

Evaluation of antinociceptive effect of nano-emulsion gel containing rosemary and peppermint essential oils in a rat model of osteoarthritis

Mojgan Mohammadifar¹, Sayyed Alireza Talaei², Zarichehr Vakili³, Fereshteh Bahmani⁴, Mohammad Reza Memarzadeh⁵, **Mohammad Hossein Aarabi⁶**

1.MSc Students in Clinical Biochemistry, Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

2.Assistant Professor, Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

3.Associate Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

4.Associate Professor, Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

5.PhD of Analytical chemistry, Barij Essence Medicinal Plants Research Center, Kashan, I.R. Iran

6.Associate Professor, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran (Corresponding Author), Tel: 031-37927052, E-mail: aarabimh@yahoo.com

ABSTRACT

Background and Aim: Despite identification of the antinociceptive effects of rosemary and peppermint essential oils, use of these essential oils has been limited due to its low solubility in water and low bioavailability. Use of nanoparticles is one of the ways to overcome these limitations. The aim of this study was to evaluate the antinociceptive effect of nano-emulsions containing rosemary and peppermint essential oils in an animal model of osteoarthritis (OA).

Materials and Methods: In this experimental study nano-emulsions containing rosemary and peppermint essential oils were prepared by spontaneous emulsification. In order to investigate the analgesic effect, 30 male rats were randomly assigned to 5 groups: sham (receiving saline injection into the knee), osteoarthritis (receiving intra-articular injection of 2 mg monosodiumiodoacetate), OA (receiving gels containing nano-emulsion, or rosemary and peppermint essential oil or diclofenac sodium). Treatments were administered topically at a dose of 1 ml daily. Mechanical and thermal allodynia and thermal hyperalgesia tests were performed on the 1st, 4th, 7th and 14th days after injection. Data were analyzed by repeated measures ANOVA.

Results: OA group showed a significant increased behavioral response to the mechanical and thermal stimuli on all days of the experiment compared to the control group ($P < 0.001$). Use of nano-emulsion or diclofenac gel led to significant increase in the response threshold to von-Frey fillamets ($P < 0.001$), decreased response to acetone ($P < 0.05$), and increased paw withdrawal latency ($P < 0.05$). Histopathology of knee tissues confirmed the results of behavioral tests.

Conclusion: Nano-emulsion containing essential oils of rosemary and peppermint reduced pain of osteoarthritis in rats. The nano-emulsification process seems to enhance the antinociceptive effect of rosemary and peppermint essential oils.

Keywords: Nano-emulsion, Essential oil, *Rosmarinus officinalis* L., *Mentha piperita*, Osteoarthritis, Pain, Rat

Received: May 21, 2018

Accepted: July 24, 2018

بررسی اثرات ضد دردی ژل نانوامولسیون حاوی اسانس گیاهان رزماری و نعناع فلفلی در مدل حیوانی استئوآرتریت

مژگان محمدی فر¹، سید علیرضا طلائی²، زریچهر و کیلی³، فرشته بهمنی⁴، محمدرضا معمارزاده⁵، محمد حسین اعرایی⁶

1. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

2. استادیار فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

3. دانشیار، گروه آسیب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

4. دانشیار، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

5- دکتری شیمی تجزیه، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی شرکت داروسازی بارپج اسانس، کاشان، ایران

6. دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران (نویسنده مسئول)، تلفن ثابت: 031-37927052.

E-mail: aarabimh@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: اگرچه اثرات ضد درد اسانس رزماری و نعناع فلفلی نشان داده شده، اما استفاده از اسانس ها به دلیل حلالیت پایین در آب و فراهمی زیستی پایین با محدودیت هایی روبه روست؛ استفاده از نانوذرات یکی از راه های رفع این محدودیت ها می باشد. هدف از این مطالعه تعیین اثر ضد درد نانوامولسیون حاوی اسانس رزماری و نعناع فلفلی در موش های صحرایی مبتلا به استئوآرتریت می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی نانوامولسیون حاوی اسانس رزماری و نعناع فلفلی به روش امولسیون سازی خودبه خودی ساخته شد. جهت بررسی اثر ضد درد 30 سر موش صحرایی نر به طور تصادفی به گروه های شم (تزریق سالین در زانو)، استئوآرتریت (تزریق 2 میلی گرم مونوسدیم یدواستات در مفصل)، استئوآرتریت گیرنده ژل نانوامولسیون، ژل اسانس های رزماری و نعناع فلفلی، و دیکلوفناک سدیم تقسیم شدند. درمان ها به صورت موضعی با دوز 1 میلی لیتر در روز انجام شد. آلودینیای مکانیکی و حرارتی و هایپرآلژزی حرارتی در روزهای 1، 4، 7 و 14 پس از جراحی انجام شد. داده ها با آزمون آماری repeated measures ANOVA آنالیز شدند.

