

# بررسی اثر ضد دردی تجویز دراز مدت فلاونوئید هسپرتین در موش صحرائی دیابتی: شواهد رفتاری

مهرداد روغنی<sup>۱\*</sup>، توراندخت بلوچ‌نژاد مجرد<sup>۲</sup>، خدیجه امیری<sup>۳</sup>

۱- دانشیار، گروه فیزیولوژی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران  
۲- استاد، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران  
۳- دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۹/۰۳/۲۶

دریافت مقاله: ۸۸/۱۱/۲۱

## چکیده

**هدف:** در این بررسی اثر ضد دردی تجویز دراز مدت فلاونوئید هسپرتین در موش‌های صحرائی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین در دو آزمون فرمالین و غوطه‌ور کردن دم در آب داغ ارزیابی شد.  
**مواد و روش‌ها:** موش‌ها به شش گروه کنترل، کنترل تحت تیمار با هسپرتین، دیابتی دریافت کننده سدیم سالیسیلات، دیابتی و دیابتی تیمار شده با هسپرتین یا گلین کلامید تقسیم شدند. هسپرتین نیز ۱ هفته پس از القای دیابت به میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی و یک روز در میان به مدت ۶ هفته تجویز شد. در پایان کار، تحمل درد حرارتی با استفاده از آزمون غوطه‌ور شدن دم در آب داغ و میزان احساس درد آزمون فرمالین ارزیابی شد.  
**نتایج:** نمرات درد در موش‌های دیابتی در دو مرحله حاد و مزمن در آزمون فرمالین به‌طور معنی‌دار بیشتر از موش‌های کنترل بود و درمان با هسپرتین به مدت ۶ هفته موجب کاهش معنی‌دار در نمرات درد در دو مرحله حاد و مزمن به‌ویژه مرحله مزمن شد ( $P < 0/05$ ). از نظر تحمل درد حرارتی نیز حالت دیابت موجب کاهش زمان تأخیر در بیرون کشیدن دم از آب شد ( $P < 0/01$ ) و درمان با هسپرتین موجب افزایش معنی‌دار این زمان در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده شد ( $P < 0/05$ ).  
**نتیجه‌گیری:** تجویز دراز مدت هسپرتین به مدت ۶ هفته موجب افزایش تحمل درد حرارتی و کاهش احساس درد شیمیایی در حد کم در مدل تجربی دیابت قندی القا شده توسط استرپتوزوتوسین شد که این می‌تواند به‌عنوان یک درمان کمکی در هیپرآلرژی دیابتی مطرح شود.

**کلیدواژه‌ها:** هسپرتین، دیابت قندی، درد، آزمون فرمالین، آزمون غوطه‌ور کردن دم در آب داغ

## ۱- مقدمه

خواهد یافت [۱]. کمبود یا کاهش نسبی میزان انسولین در این بیماری، با عوارض متابولیکی حاد نظیر کتواسیدوز و (Ketoacidosis) و اغمای هیپراسمولار (Hyperosmolar) و

بیماری دیابت قندی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های سیستم غدد درون‌ریز بدن محسوب می‌شود که براساس پیش‌بینی به‌عمل آمده، شیوع آن در جامعه انسانی در آینده افزایش

\*نشانی مکاتبه: بلوار کشاورز، خیابان شهید عبدالله زاده (دهکده)، پلاک ۲۹، دانشکده پزشکی شاهد، گروه فیزیولوژی، کدپستی: ۳۳۱۹۱۱۸۶۵۱  
Email: mehjour@yahoo.com

فلاونوئیدها به فراوانی در پوست میوه مرکباتی نظیر پرتقال و گریپ فروت یافت می‌شود که دارای آثار فیزیولوژیک و سودمند متعدد از جمله کاهش دادن آسیب‌پذیری دیواره مویرگی، آثار آنتی‌اکسیدانی و کاهش دادن استرس اکسیداتیو (Oxidative Stress) و آسیب بافتی، کاهش‌دهندگی فشار خون شریانی، پایین آوردن کلسترول خون و بهبود دادن متابولیسم چربی‌ها است. به‌علاوه، این ماده دارای خاصیت محافظت‌کنندگی اعصاب (نوروپروتکتیو: Neuroprotective)، ضدتومور، ضد تجمع پلاکتی و ضد التهابی است [۱۰-۱۸]. به‌علاوه، اخیراً اثر ضد دیابتی هسپرتین و مشتقات آن شامل آثار هیپوگلیسمیک (Hypoglycemic) و هیپولیپیدمیک (Hypolipidemic) در موش‌های صحرایی دارای دیابت نوع ۲ اثبات شده است [۱۹]. همچنین در یک بررسی مشخص شد که مشتقات هسپرتین به همراه سایر ترکیبات دارای اثر ضد دردی و آرام‌بخش (Sedative) به فرم هم‌افزایی (Synergistic) در موش‌های صوری است که این اثر از طریق گیرنده‌های اوپیوئیدی (Opioid Receptors) اعمال می‌شود [۲۰]. بنابراین با توجه به اثبات آثار ضد التهابی و ضد دردی هسپرتین یا مشتقات آن در حیوانات طبیعی [۱۴، ۲۰] و بروز هیپرالژزی (Hyperalgesia) در دیابت قندی از طرف دیگر [۳، ۴]، در این تحقیق اثر ضد دردی تجویز دراز مدت هسپرتین در مدل تجربی دیابت قندی القا شده توسط داروی استرپتوزوتوسین (Streptozotocin) در موش صحرایی نر به کمک دو آزمون فرمالین و غوطه‌ور کردن دم در آب داغ بررسی شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

در این مطالعه از ۴۸ سر موش صحرایی نر سفید نژاد ویستار (انستیتو پاستور، تهران) در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۷۰ گرم استفاده شد. تمام حیوان‌ها در دمای ۲۱-۲۳ درجه سانتی‌گراد در گروه‌های ۳ تا ۴ تایی در هر قفس قرار داده شدند. حیوان‌ها در طول مدت بررسی آزادانه به آب لوله‌کشی و

