مقاله پژوهشی

بررسی اثرات محیطی اسانس لیموترش (Citrus limon) بر درد پیکری در رت‌های نر نژاد ویستار: نقش سیستم هیستامینرژیک

علی مجتهدین*

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی مغان، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۱/۲۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۵/۰۲

چکیده

زمینه و هدف: از گیاهانی که در طب سنتی به اثرات ضد دردی آن اشاره‌شده لیموترش (Citrus limon) است؛ اما پژوهش‌های اندکی در مورد مکانیسم عمل آن با تأکید بر سیستم‌های نوروترنسمیتری انجام‌گرفته است؛ بنابراین در تحقیق حاضر اثرات محیطی اسانس لیموترش بر درد پیکری با استفاده از آزمون فرمالین با تأکید بر سیستم نوروترنسمیتری هیستامینرژیک در رت‌های نر نژاد ویستار بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، تعداد ۶۰ سر رت نر با وزن ۲۵۰- ۲۰۰ گرم در محدوده سنی ۱۶-۱۴ هفته در ۱۰ گروه شامل: شاهد (سالین نرمال+ فرمالین ۱٪ کف‌پایی)، ۳ گروه تیمار با اسانس لیموترش (۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم به کیلوگرم)، ۳ گروه تیمار با کلرفنیرآمین (۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم به کیلوگرم)، یک گروه تیمار با هیستامین (۱۰ میلی‌گرم به کیلوگرم)، یک گروه پیش تیمار با کلرفنیرآمین (۲۰ میلی‌گرم) + اسانس لیموترش (۵۰ میلی‌گرم)، یک گروه پیش تیمار با هیستامین (۱۰ میلی‌گرم) + اسانس لیموترش (۵۰ میلی‌گرم) تقسیم شدند. جهت ارزیابی درد پیکری از آزمون فرمالین استفاده شد. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه انجام گردید.

نتایج: تزریق داخل صفاقی اسانس لیموترش موجب کاهش پاسخ درد در هر دو مرحله اول و دوم گردید ($P<0/05$). پیش تیمار با کلرفنیرآمین و سپس اسانس لیموترش موجب تقویت پاسخ ضد دردی اسانس در هر دو مرحله اول و دوم درد فرمالینی گردید ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: اسانس لیموترش اثرات ضد دردی داشته که احتمالاً این اثرات با به‌کارگیری سیستم هیستامینی ایجاد می‌شود.

کلمات کلیدی: لیموترش، درد پیکری، سیستم هیستامینرژیک، آزمون فرمالین

مقدمه

درد یکی از مشکلات اصلی سلامت عمومی جوامع است، هرچند که به‌عنوان شاخصی برای شناسایی بیماری در نظر گرفته می‌شود. درد عمدتاً یک مکانیسم حفاظتی برای بدن است و به دنبال آسیب دیدن بافت‌ها ایجاد می‌گردد و بدین ترتیب شخص را وادار به واکنش به‌منظور برداشتن محرک درد زا می‌کند (۱). درد عمدتاً به دو صورت حاد و مزمن بروز می‌کند که درهرصورت باعث ایجاد مشکلاتی در انسان می‌شود که می‌تواند به‌عنوان یک عامل محدودکننده یا ناتوان‌کننده مانع از انجام فعالیت‌های روزمره شود. به همین علت انسان از زمانی که درد را شناخت در پی پیدا کردن راهی برای یافتن علت آن و چگونگی بر طرف کردن آن بوده است. در طی بررسی به‌عمل‌آمده توسط انجمن درد آمریکا فقط در آمریکا پنجاه میلیون نفر در سنین مختلف از درد رنج می‌برند که برای کنترل کردن درد آن‌ها بیش از ۱۰۰ میلیون دلار هزینه می‌شود (۲، ۳). حس درد پاسخ یک قسمت و یا کل سیستم عصبی به تحریکات آسیب‌رسان است و شامل چهار روند فیزیولوژیک تبدیل، انتقال، تنظیم و درک سیگنال‌های عصبی است. در روند تبدیل، انرژی محرک آسیب‌رسان در گیرنده‌های درد به فعالیت الکتریکی تبدیل می‌شود. در انتقال، امواج عصبی به‌وسیله سیستم عصب محیطی منتقل می‌شوند. تنظیم از راه سیستم نزولی ضد درد آخرین مرحله در تجربه درد آگاهانه درونی و عاطفی درد بوده و نتیجه آن تغییر رفتار طبیعی حیوان و بروز نشانه‌های درد است (۴). درد را می‌توان به دو دسته‌ی نوسی‌سپتیو[1] و نوروپاتیک[2] تقسیم نمود. درد نوع اوّل

* **نویسنده مسئول: علی مجتهدین**، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی مغان، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران Email: a_mojtahedin@uma.ac.ir