یافته ها: پاسخ رفتاری موش های گروه استئوآرتریت به محرک های مکانیکی و حرارتی در تمامی روزهای آزمون نسبت به گروه شاهد افزایش معنی داری داشت ($P < 0/001$). دریافت ژل نانو و دیکلوفناک به طور معنی داری موجب افزایش آستانه پاسخ به تارهای ون فری ($P < 0/001$)، کاهش پاسخ به استون ($P < 0/05$) و افزایش تاخیر در عقب کشیدن پا ($P < 0/05$) گردید. بررسی بافت شناسی نتایج آزمون های رفتاری را تایید نمود.

نتیجه گیری: نانوامولسیون حاوی اسانس گیاهان رزماری و نعناع فلفلی سبب کاهش درد در موش های مبتلا به استئوآرتریت می شود. به نظر می رسد فرایند نانوامولسیونه کردن، اثر ضد درد اسانس های رزماری و نعناع فلفلی را تقویت می کند.

کلید واژه ها: نانوامولسیون، اسانس، رزماری، نعناع فلفلی، استئوآرتریت، درد، موش صحرایی

وصول مقاله: 97/2/31 اصلاحیه نهایی: 97/4/31 پذیرش: 97/5/2

مقدمه

اسانس‌ها ترکیبات طبیعی و فراری هستند که از گیاهان معطر استخراج شده و یکی از آثار بیولوژیک آنها تسکین درد می‌باشد (1). رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) گیاهی معطر و چندساله از خانواده نعناعیان (*Lamiaceae*) است. اثرات ضد باکتریایی، ضد التهاب و ضد دردی رزماری در مطالعات مختلف گزارش شده است (3و2). گزارش شده است که رزماری می‌تواند درد ناشی هاپیرآلژی حرارتی را در موش کاهش دهد (2). در پژوهشی نشان داده شد که رزماری آلودینیای حرارتی و مکانیکی را در مدل آسیب فشاری عصب سیاتیک بهبود می‌بخشد (4). اسانس نعناع فلفلی از جمله دیگر اسانس‌هایی است که اثر بی‌حس‌کنندگی و ضد درد آن به اثبات رسیده است (6 و 5). نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) هیبریدی از نعناع دشتی (*Mentha spicata*) و نعناع آبی یا جویباری (*Mentha aquatica*) می‌باشد. در مطالعه انجام شده توسط Taher گزارش شده است که برگ نعناع فلفلی می‌تواند درد ناشی از تزریق استیک اسید را کاهش دهد (7). با وجود این اثرات اسانس‌ها، استفاده از آنها در داروسازی با محدودیت روبه‌رو است، حلالیت پایین در آب و حساس بودن به نور و اکسیژن، منجر به کاهش فراهمی زیستی (*Bioavailability*) اسانس شده و این امر افزایش دوز مصرفی و تجویز مکرر دارو را سبب می‌گردد (9 و 8). سیستم‌های دارورسانی نوین رویکردی جدید و ابزاری مناسب به‌منظور رفع این محدودیت‌ها و مشکلات ارائه می‌کنند. یکی از روش‌های رفع محدودیت در استفاده از اسانس‌ها، ساخت نانوذرات از جمله نانومولسیون‌ها است (10) که به دلیل پایداری بالاتر از سایر نانوذرات لیپیدی، بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند (11). نانومولسیون‌ها، امولسیون‌هایی هستند که اندازه ذرات آنها از 20 تا 200 نانومتر متغیر بوده و معمولاً زیر 100 نانومتر می‌باشد. انکپسولاسیون اسانس‌ها در نانومولسیون، حفاظت از اسانس