با یک اختلال متابولیک مزمن و عوارض نامطلوب در دراز مدت نظیر رتینوپاتی (Retinopathy)، نوروپاتی (Neuropathy)، گرفتاری عروق کلیوی، ضایعات پوستی و اختلالات سیستم قلب و گردش خون همراه است [۲]. درد ناشی از نوروپاتی اعصاب محیطی یکی از شکایات مهم بالینی افراد مبتلا به دیابت قندی محسوب می‌شود [۳، ۴]. بروز هیپرگلیسمی (Hyperglycemia) با اعمال آثار سمی بر سیستم عصبی محیطی یکی از علل بروز نوروپاتی دردناک است [۵، ۶]. با توجه به این‌که تاکنون ترکیب دارویی مناسب (نظیر سالیسیلات‌ها (Salicylates) و ترکیبات ضد التهابی غیراستروئیدی) عاری از عوارض جانبی برای درمان برخی حالات درد حاد و مزمن به‌ویژه در حالت دیابت قندی یافت نشده [۷]، بنابراین توجه محققان به گیاهان دارویی و مواد مؤثر استخراج شده از آن‌ها معطوف شده است. از جمله این مواد می‌توان از پلی‌فنل‌ها (Polyphenols) نام برد که در گیاهان، میوه‌ها و سبزیجات، روغن زیتون و برگ چای یافت می‌شود. فلاونوئیدها (Flavonoids) بزرگترین گروه از پلی‌فنل‌ها است و تاکنون بیشتر از ۲۰۰۰ نوع فلاونوئید خاص شناسایی شده است. فلاونوئیدها براساس ساختار مولکولی‌شان دستجات متنوعی از مواد از جمله فلاونوئید هسپرتین (Hesperetin) را در بر می‌گیرد [۸]. مشخص شده است که مصرف غذاها یا ترکیباتی که غنی از پلی‌فنل‌ها است، می‌تواند سطح سرمی آنتی‌اکسیدان‌ها را در خون افزایش دهد [۸]. در همین راستا مصرف ترکیبات پلی‌فنلیک، آثار مفید بارزی در برابر آسیب‌های اکسیداتیو دارد. محققان در سال‌های اخیر، توجه خاصی به جنبه‌های بالقوه درمانی و پیشگیری‌کننده این ترکیبات در بیماری‌های مختلف از جمله انواع سرطان‌ها، بیماری‌های قلبی عروقی، بیماری‌های التهابی و متابولیک شامل دیابت قندی و بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی داشته‌اند [۸]. به‌علاوه، مطالعات اپیدمیولوژیک نمایانگر آن است که تغییر عادات غذایی و مصرف آنتی‌اکسیدان‌های غذایی می‌تواند از شیوع بیماری‌های متابولیک کم کند [۹]. در این خصوص، هسپرتین در خانواده

و کاهش وزن نیز در موش‌ها دیده شد. میزان وزن حیوانات و گلوکز سرم (روش آنزیمی گلوکز اکسیداز (شرکت زیست شیمی، تهران) در هفته قبل از انجام کار و در طی هفته‌های سوم و ششم پس از تزریق استرپتوزوتوسین اندازه‌گیری شد.

## ۲-۱- آزمون فرمالین

از نظر زمانی این آزمون در مورد تمام موش‌ها در بین ساعات ۱۲-۱۷ و ۲-۳ روز پس از انجام آزمون غوطه‌ور کردن دم در آب داغ انجام پذیرفت. برای انجام آن نیز از روش متداول دایسون و دنیس (Dubuissou and Dennis) استفاده شد [۲۲]. بدین ترتیب که حیوان در یک محفظه از جنس پلکسی‌گلاس (Plexiglass) (۴۰×۴۰×۴۰ سانتی‌متر) در تحت شرایط آرام قرار گرفته و پس از گذشت ۱۵ دقیقه، ۵۰ میکرولیتر از محلول فرمالین ۲/۵ درصد به‌صورت زیرجلدی به کف پای حیوان تزریق شد و شدت درد حیوان براساس تقسیم‌بندی زیر به چهار درجه تفکیک شد: ۰- حیوان بدون توجه به پای تزریق شده می‌نشیند یا راه می‌رود. ۱- پای حیوان با محفظه تماس داشته ولی حیوان وزن بدن خود را بیشتر روی پای سالم خود می‌اندازد. ۲- حیوان پنجه دردناک را کاملاً از سطح محفظه بلند می‌نماید. ۳- حیوان پنجه تزریق شده را از شدت درد می‌لیسد، گاز می‌گیرد یا به شدت تکان می‌دهد. ثبت پاسخ‌های رفتاری بلافاصله پس از تزریق فرمالین آغاز و تا دقیقه ۶۰ ادامه یافت. در این ارتباط پاسخ در هر ۱۵ ثانیه ثبت و به‌عنوان شاخصی از میزان درد در آزمون فرمالین در نظر گرفته شد. با استفاده از این روش اعداد ۰ تا ۳ برای امتیاز درد در زمان‌های مختلف به‌دست آمد. میانگین درد در ده دقیقه اول بعد از تزریق فرمالین به‌عنوان مرحله اول یا حاد و در دقایق ۱۶ تا ۶۰ به‌عنوان مرحله دوم یا مزمن در نظر گرفته شد.

## ۲-۲- آزمون غوطه‌ور کردن دم در آب داغ

این آزمون به روش توصیف شده توسط کورتیکس

غذای مخصوص موش (شرکت خوراک دام پارس، کرج) دسترسی داشتند. در ضمن، بررسی براساس برنامه‌ها و دستورالعمل‌های توصیه شده توسط انستیتو ملی بهداشت آمریکا (NIH) برای نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی و راه‌کارهای عملی موجود در داخل کشور انجام شد.