[1] Nociceptive
[2] Neuropathic

حاصل فعال‌سازی گیرنده‌های نوسی‌سپتور موجود در پوست یا بافت نرم در پاسخ به محرک‌های مضر (به‌عنوان‌مثال آسیب‌دیدگی، بیماری‌ها و التهاب) است. درد پیکری نوعی از درد نوسی‌سپتیو است و در صورت تحریک شدن گیرنده‌های نوسی‌سپتور موجود در پوست، عضلات، مفاصل، تاندون‌ها و استخوان‌ها درد پیکری ایجاد می‌گردد؛ که خود به دو نوع تقسیم می‌گردد. درد پیکری سطحی[1] و درد پیکری عمیق[2]. چنانچه درد از نواحی سطح پوست، بافت زیرجلدی و غشای مخاطی باشد، درد سطحی پیکری نامیده می‌شود. دردهای سطحی پیکری عبارت‌اند از: ۱- دردهای سوزنی یا درد نوع اوّل[3]. ۲- دردهای سوزشی یا درد نوع دوّم[4]. درصورتی‌که درد از نواحی ماهیچه، مفاصل، بافت همبند، تاندون و استخوان‌ها باشد، درد پیکری عمیق نامیده می‌شود (۵). انتقال اطلاعات حسی- پیکری مربوط به فرآیند درد با آزاد شدن نوروترنسمیترهای درون‌زاد همراه است. این نوروترنسمیترها در سطح نخاعی و مغزی عمل نموده و اثرات تحریکی و یا مهاری در پذیرش حس درد ایجاد می‌نمایند. مجموعه‌ای از این نوروترنسمیترها شامل، استیل کولین، گلوتامات، آسپارتات، گابا، گلیسین، ماده P، اوپیوئیدها، سروتونین، نور اپی نفرین، دوپامین، ATP، نیتریک اکساید و هیستامین می‌باشند که در تحقیقات مربوط به درد موردتوجه قرار می‌گیرند (۶-۸). امروزه عمدتاً کنترل درد از طریق مصرف داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی و داروهای اپیوئیدی صورت می‌گیرد (۲). از عوارض ناخواسته این داروها می‌توان به ایجاد اختلالات دستگاه‌های گوارش، تنفس، ادراری و عصبی اشاره نمود. ضمناً مصرف مزمن برخی از این داروها وابستگی روانی ایجاد می‌کند (۹). در سال‌های اخیر بهره‌گیری از طب سنتی و گیاهان دارویی به دلیل دارا بودن خواص متعدد درمانی به‌ویژه کم بودن عوارض جانبی آن‌ها موردتوجه محققین قرارگرفته است. در مسئله درد نیز به خواص کاهنده و یا از بین برنده درد توسط برخی گیاهان توجه شده است. ازاین‌رو طب سنتی و گیاهان دارویی منبع مناسبی جهت یافتن داروهای ضد درد بوده تا از این طریق بتوان جایگزین مناسبی برای داروهای سنتتیک با عوارض جانبی ناخواسته ارائه نمود. یکی از گیاهانی که در طب سنتی به اثرات ضد دردی آن اشاره‌شده لیموترش[5] از خانواده Rutaceae است. لیموترش یکی از گونه‌های بسیار مهم جنس Citrus است که در نقاط مختلف دنیا مورداستفاده قرارگرفته است. درخت لیموترش، درختی است کوچک و به ارتفاع ۴ تا ۵ متر که ریشه قوی، منشعب و به رنگ سفید مایل به زرد دارد. ساقه آن راست، دارای شاخه‌های خاردار (مخصوصاً در انواع نیمه وحشی) و برگ‌های آن متناوب، شفاف، به رنگ سبز مایل به زرد، دندانه‌دار و یا کامل است. گل‌های آن متعدد، دارای بوی ضعیف و شامل گلبرگ‌هایی با سطح داخلی سفیدرنگ است. میوه آن به رنگ زرد روشن (پس از رسیدن)، دارای پولپ ترش‌مزه و مطبوع و محتوی دانه‌هایی با طعم بسیار تلخ است (۱۰، ۱۱). بخش‌های مختلف این گیاه جهت مصارف گوناگون درمانی به کار گرفته‌شده است. از جمله بخش‌های هوایی گیاه (برگ‌ها)، پوسته برای درمان چاقی، دیابت، کاهش چربی خون، بیماری‌های قلبی و عروقی، اختلالات مغزی و انواعی از سرطان‌ها استفاده گردیده است (۱۲). اسانس لیموترش از برگ‌ها و پوسته آن از طریق تقطیر با بخار به دست می‌آید. این اسانس دارای ترکیبات متنوعی است و دارای ۹۲ تا ۹۵ درصد از ترپن‌های مختلف است. گزارش‌های به‌دست‌آمده نشان‌دهنده وجود بیش از ۵۰ ترکیب در اسانس از جمله لیمونن، گاما ترپینن، سیترال، لینالول، بتا کاریوفیلن بوده که عمده‌ترین آن‌ها لیمونن است. هرکدام از این ترکیبات دارای اثرات مختلفی بوده‌اند که در گزارش‌ها به آن‌ها اشاره‌شده است. برای مثال بتاکاریوفیلن، لیمونن و لینالول دارای اثرات ضدالتهابی از طریق مهار فعالیت لیپوکسی ژناز، آلفا پینن و بتا پینن دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی از طریق مهار سنتز نیتریک اکساید و اخیراً گزارش‌شده است که بتا پینن دارای اثرات آنتی اسپاسمودیک در ایلئوم موش صحرایی و نیز اثرات ضد دردی است (۱۰، ۱۱). مطالعات نشان می‌دهد گاما ترپینن به‌عنوان یک مونوترپن مشابه لیمونن اثرات ضد دردی را در مدل درد شیمیایی از طریق مداخله سیستم اوپیوئیدی و کولینرژیک ایجاد نموده است (۱۳). در یک تحقیق به اثرات ضد دردی لینالول یا اسانس برگاموت در آزمون درد فرمالینی و ارتباط آن با سیستم اوپیوئیدی اشاره‌شده است (۱۴). در یک مطالعه اخیر گزارش‌شده است اسانس لیموترش اثرات ضد دردی در آزمون درد فرمالینی داشته است (۱۵). در پژوهش دیگری بیان‌شده است که استفاده استنشاقی از اسانس لیموترش موجب افزایش بیان ژن c-Fos در قشر سینگولای قدامی شده و اثرات ضد دردی را از طریق مسیر مهارکننده نزولی

[1] - Superficial Somatic Pain
[2] - Deep Somatic Pain
[3] - Pricking
[4] - Burning
[5] - Citrus limon

درد ایجاد نموده است (۱۶). با توجه به تحقیقات صورت گرفته در رابطه با اثرات ضد دردی لیموترش و بررسی اندک مکانیسم‌های نوروترنسمیتری مرتبط با درد در این مطالعات از جمله سیستم هیستامینرژیک، هدف از تحقیق حاضر بررسی اثرات اسانس لیموترش بر درد پیکری با استفاده از روش تجربی آزمون فرمالین با تأکید بر سیستم نوروترنسمیتری هیستامینرژیک در رت‌های نر نژاد ویستار است.

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این مطالعه تجربی از ۶۰ سر رت سالم نژاد ویستار و از جنس نر با وزن بین ۲۵۰–۲۰۰ گرم در محدوده سنی ۱۶-۱۴ هفته استفاده گردید. حیوانات در اتاق پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی در شرایط استاندارد در قفس‌های مخصوص از جنس پلی‌پروپیلن در گروه‌های شش‌تایی با درجه حرارت محیطی ۲۳-۲۰ درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعت (زمان شروع روشنایی ۰۰: ۰۷) با دسترسی آزادانه به آب و غذای پلتی استاندارد نگهداری شدند. کلیه آزمایش‌ها روی حیوانات با رعایت اصول اخلاقی و ثبت‌شده بین‌المللی کار با حیوانات آزمایشگاهی و مطابق با راهنمای انستیتوی ملی سلامت انجام شد.