و نیز رهاسازی کنترل شده آن را تضمین می‌کند (12). افزایش فراهمی زیستی دارو، افزایش پایداری فیزیکی، افزایش شرایط جذب، قدرت نفوذ پوستی مناسب، توانایی قرارگیری در فرمولاسیون‌هایی مانند کرم و اسپری، افزایش کارایی دارو و روش‌های تهیه ساده آن، از جمله ویژگی‌های مهم نانومولسیون‌ها به شمار می‌آید (14 و 13). بنابراین به نظر می‌رسد تولید نانومولسیون حاوی اسانس‌ها، بتواند اثر ضد دردی اسانس‌ها را افزایش دهد. یکی از بهترین مدل‌های آزمایشگاهی بررسی درد و کنترل موضعی آن مدل استئوآرتریت است (15)؛ چرا که اصلی‌ترین مشخصه پاتولوژیک آن تخریب موضعی غضروف مفصلی است (16) و به دنبال آن ساییدگی استخوان‌های مفصلی موجب بروز التهاب و درد در این ناحیه می‌گردد (16). جهت کاهش درد در این بیماران می‌توان از داروهای گیاهی استفاده نمود. برای مثال، در مطالعه قنادی و همکاران گزارش شده است پماد حاوی امولسیون اسانس‌های رزماری و اسطوخدوس می‌تواند شدت درد زانو را در بیماران مبتلا به استئوآرتریت کاهش دهد (17). و یا در پژوهش دیگری نشان داده شده است که کرم حاوی اسانس نعناع فلفلی، کافور و کاج کاشفی درد ناشی از استئوآرتریت را کاهش می‌دهد (18). با توجه به اینکه به نظر می‌رسد فرایند نانومولسیونه کردن بتواند اثربخشی اسانس‌های رزماری و نعناع فلفلی را افزایش دهد، هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد دردی ژل نانومولسیونی حاوی اسانس‌های رزماری و نعناع فلفلی به منظور تولید یک داروی ضد درد موضعی کارآمدتر بر پایه ترکیبات گیاهی می‌باشد.

روش بررسی

برای انجام این پژوهش تجربی از 30 سر موش صحرایی نر نژاد ویستار استفاده گردید. حیوانات از مرکز پرورش حیوانات دانشگاه علوم پزشکی کاشان تهیه شده و در

1:1:3 به ترتیب برای کرودرت، توئین 20 و توئین 80 می باشد. همچنین کمک حلال‌های پروپیلین گلیکول و پلی اتیلن گلیکول با نسبت 1 به 2 استفاده گردید. به منظور تهیه نانوامولسیون، فاز آبی شامل کمک حلال‌ها و آب، و فاز روغنی شامل امولسیفایرها و اسانس‌های رزماری و نعناع فلفلی هر کدام به صورت جداگانه تهیه شدند. در مرحله بعد فاز آبی به آرامی به فاز روغنی که در حال همگن شدن بود، اضافه شد. فرآیند همگن سازی به مدت 20 دقیقه و با سرعت بالا ادامه پیدا کرد تا نانوامولسیون تک فاز و شفاف حاصل شد. برای تهیه ژل نانوامولسیون از پلیمر کربومر استفاده شد؛ بدین صورت که کربومر در میزان مشخصی آب مقطر هیدراته شده سپس pH آن با تری- اتانول آمین روی $6/8 \pm 0/2$ تنظیم گردید. پس از آن نانوامولسیون به پایه ژل اضافه گردید و تا هموژن شدن کامل مخلوط شد. برای تهیه ژل اسانس‌ها هر دو اسانس با نسبت مساوی باهم ترکیب شدند و طبق روش گفته شده ژل آنها تهیه گردید.

آزمون‌های رفتاری:

این آزمون‌ها در همه گروه‌ها در روزهای 1، 4، 7 و 14 پس از جراحی انجام شد.

آلودینیای مکانیکی (von-Frey filament): جهت انجام این آزمون حیوانات 20 دقیقه قبل از انجام تست، روی یک شبکه سیمی در داخل یک محفظه پلاستیکی گلاس قرار داده شدند. جهت سنجش آلودینیای مکانیکی از تارهای von Frey با وزن 2، 4، 6، 8، 10، 15، 26 و 60 گرم استفاده شد. هر آزمایش با تار دارای کمترین وزن شروع شده و به ترتیب در صورت عدم پاسخ، تار با شماره بالاتر انتخاب می‌شد. هر تار 3 بار متوالی به فاصله 5 ثانیه و هر بار به مدت 1 ثانیه به کف پای چپ حیوان فشار داده می‌شد. اگر 2 بار متوالی پاسخ داده می‌شد (حیوان پای خود را بلند می‌کرد)، آستانه پاسخ به حساب آمده و آزمایش ادامه پیدا نمی‌کرد. در صورتی که حیوان به تار شماره 60 نیز