در این بررسی از آن دسته موش‌های صحرایی نر استفاده شد که در شرایط طبیعی بدون برقراری حالت روزه‌داری، میزان گلوکز سرم آن‌ها کمتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود. در این خصوص از شبکه رترئوربیتال (Retroorbital) و لوله موئینه برای خونگیری استفاده شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به شش گروه اصلی کنترل، کنترل تحت تیمار با هسپرتین، دیابتی، دیابتی تحت تیمار با هسپرتین یا گلیبن کلامید (Glibenclamide) (کنترل مثبت برای آزمایش‌های ضد دیابتی) و دیابتی دریافت‌کننده سدیم سالیسیلات (کنترل مثبت برای آزمایش‌های ضد دردی) تقسیم شدند. با انجام بررسی آماری [آنوای یک طرفه (One-Way ANOVA)]، در صورت معنی‌دار نبود تفاوت بین گروه‌ها از نظر وزن، کار ادامه می‌یافت و گر نه گروه‌بندی مجدداً انجام می‌شد. برای دیابتی نمودن موش‌ها از داروی استرپتوزوتوسین به‌صورت تک دوز و داخل صفاقی به میزان ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم حل شده در محلول سالین فیزیولوژیک سرد استفاده شد. داروی هیپوگلیسمیک گلیبن کلامید نیز به میزان ۶۰ میکروگرم بر کیلوگرم در روز تجویز شد. سدیم سالیسیلات یک ساعت قبل از انجام آزمون فرمالین به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد. داروی هسپرتین نیز ۱ هفته پس از القای دیابت به میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی و یک روز در میان به‌مدت ۶ هفته تجویز شد. دوز هسپرتین براساس مراجع موجود انتخاب شد [۱۲، ۲۱]. یک هفته پس از تزریق، برای اطمینان از دیابتی بودن حیوانات، قند ادرار به روش نوار ادراری (شرکت گلوکو یاب، تهران) کنترل شد و فقط حیوانات دیابتی شده به مرحله بعدی برای شروع تیمار راه یافتند. البته در هفته‌های بعد علائم بارز دیابت نظیر پرخوری، پرنوشی، دیورز (Diuresis)،

(Courteix) و همکاران انجام پذیرفت [۲۳]. برای انجام این کار حیوان به مدت ۱۵ دقیقه در داخل محفظه محدود کننده موش در تحت شرایط استاندارد آزمایشگاه قرار گرفته و سپس دم حیوان در داخل آب داغ در دمای ۴۹ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و میزان تأخیر در بیرون کشیدن دم از آب با استفاده از زمان سنج اندازه‌گیری شد. هر آزمایش در مورد هر حیوان ۴ بار با فاصله زمانی ۵ دقیقه تکرار شد و در نهایت میانگین داده در مورد هر موش ثبت شد. زمان قطع آزمایش در صورت بیرون نکشیدن دم نیز ۳۰ ثانیه در نظر گرفته شد.

## ۲-۳- تجزیه و تحلیل آماری

تمام داده‌ها در بررسی حاضر به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده است. برای تجزیه و تحلیل آماری در مورد نتایج وزن و گلوکز از آزمون آنووا با اندازه‌گیری مکرر و در مورد نتایج درد نیز از آزمون آنووی یک طرفه و آزمون توکی (Tukey's Test) استفاده شد. به علاوه،  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## ۳- نتایج

از نظر وزن، هیچ‌گونه تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها در هفته قبل کار (سطح پایه) مشاهده نشد. دو گروه کنترل و کنترل تحت تیمار با هسپرتین یک افزایش بارز و طبیعی وزن را در پایان هفته ششم به ترتیب به میزان ۸/۵ درصد و ۱۰/۴ درصد نشان دادند؛ هر چند این افزایش وزن در هر دو گروه کنترل و کنترل تحت تیمار در مقایسه با هفته قبل از کار در همان گروه از نظر آماری به حد معنی‌دار نرسید. در گروه دیابتی نیز یک کاهش غیرمعنی‌دار وزن به میزان ۹/۱ درصد در هفته سوم و یک کاهش بارز و معنی‌دار به میزان ۲۰/۴ درصد در هفته ششم در مقایسه با هفته قبل بررسی ( $P < 0.05$ ) مشاهده شد. در گروه دیابتی تحت تیمار با هسپرتین نیز در هفته ششم یک کاهش کم و غیرمعنی‌دار وزن به میزان ۷/۲ درصد در مقایسه با هفته قبل از کار مشاهده شد و این کاهش وزن در گروه دیابتی تحت