گروه‌های آزمایشی

در این پژوهش گروه‌های آزمایشی در ۱۰ گروه شامل: یک گروه شاهد (سالین نرمال داخل صفاقی + فرمالین ۱٪)، ۳ گروه تیمار با اسانس لیموترش (۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم به کیلوگرم، داخل صفاقی)، ۴ گروه تیمار شامل ۳ گروه با کلرفنیرآمین (۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم به کیلوگرم، داخل صفاقی) به‌تنهایی و یک گروه هیستامین (۱۰ میلی‌گرم به کیلوگرم، داخل صفاقی) به‌تنهایی، یک گروه پیش تیمار با کلرفنیرآمین (۲۰ میلی‌گرم) و سپس تیمار اسانس لیموترش (۵۰ میلی‌گرم)، یک گروه پیش تیمار با هیستامین (۱۰ میلی‌گرم) و سپس تیمار اسانس لیموترش (۵۰ میلی‌گرم) تقسیم شدند.

داروهای استفاده شده

سالین نرمال استریل (محلول کلرور سدیم ۰/۹٪)، اسانس لیموترش تهیه‌شده از شرکت باریج اسانس ایران، کلرفنیرآمین، آنتاگونیست گیرنده H_1 هیستامینی (سیگما-آلدریچ، آلمان)، هیستامین دی هیدروکلراید (سیگما-آلدریچ، آلمان)، محلول فرمالین (فرمالین ۳۷٪، مرک آلمان). همه داروها از شرکت سیگما – آلدریچ آلمان خریداری گردید. داروها در محلول سالین نرمال حل گردیده و به‌صورت داخل صفاقی تزریق شدند.

روش بررسی و ایجاد درد

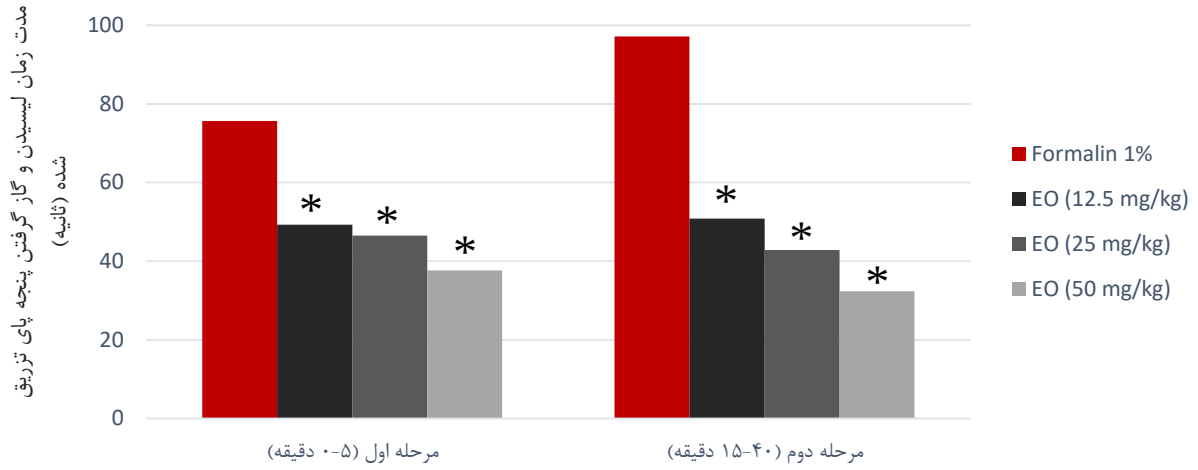
در این مطالعه قبل از انجام آزمایش، حیوانات سه روز متوالی و هر روز ۳۰ دقیقه در محفظه‌ای از جنس پلکسی گلاس در ابعاد ۲۵×۳۰×۳۰ سانتی‌متر به‌منظور سازگاری حیوانات با روش کار و به حداقل رساندن تأثیر عوامل کاهش‌دهنده درد مثل استرس محیط جدید، قرار گرفتند. در این تجربه برای ایجاد و بررسی درد پیکری از تزریق کف‌پایی فرمالین استفاده شد که به آزمون فرمالین معروف است که توسط Dubuisson & Dennis ابداع‌شده است. آزمون فرمالین مدل حیوانی مهم در مطالعه درد حاد التهابی طولانی‌مدت است (۱۷). برای ارزیابی درد فرمالینی از وسیله‌ای به نام دستگاه آینه درد استفاده شد. این دستگاه از قسمت‌های زیر تشکیل‌شده است: یک چهارچوب فلزی حاوی یک شیار برای قرار دادن شیشه، یک محفظه مکعب مستطیل از جنس پلکسی گلاس در ۲۵×۳۰×۳۰ سانتی‌متر جهت قرار دادن حیوان، یک آینه که با زاویه ۴۵ درجه در چهارچوب دستگاه قرار می‌گیرد. آینه باعث مشاهده حیوان از سطح شکمی آن می‌شود. پس از سپری شدن ۳۰ دقیقه دوره آداپتاسیون در داخل محفظه، حیوان به‌آرامی بیرون آورده شده و پس از مقید نمودن با دست، محلول فرمالین ۱ درصد به حجم ۵۰ میکرولیتر با استفاده از سر سوزن شماره ۲۹ به‌صورت زیر جلدی در سطح شکمی کف پای راست تزریق شد (۲۰- ۱۸). رفتار درد شامل لیسیدن و گاز گرفتن پنجه پای تزریق‌شده در فواصل زمانی ۵ دقیقه‌ای برای مدت ۱ ساعت ثبت شد (۲۱، ۲۲). در مطالعه حاضر پس از بررسی آماری داده‌ها، فاصله زمانی ۵ – ۰ دقیقه پس از تزریق فرمالین نشان‌دهنده مرحله اول (مرحله نوروژنیک) و داده‌های به‌دست‌آمده در فاصله زمانی ۴۰– ۱۵ دقیقه پس از تزریق فرمالین به‌عنوان مرحله دوم (مرحله التهابی) در آزمون درد فرمالینی در نظر گرفته شد. به‌عبارتی‌دیگر، در آزمون درد فرمالینی تزریق زیر جلدی محلول فرمالین به کف پای حیوان یک الگوی دومرحله‌ای از رفتارهای درد را به‌صورت مرحله اول یا نوروژنیک یا مرحله کوتاه‌مدت و مرحله دوم یا مرحله التهابی یا طولانی‌مدت را ایجاد می‌کند.

