظاهراً این درد به علت تحریک شیمیایی گیرنده های درد است. بعد از ۱۵ الی ۲۰ دقیقه، فاز دوم درد شروع می شود و حیوان دوباره شروع به لیسیدن کف پای خود می کند که حدوداً ۲۰ الی ۴۰ دقیقه طول می کشد. به نظر می رسد که فرایندهای التهابی محیطی در این فاز دخیل هستند. بنابراین دو نوع درد با دو مکانیسم مختلف وجود دارد (۱۵).

مرحله اول درد در تست فرمالین مطابق درد حاد نوروزنیک است که به داروهای حساس است که از طریق سیستم اپیوئیدی عمل می کنند. مرحله دوم درد، همان درد التهابی است که هم توسط اپیوئیدها و هم داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی مهار می شود. موادی مثل مورفین که اصولاً به عنوان داروهای ضددرد مرکزی عمل می کنند؛ هر دو مرحله را مهار می کنند. در حالی که فاز مزمن درد توسط داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی و استروئیدها مهار می گردد که با بلوکه کردن رسپتور و یا مهار آزادسازی یا تولید میانجی های درد صورت می گیرد (۱۶).

علت مهار درد در فاز مزمن توسط داروهای ضد التهابی آن است که این داروها با بلوکه کردن سنتز پروستاگلاندین ها از پر دردی ناشی از التهاب جلوگیری می کنند (۱۷).

مهار درد در فاز اول و دوم می تواند بیانگر این مطلب باشد که عصاره گیاه، اثر ضد دردی خود را هم از طریق سیستم اپیوئیدی و هم از طریق مهار سنتز یا آزادسازی میانجی گریهای التهاب اعمال می کند. در مورد التهاب نیز عصاره هیدروالکلی باعث کاهش جزئی التهاب شد که البته کاهش آن نسبت به گروه کنترل معنی دار نبود.

مهم ترین ترکیبات موثره این گیاه ساپونین های استروئیدی روسکوژنین و نوروسکوژنین بوده که تا ۶ درصد وزن خشک گیاه است؛ اما ترکیبات دیگری هم شامل ساپونین ها، استرول ها، تری ترین ها، فلاونوئیدها و کومارین ها نیز جدا شده اند (۱۰).

در مطالعه Balica و همکاران اثر ضد التهابی وابسته به دوز یک ساپونین استروئیدی جدا شده از شیره ریزوم گیاه کوله خاس در التهاب حاد ایجاد شده با کاراجنین نشان داده که مکانیسم احتمالی آن مهار فعالیت پروستاگلاندین است (۱۸). در این مطالعه نیز علت مهار درد در فاز دوم یا التهابی آن است که احتمالاً عصاره اثر ضد دردی خود را از طریق مهار سنتز یا آزادی پروستاگلاندین و میانجی گریهای التهاب اعمال نموده است.

خواص مدر و ضد التهابی یک ساپونین استروئیدی جدا شده از شیره ریزوم گیاه کوله خاس با سنجش پاسخ آنتی اکسیدانی و ظرفیت فاگوسیت کنندگی و پاسخ التهابی سلول های مغز استخوان گزارش شده است (۶).

در مطالعه حاضر با تست تورم القا شده با زایلین در گوش موش، خواص ضد التهابی معنی داری مشاهده نشد؛ ولی در فاز دوم یا التهابی درد، اثرات ضد التهابی به صورت وابسته به دوز مشاهده شد که علت آن می تواند به خاطر کمتر بودن درصد ساپونین ها در اندام های هوایی نسبت به ریزوم گیاه باشد.

ساپونین از دسته استروئید و گلیکوزیدهای تریپنوئیدی است. ساپونین موجود در گیاهان دارویی پس از تجزیه بیولوژیکی در دستگاه گوارش، ساپونینوزن را به عنوان جزء فعال بیولوژیکی می سازند (۱۹). اثر ضد دردی و ضد التهابی ساپونین های جدا شده از سایر گیاهان نیز گزارش شده است (۲۰).

### نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی بخش های هوایی گیاه کوله خاس دارای خواص قوی ضد دردی و تا حدی ضد التهابی است و ممکن است بتواند جایگزین مناسبی برای داروهای ضددرد اپیوئیدی باشد. احتمالاً این اثرات را بتوان به وجود مهم ترین ماده موثره این گیاه یعنی ساپونین های استروئیدی نسبت داد. با توجه به مطالعات اندکی که بر روی این گیاه انجام شده؛ واضح است که اثبات آن نیاز به شناخت دقیق مواد موثره گیاه، مکانیسم عمل آنها و انجام آزمایشات بالینی دارد.

بدین وسیله از همه کارکنان آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند؛ صمیمانه تشکر می‌نماییم.

## تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه پایان نامه (شماره ۱۰۱۳۱۹۹۵۲۰۰۶) خانم تارا دانیاری برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته فیزیولوژی از گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی بود.

## References

- Swieboda P, Filip R, Prystupa A, Drozd M. Assessment of pain: types, mechanism and treatment. *Ann Agric Environ Med*. 2013; Spec no. 1: 2-7.
- Karami M, Gohari AR, Ebrahimzadeh MA, Danaei GH, karimloo S. [Pathophysiology of pain and effective drugs to control it]. *Clinical Excellence*. 2016; 5(2): 28-44. [Article in Persian]
- Breivik H, Borchgrevink PC, Allen SM, Rosseland LA, Romundstad L, Breivik Hals EK, et al. Assessment of pain. *Br J Anaesth*. 2008 Jul; 101(1): 17-24. <https://doi.org/10.1093/bja/aen103>
- Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*. 2002 Dec; 420(6917): 846-52. doi: 10.1038/nature01320
- Hall J. Guyton and Hall textbook of medical physiology. 13<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders Company. 2015; p: 926.
- Vostinaru O, Balica G, Parvu AE, Mogosan C, Cazacu I, Pop C, et al. Diuretic and anti-inflammatory effects of a crude steroidal saponin from the rhizomes of *Ruscus aculeatus* L. in rats. *Farmacia*. 2017 May; 65(3): 467-71.
- Asghari Zh, Mahmoudi Alami M, Mazaheri Tehrani M. [Investigation of steroidal saponins in rhizome of *Ruscus aculeatus* L. in northern Iran (Savadkouh city)]. *ECO phytochemistry of medicinal plants*. 2015; 3(2): 28-38. [Article in Persian]
- Masullo M, Pizza C, Piacente S. *Ruscus* Genus: A Rich Source of Bioactive Steroidal Saponins. *Planta Med*. 2016 Dec; 82(18): 1513-24. doi: 10.1055/s-0042-119728
- Rubanyi G, Marcelon G, Vanhoutte PM. Effect of temperature on the responsiveness of cutaneous veins to the extract of *Ruscus aculeatus*. *Gen Pharmacol*. 1984; 15(5): 431-34.
- Mimaki Y, Kuroda M, Kameyama A, Yokosuka A, Sashida Y. Steroidal saponins from the underground parts of *Ruscus aculeatus* and their cytostatic activity on HL-60 cells. *Phytochemistry*. 1998 Jun; 48(3): 485-93.
- Mimaki Y, Kuroda M, Yokosuka A, Sashida Y. A spirostanol saponin from the underground parts of *Ruscus aculeatus*. *Phytochemistry*. 1999 Jul; 51(5): 689-92.
- Oulad-Ali A, Guillaume D, Belle R, David B, Anton R. Sulphated steroidal derivatives from *Ruscus aculeatus*. *Phytochemistry*. 1996 Jun; 42(3): 895-97. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00039-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00039-9)
- Palazón J, Moyano E, Bonfill M, Osuna LT, Cusidó RM, Piñol MT. Effect of organogenesis on steroidal saponin biosynthesis in calli cultures of *Ruscus aculeatus*. *Fitoterapia*. 2006 Apr; 77(3): 216-20. doi: 10.1016/j.fitote.2006.02.005
- Ramezani M, Amin G, Jalili E. [Antinociceptive and anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract of *Vitex agnus castus* fruit in mice]. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2010; 11(4): 46-51. [Article in Persian]
- Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992 Oct; 51(1): 5-17.
- Rosland JH, Hunskaar S, Hole K. Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently in mice. *Pharmacol Toxicol*. 1990 May; 66(5): 382-86.
- Zeashan H, Amresh G, Rao CV, Singh S. Antinociceptive activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. *J Ethnopharmacol*. 2009 Apr; 122(3): 492-96. doi: 10.1016/j.jep.2009.01.031
- Balica G, Vostinaru O, Tamas M, Crisan G, Mogosan C. Anti-inflammatory effect of the crude steroidal saponin from the rhizomes of *Ruscus aculeatus* L. (Ruscaceae) in two rat models of acute inflammation. *J Food Agric Environ*. 2013 Jul; 11(3&4): 106-108. <https://doi.org/10.1234/4.2013.4612>
- Choi J, Jung HJ, Lee KT, Park HJ. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the saponin and saponins obtained from the stem of *Akebia quinata*. *J Med Food*. 2005; 8(1): 78-85. doi: 10.1089/jmf.2005.8.78
- Chindo B, Anuka J, Isaac E, Ahmadu A, Tarfa F, Gamaniel K. Saponins are involved in the analgesic and anti-inflammatory properties of *Ficus platyphylla* stem bark. *Int J Biol Chem Sci*. 2010; 4(2): 415-23. <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v4i2.58140>