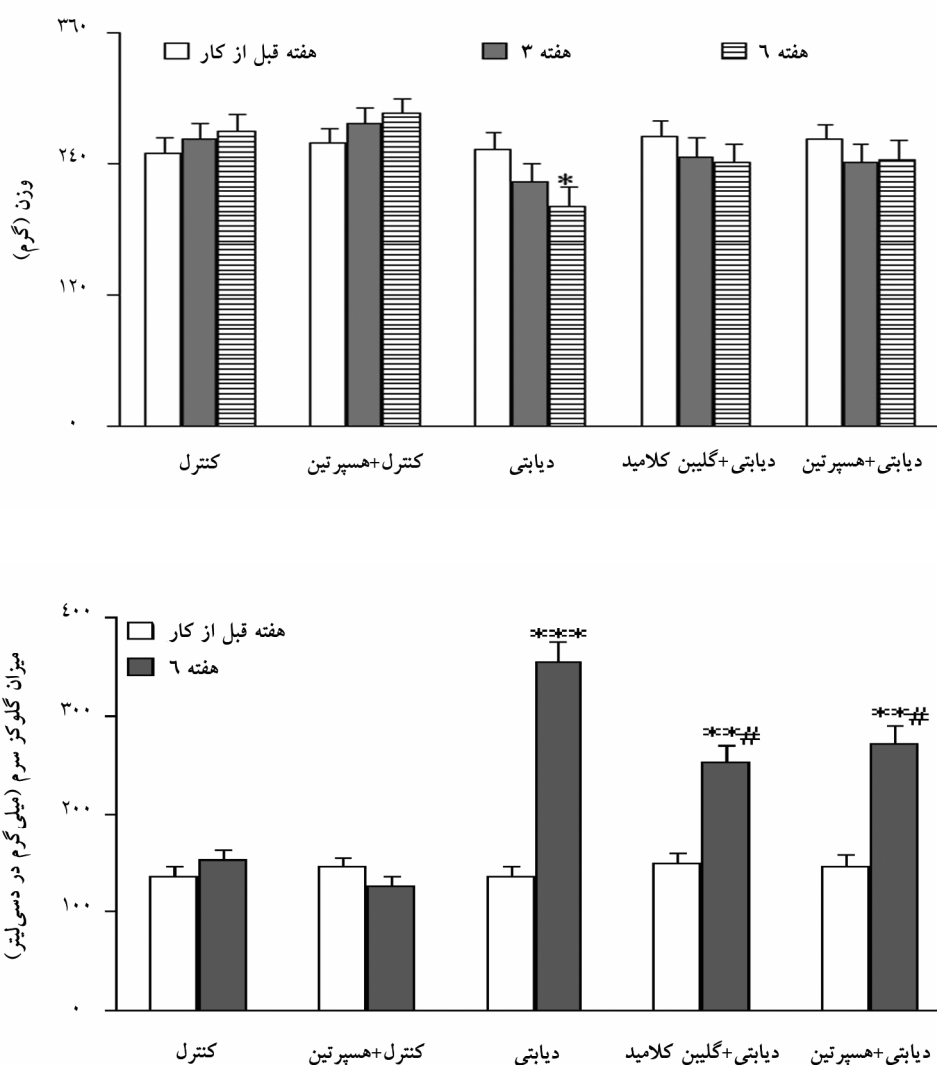
تیمار هر چند در مقایسه با گروه دیابتی کمتر بود ولی کماکان تفاوت موجود بین دو گروه دیابتی و دیابتی تحت درمان با هسپرتین در هفته ششم در حد معنی‌دار نبود (نمودار ۱). میزان کاهش وزن در گروه دیابتی تحت تیمار با گلیبن کلامید در هفته‌های ۳ و ۶ نیز در مقایسه با هفته قبل از کار به ترتیب ۶/۷ درصد و ۹/۱ درصد بود که این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود و در مقایسه با گروه دیابتی کمتر بود.

درباره میزان گلوکز سرم در هفته قبل از بررسی تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها مشاهده نشد. در دو گروه کنترل و کنترل تحت تیمار با هسپرتین میزان گلوکز سرم در هفته ششم در مقایسه با هفته قبل کار در همان گروه تفاوت معنی‌دار نشان نداد. به عبارت دیگر؛ تجویز هسپرتین به حیوانات گروه کنترل کاهش محسوس و مطلوب گلوکز سرم را به دنبال نداشت. از طرف دیگر، میزان گلوکز سرم در هفته ششم در دو گروه دیابتی و دیابتی تحت تیمار با هسپرتین در حد معنی‌دار (به ترتیب  $P < 0.001$  تا  $P < 0.01$ ) و به ترتیب به میزان ۱۶۲/۹ درصد و ۸۶/۸ درصد بیشتر از مقادیر گلوکز در هفته قبل از کار در همان گروه بود. میزان گلوکز سرم در هفته ششم در گروه دیابتی تحت درمان به طور معنی‌دار و به میزان ۲۳/۶ درصد کمتر از گروه دیابتی درمان نشده بود ( $P < 0.05$ ) (نمودار ۱). تجویز گلیبن کلامید به حیوانات گروه دیابتی نیز موجب شد که میزان افزایش گلوکز سرم در این گروه در هفته ششم مقایسه با هفته قبل از کار (به میزان ۶۹/۱ درصد) در مقایسه با میزان افزایش گلوکز در گروه دیابتی (۱۶۲/۹ درصد) کمتر باشد که این وضعیت در گروه دیابتی تحت تیمار با هسپرتین نیز مشاهده شد.

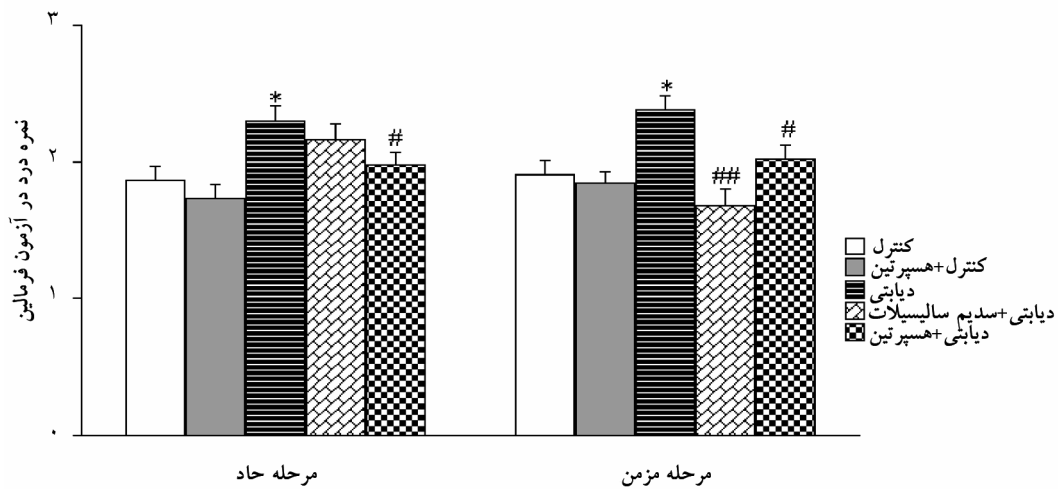
در این بررسی همچنین نمرات درد در دو مرحله حاد و مزمن آزمون فرمالین در مورد گروه‌ها ارزیابی شد (نمودار ۲). تزریق کف پای فرمالین، یک پاسخ بارز و مرحله‌ای را در تمام گروه‌ها ایجاد نمود. هیپرالژزی ظاهر شده به دنبال تزریق کف پای فرمالین در موش‌های دیابتی درمان نشده در هر دو مرحله حاد و مزمن به طور معنی‌دار و به ترتیب به میزان