نتایج به‌دست‌آمده در نرم‌افزار SPSS 19 با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و سپس آزمون دانکن تجزیه‌وتحلیل گردیده و

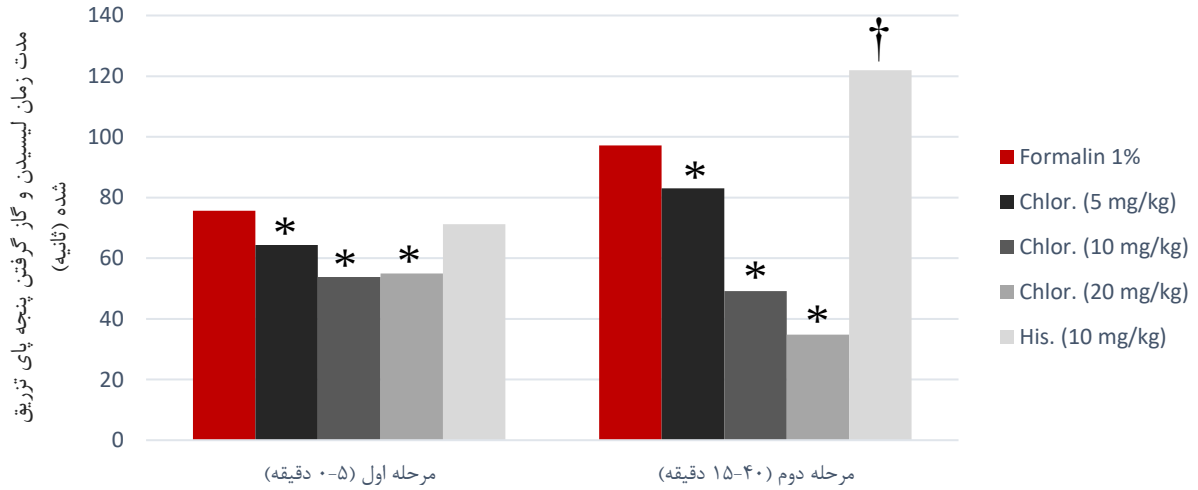
نمودارها با نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ رسم شدند. همه داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف استاندارد بیان‌شده و در سطح معنی‌دار P<۰/۰۵ ارزیابی شدند (۲۳).

نتایج

پس از تزریق کف‌پایی فرمالین ۱ درصد، مدت‌زمان لیسیدن و گاز گرفتن پنجه پای تزریق‌شده در مراحل اول و دوم به ترتیب ۳/۲۴ ± ۷۵/۶۷ و ۵/۲۷ ± ۹۷/۱۷ ثانیه به دست آمد. تزریقات داخل صفاقی اسانس لیموترش در مقادیر ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) موجب کاهش پاسخ درد در هر دو مرحله اول و دوم درد فرمالینی نسبت به گروه شاهد گردید. مقدار ۵۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن از اسانس لیموترش نسبت به سایر مقادیر بیشترین تأثیر را بر کاهش پاسخ درد در هر دو مرحله اول و دوم درد فرمالینی داشت (نمودار ۱). تزریقات داخل صفاقی کلرفنیرآمین در مقادیر ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم



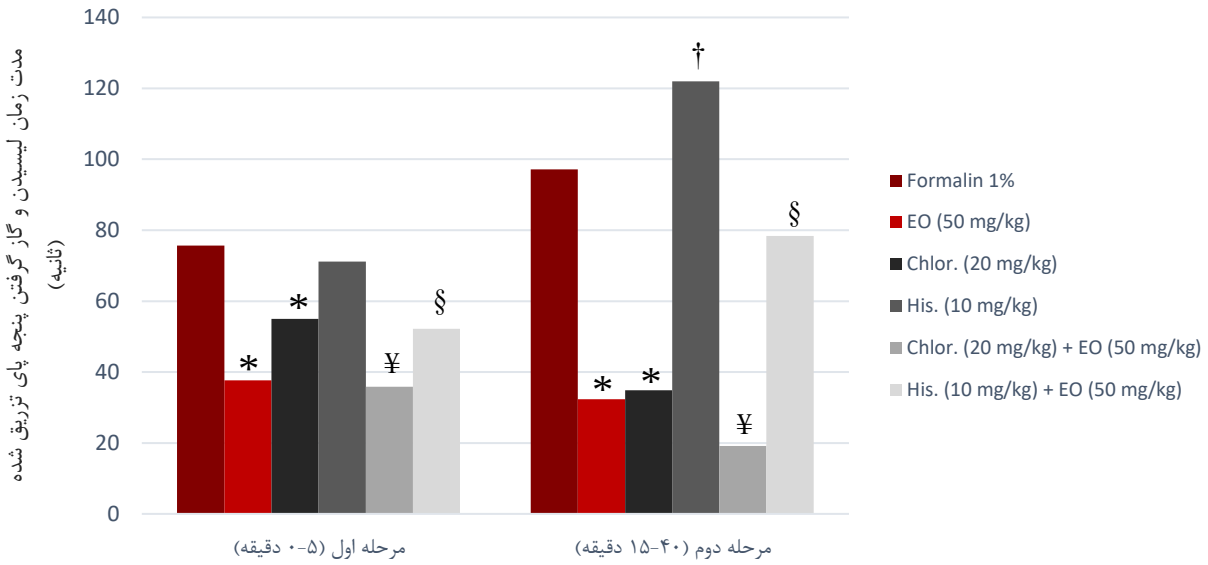
نمودار ۱- مقایسه اثرات تزریق داخل صفاقی دوزهای مختلف اسانس لیموترش بر مراحل اول و دوم درد فرمالینی
*) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح P< ۰/۰۵ با گروه فرمالین ۱٪ است.



نمودار ۲- مقایسه اثرات تزریق داخل صفاقی دوزهای مختلف کلرفنیرآمین و هیستامین (۱۰ میلی‌گرم) بر مراحل اول و دوم درد فرمالینی.
*) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح P< ۰/۰۵ با گروه فرمالین ۱٪ است.
†) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح P< ۰/۰۵ با گروه فرمالین ۱٪ است.