حیوان‌خانه با دمای 22 ± 2 C° و رطوبت 45٪ و سیکل روشنایی و تاریکی 12 ساعته نگه‌داری شدند. موش‌ها در طول مطالعه از نظر دسترسی به آب و غذا محدودیتی نداشتند. اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مطابق با دستورات کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کاشان رعایت گردید. حیوانات به صورت تصادفی به گروه‌های زیر تقسیم شدند: گروه شم (تزریق سالیین در مفصل زانو)، گروه استئوآرتری، و گروه‌های استئوآرتری دریافت کننده ژل نانوامولسیون (ژل نانو)، ژل حاوی اسانس‌های رزماری و نعناع فلفلی (ژل اسانس) و ژل دیکلوفناک. داروها روزانه به میزان 1 میلی لیتر به صورت موضعی به مدت 14 روز روی زانوی حیوانات مالیده شده و گروه استئوآرتری حامل دارو را دریافت می‌نمود.

ایجاد مدل استئوآرتری:

برای ایجاد استئوآرتری از تزریق مونوسدیم یدوآستات (MIA) استفاده گردید (19). بدین ترتیب که ابتدا حیوان با تزریق داخل صفاقی کتامین-زایلازین (به ترتیب 100 و 10 میلی گرم بر کیلوگرم) بیهوش شده و سپس با استفاده از سرسوزن شماره 27 مقدار 2 میلی گرم مونوسدیم یدوآستات حل شده در 25 میکرولیتر نرمال سالین به فضای مفصلی زانوی چپ حیوان تزریق شد. به حیوانات گروه کنترل 25 میکرولیتر نرمال سالین تزریق شد.

ساخت نانوامولسیون حاوی گیاهان رزماری و نعناع فلفلی: اسانس‌های گیاهان رزماری و نعناع فلفلی از شرکت داروسازی بارچ اسانس کاشان خریداری شدند. جهت ساخت نانوامولسیون از روش امولسیون سازی خودبه خودی (Spotaneous emulsification) استفاده شد. در مطالعه قبلی انجام گرفته توسط محققین مرکز تحقیقات ما به منظور رسیدن به بهترین فرمولاسیون جهت تشکیل یک نانو امولسیون پایدار نسبت‌های مختلفی از امولسیفایرها با اسانس‌ها ترکیب شدند (نتایج منتشر نشده است). نتایج حاکی از آن بود که بهترین نسبت برای امولسیفایرها نسبت

پاسخ نمی‌داد، عدد 60 به عنوان آستانه پاسخ در نظر گرفته می‌شد (20).

آلودینیای حرارتی (پاشیدن استون به کف پا): جهت مشخص کردن حساسیت حیوان به محرک غیردردناک حرارتی از این تست استفاده گردید. در این روش یک قطره استون به کف پای حیوان پاشیده می‌شد. در صورتی که با پاشیده شدن استون حیوان پای خود را بلند می‌کرد، به عنوان پاسخ مثبت و در غیر این صورت پاسخ منفی در نظر گرفته می‌شد. آزمون 5 بار و هر بار به فاصله 3 دقیقه انجام می‌گرفت. سپس درصد پاسخ مثبت به کل تعداد تحریکات طبق فرمول زیر محاسبه می‌شد (20).

سنجش میزان لنگیدن (Ambulatory-evoked pain):

برای محاسبه این شاخص حیوانات درون محفظه‌ای از جنس پلکسی گلاس با کف صاف قرار داده شده و پس از عادت کردن به محیط جدید، میزان لنگیدن به صورت زیر امتیازدهی می‌شد [21]: صفر: حیوان نمی‌لنگد؛ یک: حیوان لنگی خفیف دارد؛ دو: حیوان لنگی شدید دارد؛ و سه: حیوان از پای آسیب دیده استفاده نمی‌کند.