موش‌های گروه دیابتی شد ( $P < 0.01$ ). از طرف دیگر، درمان با هسپریتین به مدت ۶ هفته موجب کاهش معنی‌دار نمرات درد به ترتیب به میزان ۱۳/۹ درصد و ۱۵/۱ درصد در مقایسه با گروه دیابتی در هر دو مرحله حاد و مزمن آزمون به‌ویژه مرحله مزمن شد ( $P < 0.05$ ).

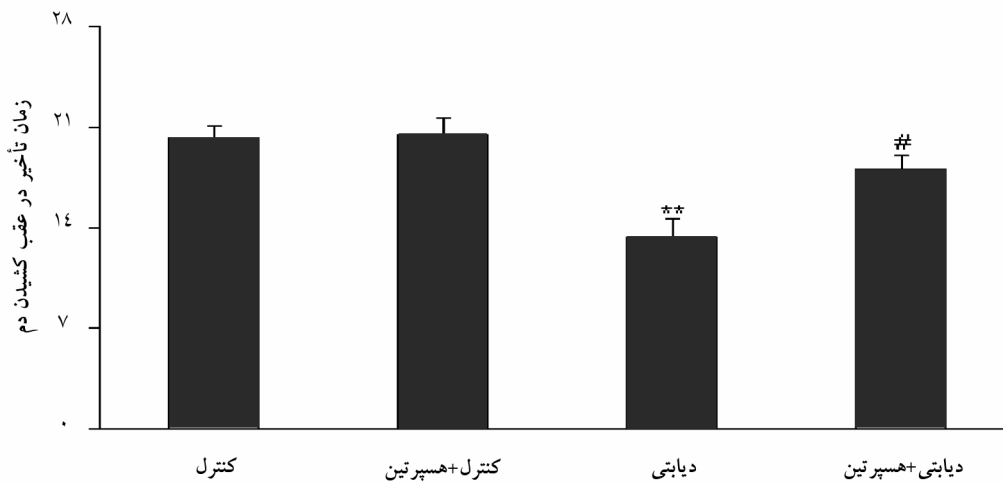
۲۷/۸ درصد و ۲۴/۶ درصد بیشتر از گروه کنترل بود ( $P < 0.05$ ). به‌علاوه تجویز سدیم سالیسیلات به‌عنوان یک ماده ضد درد مؤثر و رایج در جامعه انسانی به موش‌های گروه دیابتی موجب کاهش معنی‌دار نمره درد فقط در مرحله دوم (مزمن) آزمون فرمالین و به میزان ۲۹/۴ درصد در مقایسه با



نمودار ۱ اثر تجویز هسپریتین و گلین کلامید (کنترل مثبت) بر میزان وزن و گلوکز سرم در گروه‌های مورد بررسی، \* :  $P < 0.05$ ، \*\* :  $P < 0.01$ ، \*\*\* :  $P < 0.001$  (در مقایسه با هفته قبل از بررسی در همان گروه) و # :  $P < 0.05$  (در مقایسه با گروه دیابتی در همان هفته)



نمودار ۲ شدت درد در دو مرحله حاد و مزمن آزمون فرمالین در موش‌های صحرایی کنترل و دیابتی تحت تیمار با هسپرتین و دیابتی تحت تیمار با سدیم سالیسیلات (کنترل مثبت)، \*  $P < 0/05$ ؛ #  $P < 0/05$ ، ##  $P < 0/01$  (در مقایسه با گروه کنترل در همان مرحله)، #  $P < 0/05$ ، ##  $P < 0/01$  (در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده در همان مرحله)



نمودار ۳ مدت زمان تأخیر در بیرون کشیدن دم از آب داغ در موش‌های صحرایی کنترل و دیابتی تحت تیمار با هسپرتین، \*  $P < 0/01$ ؛ \*\*  $P < 0/01$  (در مقایسه با گروه کنترل در همان مرحله)، #  $P < 0/05$  (در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده در همان مرحله)

مشاهده شد ( $P < 0/01$ ) که خود نشان دهنده بروز هیپرالژزی حرارتی در موش‌های دیابتی ۶ هفته پس از تزریق استرپتوزوتوسین است. به‌علاوه، درمان موش‌های دیابتی با هسپرتین به‌مدت ۶ هفته موجب افزایش معنی‌دار این زمان

در مورد آزمون غوطه‌ور کردن دم در آب داغ که برای سنجش میزان تحمل درد حرارتی کاربرد دارد (نمودار ۳)، در گروه دیابتی یک کاهش معنی‌دار در مدت زمان تأخیر در بیرون کشیدن دم در مقایسه با گروه کنترل به میزان ۳۳/۷ درصد

تأخیر در مقایسه با گروه دیابتی درمان نشده به میزان ۳۵/۱ درصد شد و تفاوت موجود بین این دو گروه از نظر آماری معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ). همچنین درمان موش‌های گروه کنترل با هسپرتین نیز هیچ‌گونه تغییر معنی‌دار را از این نظر در مقایسه با گروه کنترل ایجاد نمود.