وزن بدن موجب کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۵) پاسخ درد در هر دو مرحله اول و دوم شد. تزریق داخل صفاقی هیستامین به مقدار ۱۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن بدون تأثیر بر مرحله اول، به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) موجب افزایش پاسخ درد در مرحله دوم گردید (نمودار ۲). پیش تزریق کلرفنیرآمین (۲۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن) قبل از اسانس لیموترش (۵۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن) موجب کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۵) در هر دو مرحله اول و دوم درد نسبت به کلرفنیرآمین به‌تنهایی شد. پیش تزریق هیستامین (۱۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن) قبل از اسانس لیموترش (۵۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن) نسبت به هیستامین به‌تنهایی، موجب کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۵) در پاسخ درد در هر دو مرحله اول و دوم درد فرمالینی گردید (نمودار ۳).

درد بسیار شدید بود، می‌توان نتیجه گرفت که درد به‌صورت دومرحله‌ای (مرحله اول ۵-۰ دقیقه و مرحله دوم ۴۰-۱۵ دقیقه پس از تزریق) ایجادشده و بین دو مرحله مذکور پاسخ درد کاهش‌یافته است. پس از تزریق فرمالین در غلظت‌های ۱، ۲/۵ و ۵ درصد و به حجم‌های ۲۰ و ۵۰ میکرولیتر در موش‌های سوری و رت بروز واکنش‌های درد به‌صورت دومرحله‌ای گزارش‌شده است (۱۹، ۲۱، ۲۲). باوجوداین در حیواناتی مثل خرگوش و گوسفند پاسخ درد ناشی از تزریق فرمالین ۵ و ۱۰ درصد به‌صورت یک مرحله‌ای گزارش‌شده است (۲۲، ۲۴). به‌طورکلی درد فرمالینی دارای یک الگوی درد دومرحله‌ای است. مرحله اول که اصطلاحاً فاز نوروژنیک نامیده می‌شود در اثر تحریک مستقیم فرمالین بر روی فیبرهای حسی نوع C بوده و موجب آزاد شدن ماده P می‌شود و مرحله دوم فاز التهابی بوده و عمدتاً در اثر بروز



نمودار ۳- مقایسه تداخل عمل بین کلرفنیرآمین، هیستامین و اسانس لیموترش بر مراحل اول و دوم درد فرمالینی.
*) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح P< ۰/۰۵ با گروه فرمالین ۱٪ است.
†) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح P< ۰/۰۵ با گروه فرمالین ۱٪ است.
¥) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح P< ۰/۰۵ با گروه کلرفنیرآمین به‌تنهایی است.
§) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح P< ۰/۰۵ با گروه هیستامین به‌تنهایی است.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه پس از تزریق کف‌پایی فرمالین ۱ درصد، رفتار لیسیدن و گاز گرفتن پنجه پای تزریق‌شده در فواصل زمانی دقایق ۵-۰ و کل زمان ۴۰-۱۵ دقیقه ایجاد شد. با توجه به اینکه در این پنج دقیقه‌ها نسبت به پنج دقیقه‌های دیگر واکنش‌های

واکنش‌های التهابی در بافت‌های محیطی در اثر آزاد شدن واسطه‌های التهابی نظیر هیستامین، سروتونین، پروستاگلاندین، نیتریک اکساید به وجود می‌آید (۲۵). بدین ترتیب نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه در ارتباط با پاسخ‌های درد فرمالینی با یافته‌های دیگران به‌طور کامل مطابقت می‌کند (۲۱، ۲۲). در

تحقیق حاضر، کلرفنیرآمین (آنتاگونیست گیرنده H_1) موجب کاهش پاسخ درد در هر دو مرحله اول و دوم درد فرمالینی شد و این نشان می‌دهد که آنتاگونیست‌های H_1 هیستامینی ممکن است خاصیت ضد دردی داشته باشند. گزارش‌شده است که برخی از آنتاگونیست‌های H_1 و H_2 هیستامینی در آزمون‌های درد در مدل‌های حیوانات آزمایشگاهی اثر ضد دردی ایجاد کرده‌اند (۲۶). در آزمون فرمالین در موش‌های سوری تزریقات داخل صفاقی کلرفنیرآمین و سایمتیدین (آنتاگونیست گیرنده H_2) اثرات کاهش‌دهنده درد ایجاد کرده‌اند (۲۱، ۲۲). تزریق داخل صفاقی کلرفنیرآمین و رانیتیدین اثرات ضد دردی را در درد احشایی ناشی از اسید استیک در رت‌ها ایجاد نموده است (۲۷). در یک مطالعه تزریق داخل صفاقی دکس کلرفنیرآمین (آنتاگونیست H_1 هیستامینی) موجب کاهش درد در هر دو مرحله اول و دوم درد فرمالینی شده و دیماپریت و رانیتیدین (آنتاگونیست‌های H_2 هیستامینی) نیز پاسخ‌های درد را در هر دو مرحله کاهش داده است (۲۸). در پژوهش دیگری گزارش‌شده است که پیریلامین و مکلیزین (آنتاگونیست‌های H_1 هیستامینی) پاسخ درد را در هر دو مرحله اول و دوم آزمون فرمالین کاهش داده است (۲۹). بر اساس تحقیقات به‌دست‌آمده توسط Rosa و همکاران در سال ۲۰۱۳، پیریلامین و رانیتیدین به‌صورت وابسته به دوز اثرات ضد دردی در آزمون فرمالین ایجاد نموده و کلرفنیرآمین و سایمتیدین نیز به ترتیب موجب مهار هیپرآلژزی حرارتی و مکانیکی گردیده که البته کلرفنیرآمین قوی‌ترین اثر را نشان داده است (۳۰). بر اساس این گزارش‌ها، نتایج حاصل از تحقیق حاضر نیز با این یافته‌ها همخوانی دارد. از طرفی در مطالعه حاضر تزریق داخل صفاقی هیستامین موجب افزایش پاسخ درد در مرحله دوم و نه مرحله اول درد فرمالینی گردیده است. گزارش‌شده است که تزریق داخل بطن مغزی آگونیست هیستامین در درد ناشی از فرمالین، موجب پر دردی وابسته به دوز در مرحله دوم درد ناشی از فرمالین شده است (۲۸). در مطالعه‌ای که توسط Mobarakeh و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام‌گرفته است، تزریق داخل نخاعی هیستامین موجب افزایش پاسخ‌های درد در هر دو مرحله اول و دوم درد فرمالینی شده است (۳۱). نتایج به‌دست‌آمده در تحقیق دیگری نشان می‌دهد تزریق داخل بطن مغزی هیستامین در موش‌های سوری پاسخ‌های درد فرمالینی را در مرحله دوم و نه مرحله اول سرکوب نموده است (۳۲). بر اساس نتایج حاصل از یک پژوهش، تزریق داخل قشر حسی-پیکری اولیه هیستامین اثرات ضد دردی در هر دو مرحله اول و دوم درد ناشی از فرمالین در موش‌های صحرایی داشته و تجویز مرکزی کلرفنیرآمین و رانیتیدین موجب کاهش اثرات ضد دردی مرکزی ناشی از هیستامین در آزمون فرمالین شده است (۳۳). این نتایج نشان می‌دهند که هیستامین در سطح محیطی موجب افزایش درد و در سطح مرکزی موجب اثرات ضد دردی می‌گردد. با توجه به اینکه در پژوهش حاضر هیستامین در سطح محیطی موجب افزایش پاسخ‌های درد در آزمون فرمالین گردیده، بنابراین نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر نیز با یافته‌های مذکور مطابقت دارد.