بررسی بافت مفصل:

در روز پانزدهم مطالعه حیوانات پس از بیهوشی با دی‌اتیل‌اتر گردن زده شدند و سپس مفصل زانوی حیوانات جدا شده و بافت نرم اطراف آن برداشته شد. مفاصل جدا شده پس از شستشو در نرمال سالین برای انجام بررسی‌های پاتولوژیک درون فرمالین 10 درصد قرار گرفت. بافت‌های فیکس شده درون محلول 5٪ فرمیک اسید دکلسیفیه شده و سپس نمونه‌ها در دستگاه پاساژ بافت پردازش گردیده و بلوک پارافینی تهیه شد. سپس برش‌هایی به ضخامت 5 میکرومتر از بافت‌ها تهیه شده و با روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی گردید. لام‌های تهیه شده توسط پاتولوژیست و با میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

آنالیز آماری داده‌ها:

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد میانگین نمایش داده شدند. به منظور آنالیز داده‌های حاصل از آزمون‌های رفتاری در مدل استئوآرتریت از آزمون آماری repeated measures ANOVA استفاده گردید. همچنین، برای مقایسه دویه‌دوی گروه‌ها از پس آزمون Tukey استفاده شد. تمام آنالیزها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش 16 انجام شد و مقادیر خطای آلفای کمتر از 0/05 معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

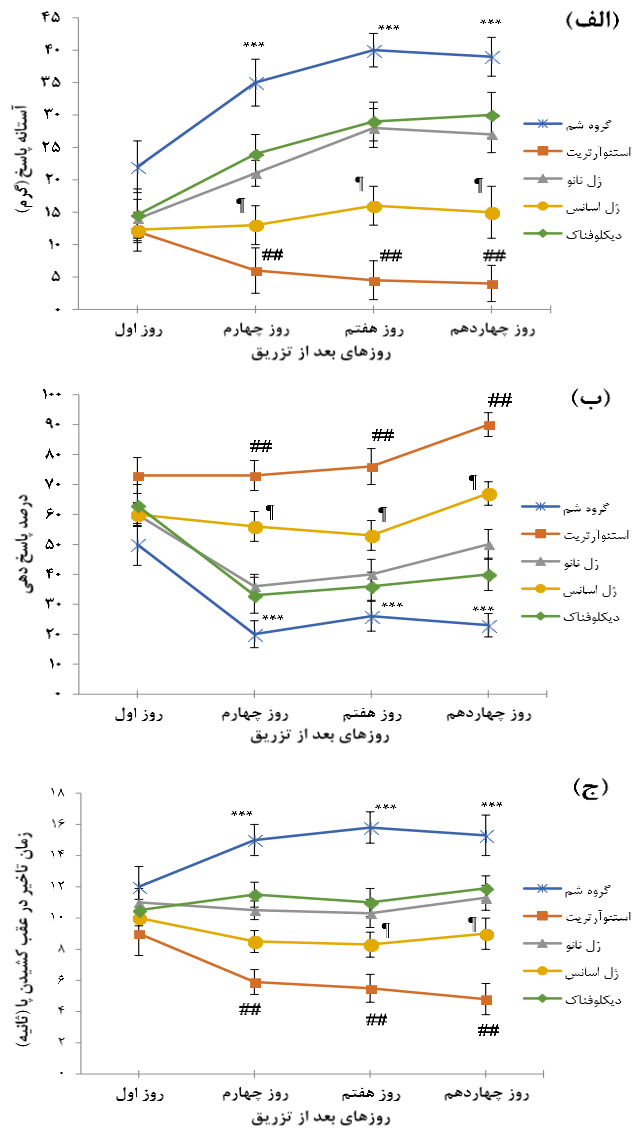
آنالیز داده‌ها نشان داد که القای استئوآرتریت به طور قابل توجهی آستانه پاسخ به فیلامان های von Frey را کاهش می‌دهد ($P < 0/001$). با توجه به نمودار 1-الف می‌توان مشاهده کرد که اختلاف بین گروه استئوآرتریت و گروه-های دریافت کننده ژل نانو، ژل اسانس و دیکلوفناک در روزهای 4، 7 و 14 پس از تزریق معنی‌دار بوده است ($P < 0/01$). همچنین، آنالیز داده‌ها حاکی از آن است که اختلاف بین گروه ژل نانو و ژل دیکلوفناک معنی‌دار نیست ($P < 0/05$)، این در حالی است که اثر ضددردی ژل نانو به طور معنی‌داری بیشتر از ژل اسانس بوده است ($P < 0/05$). آلودینیای حرارتی (تست استون):