#### ۴- بحث

نتایج بررسی حاضر نشان داد که تجویز دراز مدت هسپرتین به مدت ۶ هفته اثر هیپوگلیسمیک دارد و نمرات درد در موش‌های دیابتی در دو مرحله حاد و مزمن آزمون فرمالین بیشتر از موش‌های کنترل بوده و درمان با هسپرتین در حد کم موجب کاهش معنی‌دار نمرات درد در مقایسه با گروه دیابتی در دو مرحله حاد و مزمن می‌شود. ضمناً با تجویز سدیم سالیسیلات به موش‌های دیابتی، کاهش معنی‌دار در نمره درد فقط در مرحله مزمن آزمون فرمالین مشاهده شد. در مورد آزمون غوطه‌ور کردن دم در آب داغ نیز در گروه دیابتی یک کاهش معنی‌دار در مدت زمان تأخیر در بیرون کشیدن دم در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد و درمان موش‌های دیابتی با هسپرتین موجب افزایش این زمان تأخیر در مقایسه با گروه دیابتی درمان نشده شد.

نتایج تحقیقات قبلی نشان داده است که موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین به‌طور غیرمنتظره یک رفتار تشدید شده مربوط به درد را در آزمون فرمالین به دنبال تجویز محرک‌های شیمیایی به داخل پنجه پا پس از گذشت حداقل ۳-۴ هفته نشان می‌دهند که خود دلالت بر وجود مکانیسم‌های غیرطبیعی و متعدد در پردازش علایم (Signals) محیطی درد دارد [۲۳، ۲۴]. در همین ارتباط شواهد زیادی مبنی بر این موضوع یافت می‌شود که برای بروز نوروپاتی و هیپرالژزی دیابتی نیاز به گذشت حداقل یک ماه است [۲۵-۲۷]. با توجه به این‌که در بررسی حاضر آزمون‌های سنجش درد پس از گذشت شش هفته انجام شده است، بنابراین با توجه به شواهد قبلی و نتایج به‌دست آمده، نوروپاتی

دیابتی در موش‌های دیابتی رخ داده است. وجود هیپرالژزی به‌عنوان اولین نشانگان نوروپاتی دیابتیک به اثبات رسیده است که علت آن تا حدودی به آثار سمی (Toxic) مقادیر بالای گلوکز بر سیستم عصبی محیطی و فعال شدن مسیرهای بیوشیمیایی آلدوز ردوکتاز (Aldose Reductase) و الکل‌های با چند گروه هیدروکسیل نسبت داده شده است [۲۸]. به‌علاوه وجود حالت دیابت، پردازش علایم درد را در ناحیه نخاع تحت تأثیر قرار می‌دهد و کاهش آستانه درک درد حرارتی در موش‌های دیابتی شده در آزمون غوطه‌ور کردن دم در آب داغ نیز مورد اثبات قرار گرفته است [۲۹]. از طرف دیگر نتایج تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین را می‌توان به‌عنوان مدل درد مزمن به‌حساب آورد که در مورد آن، نشانه‌های هیپرالژزی و آلودینی (Allodynia) به‌خوبی مشاهده می‌شود [۲۶، ۲۸، ۳۰].

آزمون فرمالین که برای پی‌بردن به شدت درد احساس شده استفاده شد؛ به‌عنوان یک مدل معتبر ارزیابی درد شناخته شده است. مرحله اول (حاد) آزمون که در چند دقیقه اول پس از تزریق کف‌پایی فرمالین رخ می‌دهد و نسبتاً زودگذر است، به علت اثر مستقیم ماده محرک فرمالین بر فیبرهای حسی نوع C است و مرحله طولانی‌تر و مزمن (ثانویه) این آزمون به علت ایجاد تغییرات التهابی ناشی از آزاد شدن واسطه‌های (Mediators) دردزا است. نتایج تحقیقات جدید نشان می‌دهد که در مرحله اولیه آزمون فرمالین، ماده P و برادری‌کینین (Bradykinin) و در مرحله ثانویه آن هیستامین (Histamine)، سروتونین (Serotonin)، پروستاگلاندین (Prostaglandin)، و برادری‌کینین نقش دارد [۳۱، ۳۲]. به‌علاوه، این آزمون علاوه بر سنجش درد، تا حدودی مکانیسم اثر مواد با پتانسیل ضد دردی را نیز مشخص می‌نماید. با توجه به این‌که در مرحله مزمن آزمون فرمالین در موجودات طبیعی و دیابتی شده با استرپتوزوتوسین مکانیسم‌های محیطی موجود در خارج از سیستم عصبی (نظیر پدیده التهابی) و در مرحله حاد آن مکانیسم‌های مرکزی موجود در سیستم عصبی (نظیر بروز تغییرات در پردازش مرکزی علائم درد) دخالت دارد [۳۱] و تزریق داخل صفاقی سدیم سالیسیلات