در مطالعه حاضر، تزریق داخل صفاقی اسانس لیموترش به‌صورت وابسته به دوز موجب کاهش پاسخ‌های درد در هر دو مرحله اول و دوم درد ناشی از تزریق کف‌پایی فرمالین گردید. اسانس لیموترش دارای ترکیبات گوناگونی از جمله لیمونن، گاما ترپینن، سیترال، لینالول و بتا کاریوفیلن است که عمده‌ترین ترکیب مربوط به لیمونن است و هر یک از این ترکیبات دارای اثرات متنوعی هستند. در بررسی‌های صورت گرفته نشان داده‌شده است که اسانس لیموترش در سطح مرکزی اثرات ضد تشنجی، اثرات آرام‌بخش، ضد اضطراب و ضدافسردگی در موش‌های سوری بر جای گذاشته است (۳۴). در یک مطالعه، ترکیب مونوترپن مثبت لیمونن استفاده‌شده در آزمون درد احشایی ناشی از اسید استیک در موش‌های سوری موجب کاهش تعداد انقباضات شکمی در این آزمون شده است (۳۵). در پژوهشی که توسط Campelo و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام‌شده است مشخص گردیده که اسانس لیموترش با دارا بودن ترکیب عمده لیمونن به میزان ۵۲/۷۷ درصد موجب کاهش پاسخ‌های درد در آزمون درد احشایی و درد فرمالینی با به‌کارگیری سیستم اوپیوئیدی به‌عنوان ضد درد استانداردشده است (۱۲). در تحقیق دیگری بیان‌شده که سیترال یکی از ترکیبات مونوترپنی، اثرات ضد دردی را در آزمون‌های درد احشایی ناشی از اسید استیک و درد فرمالینی در موش‌های صحرایی از طریق مهار سنتز پروستاگلاندین‌ها اعمال نموده است (۳۶). نتایج حاصل از مطالعه Navarra و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان می‌دهد تزریق کف‌پایی اسانس برگاموت موجب کاهش پاسخ درد ناشی از کاپسایسین شده است (۳۷). در مطالعه دیگری گزارش‌شده است تزریق کف‌پایی لینالول موجب کاهش پاسخ‌های درد ناشی از فرمالین شده که این اثرات ضد دردی

توسط آنتاگونیست اوپیوئیدی مهار گردیده است. این نتایج نشان‌دهنده ارتباط با سیستم اوپیوئیدی است (۱۴). در مطالعه‌ای بیان‌شده که تزریق کف‌پایی لینالول توانسته است اثرات آنتی آلودینی محیطی و ضد پر دردی را با واسطه‌گری مکانیسم اوپیوئیدی در سطح محیطی ایجاد نماید (۳۸). از طرفی لینالول موجود در دارچین نیز موجب ایجاد اثرات ضد دردی در آزمون فرمالین در موش‌های صحرایی با تأثیر بر گیرنده‌های اوپیوئیدی شده است (۳۹). نتایج به‌دست‌آمده در یک پژوهش نشان می‌دهد که اسانس لیموترش موجب سرکوب پاسخ رفتاری لیسیدن و گاز گرفتن پنجه پا در هر دو مرحله اول و دوم درد فرمالینی در موش‌های سوری شده است (۱۲) درحالی‌که در پژوهشی که توسط Amorim و همکاران در سال ۲۰۱۶ انجام‌گرفته اسانس لیموترش موجب کاهش پاسخ درد در مرحله دوم درد فرمالینی (فاز التهابی) شده است (۱۵). با توجه به گزارش‌های ذکرشده، نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر با یافته‌های مذکور مطابقت داشته و چنین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که اثرات تعدیل‌کننده و ضد دردی ایجادشده توسط اسانس لیموترش احتمالاً هم از طریق محیطی و هم از طریق مرکزی انجام می‌شود. از سوی دیگر در این تحقیق، تزریق اسانس لیموترش پس از تزریق محیطی هیستامین از اثرات پر دردی ناشی از هیستامین جلوگیری نموده و پیش تزریق کلرفنیرآمین قبل از اسانس لیموترش موجب تقویت کاهش پاسخ‌های درد در هر دو مرحله اول و دوم درد فرمالینی گردیده است. این نتایج نشان می‌دهند که یک تداخل عمل ما بین سیستم هیستامینرژیک احتمالاً از طریق گیرنده‌های H_1 هیستامینی با اثرات محیطی کاهش‌دهنده درد توسط اسانس لیموترش وجود دارد. در یک مطالعه انجام‌گرفته چنین بیان‌شده است که مونوترپن مثبت لیمونن به‌طور قابل‌توجهی پاسخ‌های لیسیدن و گاز گرفتن پنجه پای تزریق‌شده در درد فرمالینی در مرحله دوم را مهار کرده درحالی‌که مرفین به‌عنوان یک آنتاگونیست اوپیوئیدی هر دو مرحله اول و دوم درد فرمالینی را مهار نموده است. از طرفی نالوکسان به‌عنوان آنتاگونیست اوپیوئیدی اثر ضد دردی ناشی از مرفین را جلوگیری نموده اما بر اثرات ضد دردی ناشی از لیمونن تأثیر نگذاشته است (۳۵). این امر مؤید این مسئله است که سیستم اوپیوئیدی در تعدیل درد ناشی از لیمونن مشارکت نداشته و احتمالاً سایر سیستم‌های نوروترنسمیتری در آن دخالت دارد. از سویی دیگر، تحقیقات نشان می‌دهند که در مرحله اول درد فرمالینی، ماده P و برادی کینین حضورداشته و داروهای ضد درد با اثر مرکزی مانند ضد دردهای اوپیوئیدی مثل مرفین در این مرحله مؤثر هستند، درحالی‌که در مرحله دوم برخی از واسطه‌های تحریکی التهابی از قبیل هیستامین، سروتونین، اسیدهای آمینه و پروستاگلاندین‌ها حضور دارند (۳۵). همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد آنتی‌هیستامین‌ها اثرات ضد دردی در آزمون‌های متنوع درد از جمله درد فرمالینی داشته‌اند. از طرفی در پژوهشی که توسط Tsujiyama و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام‌گرفته، مطرح‌شده است عصاره آبی پوسته لیموترش موجب مهار رهاسازی هیستامین از سلول‌های اکسودای صفاقی شده و اثرات آنتی‌هیستامینی نشان داده است (۴۰). با توجه به اثرات ضد دردی و آنتی‌هیستامینی ترکیباتی نظیر لیمونن و لینالول، نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهند که اثرات ضد دردی اسانس لیموترش مربوط به وجود این ترکیبات از جمله ترکیب عمده لیمونن است و سیستم هیستامینرژیک از طریق گیرنده‌های H1 احتمالاً در اثرات ضد دردی به وجود آمده توسط اسانس لیموترش مداخله نموده است. درمجموع با توجه به نتایج مشابه و گاهاً متناقض در پژوهش‌های ذکرشده، تفاوت در نتایج را می‌توان به نوع تجربه انجام‌گرفته، ویژگی‌های گونه‌ای و آزمون‌های رفتاری نسبت داد. از سوی دیگر با توجه به اینکه در این پژوهش تنها از یک آنتاگونیست هیستامینی استفاده گردیده؛ لذا پیشنهاد می‌شود در تحقیقات بعدی از سایر آنتاگونیست گیرنده‌های هیستامینی و نیز سایر سیستم‌های نوروترنسمیتری دخیل در فرایند درد بهره‌گیری شده تا مکانیسم عمل ضد دردی اسانس لیموترش بیشتر مشخص گردد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی محترم دانشگاه محقق اردبیلی در تأمین اعتبار لازم قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology.11th Ed. Philadelphia: Elsevier. Saunders; 2006, P. 598-609.
2. Abbasnejad M, Keramat B, Salari S, Hosaizadeh M. The Effects of Aqueous and Hydroalcoholic Extract of Eugenia Caryophyllata on Formalin Induced Pain in Male Rats. JMP. 2012; 42(2): 225-232.
3. Weiner RS. Pain management. 6th Ed. CRC Press: American Academy of pain management; 2001, P. 3-9.
4. Tamaddonfard E, Azimpouran A, Behjat B. Central Effect of Histamine on Formalin-Induced Pain in Rabbits: Role of Opioid System. J Fac Vet Med Univ. Tehran. 2006; 61(1): 83-90. [In Persian]
5. Jänig W. Neuronal mechanisms of pain with special emphasis on visceral and somatic pain. Acta Neurochir Suppl. 1987; 38:16-32.
6. Argoff C. Mechanisms of pain transmission and pharmacologic management. Cur Med Res & Opin. 2011; 27(10): 2019-2031.
7. Budai D. Neurotransmitters and receptors in the dorsal horn of the spinal cord. Acta Biologica Szegediensis. 2000; 44(1-4): 21-38.
8. Hass HL, Sergeeva OA, Selbach O. Histamine in the nervous system. Physiol Rev. 2008; 88(3): 1183-1241.
9. Dray A, Urban L. New pharmacological strategies for pain relief. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1996; 36: 253-280.
10. Kummer R, Fachini-Queiroz FC, Estevão-Silva CF, Grespan R, Leite Silva E, Bersani-Amado CA, et al. Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of Citrus latifolia Tanaka Essential Oil and Limonene in Experimental Mouse Models. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013; 2013(2): 1-8.
11. Zargari A. Medicinal Plants. 7th ed. Tehran: Tehran University Pub; 1997, P. 488-495.
12. Campelo LML, Almeida AAC, Freitas RLM, Ceraqueira GS, Sousa GF, Saldanha GB, et al. Antioxidant and Antinociceptive effects of Citrus limon essential oil in mice, Journal of Biomedicine and Biotechnology; 2011; 2011(1): 1-8.
13. Passos FB, Lopes EM, Araujo JM, Sousa DP, Veras LM, Leite JR, et al. Involvement of cholinergic and opioid system in γ- terpinene-mediated antiniciception. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015; 20(1): 1-10.
14. Katsuyama S, Otowa A, Kamio S, Sato K, Yagi T, Kishikawa Y, et al. Effect of plantar subcutaneous administration of bergamot essential oil and linalool on formalin-induced nociceptive behavior in mice. Biomedical Research. 2015; 36(1): 47-54.
15. Amorim JL, Simas DLR, Pinherio MG, Moreno DA, Alviano CS, Silva AR, et al. Anti-inflammatory properties and chemical characterization of the essential oils of four citrus species. PLOS ONE. 2016; 11(4): 1-18.
16. Ikeda H, Takasu S, Murase K. Contribution of anterior cingulate cortex and descending pain inhibitory system to analgesic effect of lemon odor in mice. Molecular Pain. 2014; 10(14): 1-8.
17. Abbott FV, Bonder M. Options for management of acute pain in the rat. Vet. Rec.1997; 140(21): 553-557.
18. Mojtahedin A, Tamaddonfard E, Zanboori A. Antinociception induced by central administration of histamine in the formalin test in rats. Ind. J. Physiol. Pharmacol. 2008; 52(3): 249-254.
19. Mojtahedin A, Tamaddonfard E, Zanboori A. Effect of mepyramine and famotidine on the physostigmine-induced antinociception in the formalin test in rats. Pak. J. Biol. Sci. 2008; 11(22): 2573-2578.
20. Oritz MI, Castaneda-Hernandez G. Examination of the interaction between peripheral lumiracoxib and opioids on the 1% formalin test in rats. Eur. J. Pharmacol. 2008; 12(2): 233-241.
21. Tamaddonfard E, Mojtahedin A. Effect of chlorpheniramine on formalin-induced pain in mice: its relation with opioid system. J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 2005; 60(4): 363-368.
22. Tamaddonfard E, Mojtahedin A. The effect of intraperitoneal injection of cimetidine on pain response induced by formalin in mice. J Fac Vet Med Univ Tehran. 2004; 59(4): 373-378.
23. Phillips DS. Basic statistics for health science students. W.H. Freeman and Co. New York, USA. 1978;89-97.
24. Aloisi AM, Lupo C, Carli G. Effect of formalin-induced pain on exploratory behavior in rabbits. Neuroreport. 1993; 4(6): 733-742.
25. Queiroz JC, Antoniolli AR, Quintans-Junior LJ, Brito RG, Barreto RS, Costa EV, et al. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of the essential oil from leaves of Xylopia laevigata in experimental models. The Scientific World Journal. 2014; 2014(1): 1-12.
26. Raffa RB. Antihistamines as analgesics. J. Clin. Pharmacol. Ther. 2001; 26(2): 81-85.
27. Zanboori A, Tamaddonfard E, Mojtahedin A. Effect of chlorpheniramine and ranitidine on the visceral nocicetion induced by acetic acid in rats: Role of opioid system. Pak. J. Biol. Sci. 2008; 11(20): 2428-2432.
28. Farzin D, Nosrati F. Modification of formalin-induced nociception by different histamine receptor agonists and antagonists. Eur. Neuropsychopharmacol. 2007; 17(2): 122-128.
29. Parada CA, Tambeli CH, Cunha FQ, Ferreira SH. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. Neuroscience. 2001; 102(4): 937-944.
30. Rosa AC, Fantozzi R. The role of histamine in neurogenic inflammation. British Journal of Pharmacology. 2013; 170(1): 38-45.
31. Mobarakeh J, Torkman-Boutorabi A, Rahimi AA, Ghasri S, Mohammad Ali Nezhad R, Hamzely A, et al. Interaction of histamine and calcitonin gene-related