به موش‌های گروه دیابتی موجب کاهش میزان احساس درد فقط در مرحله دوم آزمون شد، بنابراین این ماده از طریق یک مکانیسم محیطی اثر خود را اعمال می‌کند که نتایج تحقیق حاضر تأیید کننده این نظر است. همچنین نتایج به‌دست آمده در این بررسی نشان داد که تجویز دراز مدت هسپرتین در گروه دیابتی به مدت ۶ هفته موجب کاهش معنی‌دار پاسخ درد در دو مرحله حاد و مزمن آزمون فرمالین در موش‌های دیابتی می‌شود که این خود دل بر اعمال اثرهای مرکزی و محیطی این فلاونوئید و اعمال آثار ضد التهابی آن است. در این راستا فلاونوئیدهای موجود در گیاهان دارویی با اعمال اثرهای آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی می‌تواند آثار ضد دردی هسپرتین را در این بررسی تا حدودی توجیه نمایند. در این مورد مشخص شده که چنین فلاونوئیدهایی قادر به مهار آنزیم‌های دخیل در تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن نظیر سیکلواکسیژناز (Cyclooxygenase)، لیبواکسیژناز (Lipoxygenase)، منواکسیژناز میکروزومی (Microsomic Monooxygenase) و گلو‌تاتیون اس ترانسفراز (Glutation S Transferase) است [۳۴، ۳۳]. بخش دیگر اثر ضد التهابی فلاونوئیدها را می‌توان به توانایی آن‌ها در تنظیم کاهشی تولید نیتریک اکسید و مهار نمودن دگرانولاسیون نوتروفیل‌ها نسبت داد که این خود موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های پیش‌برنده التهاب می‌شود [۳۵]. به‌علاوه، فلاونوئیدها قادر به کاهش دادن فعالیت سیستم کمپلمان (Complement System) است که از این طریق موجب کاهش اتصال سلول‌های پیش‌برنده التهابی به بافت پوششی ناحیه آسیب دیده یا ناحیه تزریق شده با فرمالین می‌شود که بدین ترتیب از شدت التهاب کاسته شده و در نهایت درد کمتری احساس می‌شود [۳۶]. همچنین عدم مشاهده پاسخ ضد دردی برای هسپرتین در گروه کنترل به دنبال تزریق فرمالین، نشان می‌دهد که اثر این ماده در حالت طبیعی به اندازه کافی قوی نیست و لازمست که قبل از تزریق فرمالین، یک حالت نظیر دیابت قندی دراز مدت، یک‌سری تغییرات بافتی را در ناحیه مورد تزریق ایجاد نماید. همچنین بخشی دیگر از آثار سودمند هسپرتین بر درد در این تحقیق را می‌توان به آثار پایین آورندگی

گلوکز آن نسبت داد که موجب کاهش تغییرات در اعصاب محیطی و التهاب ناشی از آن می‌شود که این اثر در تحقیقات دیگر در مورد سایر فلاونوئیدها نیز به‌دست آمده است [۳۷، ۳۸]. همچنین، هسپرتین قادر به مهار آنزیم سیکلواکسیژناز و سرکوب مهار التهابی در بدن بوده و از همین طریق آثار ضد تجمع پلاکتی خود را نیز ایفا می‌نماید [۱۴] که این مطلب کاهش درد در آزمون فرمالین در موش‌های صحرایی دیابتی تحت درمان با هسپرتین در تحقیق حاضر را نیز تا حدودی توجیه می‌نماید.

به‌علاوه، مشخص شده است که بروز دیابت قندی در حیوانات آزمایشگاهی دیابتی شده موجب افزایش استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از تشدید تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن در نواحی محیطی و مرکزی بدن می‌شود که در نتیجه آن دریافت، انتقال و پردازش نهایی علایم درد به‌طور نامطلوب در راستای افزایش احساس درد تحت تأثیر قرار می‌گیرد [۲۷-۲۹]. از طرف دیگر، هسپرتین موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و حفاظت نوروها در برابر عوامل آسیب‌رسان می‌شود و از این طریق سطح پارامترهای مربوط را کاهش می‌دهد [۱۰، ۱۲]. با توجه به این موضوع که دیابت قندی با تشدید روند استرس اکسیداتیو همراه بوده و بخشی از تغییرات بیوشیمیایی خون در دیابت قندی به‌ویژه در دیابت وابسته به انسولین از این طریق توجیه می‌شود [۱، ۲]، بنابراین بخشی از آثار سودمند هسپرتین در تحقیق حاضر را می‌توان به کاهش دادن پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو نسبت داد.

به‌طور خلاصه تجویز دراز مدت هسپرتین به مدت ۶ هفته موجب افزایش تحمل درد حرارتی و کاهش احساس درد شیمیایی در حد کم در مدل تجربی دیابت قندی القا شده توسط استرپتوزوتوسین می‌شود که این می‌تواند به‌عنوان یک درمان کمکی در هیپرآلژزی دیابتی مطرح شود.

## ۵- تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه دانشجوی پزشکی مصوب دانشگاه شاهد بوده که با حمایت مالی این دانشگاه به انجام



کارشناس گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی شاهد بابت همکاری در انجام آزمایش‌ها اعلام می‌دارند.

رسیده است که بدین وسیله تشکر می‌گردد. نویسندگان مقاله مراتب تشکر فراوان خود را از سرکار خانم فریبا انصاری

## ۶- منابع

- [1] Tripathi BK, Srivastava AK. Diabetes mellitus: complications and therapeutics. *Med Sci Monit* 2006; 12(7): RA130-47.
- [2] Amos AF, McCarty DJ, Zimmet P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet Med* 1997; 14 Suppl 5: S1-85.
- [3] Galer BS, Gianas A, Jensen MP. Painful diabetic polyneuropathy: epidemiology, pain description, and quality of life. *Diabetes Res Clin Pract* 2000; 47(2): 123-8.
- [4] Dobretsov M, Hastings SL, Romanovsky D, Stimers JR, Zhang JM. Mechanical hyperalgesia in rat models of systemic and local hyperglycemia. *Brain Res* 2003; 960(1-2): 174-83.
- [5] Dobretsov M, Hastings SL, Stimers JR, Zhang JM. Mechanical hyperalgesia in rats with chronic perfusion of lumbar dorsal root ganglion with hyperglycemic solution. *J Neurosci Methods* 2001; 110(1-2): 9-15.
- [6] Raz I, Hasdai D, Seltzer Z, Melmed RN. Effect of hyperglycemia on pain perception and on efficacy of morphine analgesia in rats. *Diabetes* 1988; 37(9): 1253-9.
- [7] Nakamura-Craig M, Follenfant RL. Effect of lamotrigine in the acute and chronic hyperalgesia induced by PGE2 and in the chronic hyperalgesia in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Pain* 1995; 63(1): 33-7.
- [8] Buer CS, Imin N, Djordjevic MA. Flavonoids: new roles for old molecules. *J Integr Plant Biol* 2010; 52(1): 98-111.
- [9] Tang H, Dong X, Day RS, Hassan MM, Li D. Antioxidant genes, diabetes and dietary antioxidants in association with risk of pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 2010; 31(4): 607-13.
- [10] Monforte MT, Trovato A, Kirjavainen S, Forestieri AM, Galati EM, Lo Curto RB. Biological effects of hesperidin, a Citrus flavonoid. (note II): hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. *Farmaco* 1995; 50(9): 595-9.
- [11] Bok SH, Lee SH, Park YB, Bae KH, Son KH, Jeong TS, Choi MS. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *J Nutr* 1999; 129(6): 1182-5.
- [12] Choi EJ, Ahn WS. Neuroprotective effects of chronic hesperetin administration in mice. *Arch Pharm Res* 2008; 31(11): 1457-62.
- [13] Aranganathan S, Panneer Selvam J, Nalini N. Hesperetin exerts dose dependent chemopreventive effect against 1, 2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Invest New Drugs* 2009; 27(3): 203-13.

- [14] Jin YR, Han XH, Zhang YH, Lee JJ, Lim Y, Chung JH, Yun YP. Antiplatelet activity of hesperetin, a bioflavonoid, is mainly mediated by inhibition of PLC-gamma2 phosphorylation and cyclooxygenase-1 activity. *Atherosclerosis* 2007; 194(1): 144-52.
- [15] Kuppusamy UR, Das NP. Antilipolytic action of hesperetin in rat adipocytes. *Planta Med* 1993; 59(6): 508-12.
- [16] Borradaile NM, Carroll KK, Kurowska EM. Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanones hesperetin and naringenin. *Lipids* 1999; 34(6): 591-8.
- [17] Cha JY, Cho YS, Kim I, Anno T, Rahman SM, Yanagita T. Effect of hesperetin, a citrus flavonoid, on the liver triacylglycerol content and phosphatidate phosphohydrolase activity in orotic acid-fed rats. *Plant Foods Hum Nutr* 2001; 56(4): 349-58.
- [18] Hirata A, Murakami Y, Shoji M, Kadoma Y, Fujisawa S. Kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression. *Anticancer Res* 2005; 25(5): 3367-74.
- [19] Akiyama S, Katsumata S, Suzuki K, Nakaya Y, Ishimi Y, Uehara M. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of hesperidin and cyclodextrin-clathrated hesperetin in Goto-Kakizaki rats with type 2 diabetes. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009; 73(12): 2779-82.
- [20] Loscalzo LM, Wasowski C, Paladini AC, Marder M. Opioid receptors are involved in the sedative and antinociceptive effects of hesperidin as well as in its potentiation with benzodiazepines. *Eur J Pharmacol* 2008; 580(3): 306-13.
- [21] Choi EJ. Antioxidative effects of hesperetin against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced oxidative stress in mice. *Life Sci* 2008; 82(21-22): 1059-64.
- [22] 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; 4(2): 161-74.
- [23] Courteix C, Eschalier A, Lavarenne J. Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain* 1993; 53(1): 81-8.
- [24] Ceseña RM, Calcutt NA. Gabapentin prevents hyperalgesia during the formalin test in diabetic rats. *Neurosci Lett* 1999; 262(2): 101-4.
- [25] Sameni HR, Panahi M, Sarkaki A, Saki GH, Makvandi M. The neuroprotective effects of progesterone on experimental diabetic neuropathy in rats. *Pak J Biol Sci* 2008; 11(16): 1994-2000.
- [26] Hasanein P, Soltani N. Effects of the endocannabinoid transport inhibitors AM404 and UCM707 on diabetic neuropathy in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009; 36(11): 1127-31.
- [27] Kuhad A, Chopra K. Tocotrienol attenuates oxidative-nitrosative stress and inflammatory cascade in experimental model of diabetic neuropathy. *Neuropharmacology* 2009; 57(4): 456-62.
- [28] Calcutt NA. Potential mechanisms of neuropathic pain in diabetes. *Int Rev Neurobiol* 2002; 50: 205-228.

- [29] Sharma S, Kulkarni SK, Chopra K. Effect of resveratrol, a polyphenolic phytoalexin, on thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol* 2007; 21(1): 89-94.
- [30] Piercy V, Banner SE, Bhattacharyya A, Parsons AA, Sanger GJ, Smith SA, Bingham S. Thermal, but not mechanical, nociceptive behavior is altered in the Zucker Diabetic Fatty rat and is independent of glycemic status. *J Diabetes Complications* 1999; 13(3): 163-9.
- [31] Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989; 38(3): 347-52.
- [32] Rosland JH, Tjølsen A, Maehle B, Hole K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain* 1990; 42(2): 235-42.
- [33] Kumar NP, Annamalai AR, Thakur RS. Antinociceptive property of *Emblica officinalis* Gaertn (Amla) in high fat diet-fed/low dose streptozotocin induced diabetic neuropathy in rats. *Indian J Exp Biol* 2009; 47(9): 737-42.
- [34] Comelli F, Bettoni I, Colleoni M, Giagnoni G, Costa B. Beneficial effects of a *Cannabis sativa* extract treatment on diabetes-induced neuropathy and oxidative stress. *Phytother Res* 2009; 23(12): 1678-84.
- [35] Zeashan H, Amresh G, Rao CV, Singh S. Antinociceptive activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. *J Ethnopharmacol* 2009; 122(3): 492-6.
- [36] Khan H, Saeed M, Gilani AU, Khan MA, Dar A, Khan I. The antinociceptive activity of *Polygonatum verticillatum* rhizomes in pain models. *J Ethnopharmacol* 2010; 127(2): 521-7.
- [37] Filho AW, Filho VC, Olinger L, de Souza MM. Quercetin: further investigation of its antinociceptive properties and mechanisms of action. *Arch Pharm Res* 2008; 31(6): 713-21.
- [38] Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 2001; 74(4): 418-25.