peptide in the formalin-induced pain perception in rats. Biomedical Research. 2011; 32(3): 195-201.
32. Tamaddonfard E, Rahimi S. Central effect of histamine and peripheral effect of histidine on the formalin-induced pain response in mice. Clin. Exp. Pharm. Physiol. 2004; 31(8): 518-522.
33. Tamaddonfard E, Hamzeh-Gooshchi N. Effects of administration of histamine and its H1, H2 and H3 receptor antagonists into the primary somatosensory cortex on inflammatory pain in rats. Iran J Basic Med Sci. 2014; 17(1): 55-61.
34. Campelo LML, Sa CG, Almeida AAC, Costa P, Costa Marques TH, Feitosa CM, et al. Sedative, anxiolytic and antidepressant activities of Citrus limon (Burn) essential oil in mice. Pharmazie, 2011b; 66(8): 623-627.
35. Amaral JF, Silva MIJ, Neto MRA, Neto PFT, Moura BA, Melo CTV, et al. Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-Limonene in Mice. Biol Pharm Bull. 2007; 30(7): 1217-1220.
36. Quintans-Junior LJ, Guimaraes AG, Santana MT, Araujo BE, Moreira FV, Bonjardim LR, et al. Citral reduces nociceptive and inflammatory response in rodents. Brazilian Journal of Pharmacology. 2011; 21(3): 497-502.
37. Navarra M, Mannucci C, Delbo M, Calapai G. Citrus bergamia essential oil: from basic research to clinical application. Frontiers in Pharmacology. 2015; 6(36): 1-7.
38. Katsuyama S, Kuwahata H, Yagi T, Kishikawa Y, Komatsu T, Sakurada T, et al. Intraplantar injection of linalool reduces paclitaxel-induced acute pain in mice. Biomedical Research. 2012; 33(3): 175-181.
39. Dashti-Rahmatabadi MH, Vahidi Merjardi AR, Pilavaran AA, Farzan F. Antinociceptive effect of Cinnamon extract on formalin induced pain in rat. JSSU. 2009; 17(2): 190-199.
40. Tsujiyama I, Mubassara S, Aoshima H, Hossain SJ. Anti-histamine release and anti-inflammatory activities of aqueous extracts of citrus fruits peels. Orient Pharm Exp Med. 2013; 13(3): 175-180.

Original Article

Investigation of Peripheral Effects of Citrus Limon Essential Oil on Somatic Pain in Male Wistar Rats: Role of Histaminergic System

Mojtahedin A*

Animal Science Department, Moghan Faculty of Agriculture & Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Received: 12 Apr 2016 Accepted: 23 Jul 2016

Abstract

Background & Objective: One of the plants used in traditional medicine is lemon which has analgesic effect. However, little research has been performed on the analgesic effect of lemon and mechanisms of action with an emphasis on neurotransmitters systems. Therefore, the present study set to investigate the peripheral effects of lemon essential oil on somatic pain using formalin test with an emphasis on histaminergic system in male Wistar rats.

Materiala & Methods: Sixty male rats weighing approximately 200-250g and aged 14-16 wk were divided into 10 groups: sham (Salin + Formalin 1% intraplantar), three treatment groups with lemon essential oil (EO) (12.5, 25 and 50 mg/kg), three treatment groups with Chlorpheniramine (5, 10 and 20 mg/kg), 1 treatment group with Histamine (10 mg/kg), 1 pretreatment group with Chlorpheniramine (20 mg/kg) + EO (50mg/kg), and 1 pretreatment group with Histamine (10 mg/kg) + EO (50 mg/kg). Formalin test was used to assess somatic pain. Data analysis was performed using one-way ANOVA.

Results: Intraperitoneal injection of lemon essential oil reduced the pain response induced by formalin in both phases ($P<0.05$). Pretreatment with chlorpheniramine and lemon essential oil enhanced the analgesic response in both phases ($P<0.05$).

Conclusion: Lemon essential oil had analgesic effects, probably caused by the histaminergic system.

Keywords: Citrus Limon L., Somatic Pain, Histaminergic System, Formalin Test

***Corresponding author: Ali Mojtahedin,** Animal Science Department, Moghan Faculty of Agriculture & Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
Email: a_mojtahedin@uma.ac.ir

Journal of Fasa University of Medical Sciences (2016) 6: 399-408