نتایج نشان داد که اختلاف بین گروه استئوآرتریت و گروه شام در تمامی روزها معنی‌دار است ($P < 0/001$). دریافت ژل‌های نانو، اسانس و دیکلوفناک در روزهای 4، 7 و 14 بعد از تزریق توانست درصد پاسخ به استون را نسبت به گروه استئوآرتریت کاهش دهد ($P < 0/01$). همچنین، آنالیز آماری نشان دهنده این بود که ژل نانو نسبت به ژل اسانس به طور موثرتری آلودینیای ناشی از پاشیدن استون را کاهش می‌دهد ($P < 0/05$). به علاوه، اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های ژل نانو و ژل دیکلوفناک دیده نشد ($P = 0/06$).

هایپرآلژزیای حرارتی (تست پلانتر):

افزایش دهد ($P<0/01$). همچنین، آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که اثر ضد دردی نانوامولسیون بیشتر از ژل اسانس بوده ($P<0/05$) و اختلاف بین گروه ژل نانو و ژل دیکلوفناک معنی دار نیست ($P=0/09$).

همان‌طور که در نمودار 1-ج نشان داده شده است و اختلاف بین گروه‌های استئوآرتزیت و شم در روزهای 4، 7 و 14 بعد از تزریق معنی دار بوده است ($P<0/001$). دریافت ژل نانو، ژل اسانس و ژل دیکلوفناک توانست زمان تاخیر در عقب کشیدن پا را نسبت به گروه استئوآرتزیت



نمودار 1- پاسخ به تارهای von Frey (الف)، پاسخ به استون (ب) و زمان تاخیر در عقب کشیدن پا در تست پلاتار (ج) طی روزهای اول، چهارم، هفتم و چهاردهم پس از تزریق مونوسدیم یدوآستات در زانوی موش های صحرایی مدل استئوآرتزیت. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد میانگین نمایش داده شده‌اند.

*** اختلاف معنی دار نسبت به گروه شم ($P<0/001$)

اختلاف معنی دار نسبت به گروه استئوآرتزیت ($P<0/01$)

¶ اختلاف معنی دار گروه ژل نانو نسبت به گروه ژل اسانس ($P<0/05$)

میزان لنگیدن:

میزان لنگیدن تمامی حیوانات در روزهای 1، 4، 7 و 14 بررسی شد. نتایج نشان داد که حیوانات تمام گروه‌ها در روز اول می‌لنگند. در روزهای بعدی مطالعه موش‌های گروه شم هیچ اختلالی در راه رفتن نشان ندادند. این در حالی است که در گروه استئوآرتریت بیشتر حیوانات پای خود را روی

زمین قرار نمی‌دادند ($P < 0/001$ نسبت به گروه شم). در سایر گروه‌ها درجات مختلفی از لنگیدن مشاهده شد (جدول 1). آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که میزان لنگیدن موش‌های گروه ژل نانو و دیکلوفناک نسبت به گروه ژل اسانس به‌طور معنی‌داری کمتر می‌باشد ($P < 0/05$).

جدول 1- میزان لنگیدن موش‌های صحرائی در گروه‌های مختلف مطالعه.

| گروه‌ها | روز اول | روز چهارم | روز هفتم | روز چهاردهم | معنی‌داری |
|-----------------|----------|-----------|----------|-------------|-----------|
| گروه شم | 2±0/03 | 0 | 0 | 0 | |
| استئوآرتریت | 3±0/05 | 2/7±0/06 | 2/5±0/08 | 3±0/03 | *** |
| ژل نانوامولسیون | 2/5±0/1 | 2±0/02 | 1/5±0/09 | 1/3±0/05 | #¶ |
| ژل اسانس | 2/7±0/06 | 2/5±0/02 | 1/7±0/09 | 2±0/04 | # |
| دیکلوفناک | 2±0/05 | 1/5±0/06 | 1/3±0/01 | 1±0/03 | #¶ |

داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف استاندارد میانگین نمایش داده شده‌اند. میزان لنگیدن حیوانات در هر روز بدین شکل امتیازدهی شده است: صفر: حیوان نمی‌لنگد؛ یک: حیوان لنگی خفیف دارد؛ دو: حیوان لنگی شدید دارد؛ سه: حیوان از پای آسیب دیده استفاده نمی‌کند.

*** اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه شم ($P < 0/001$)

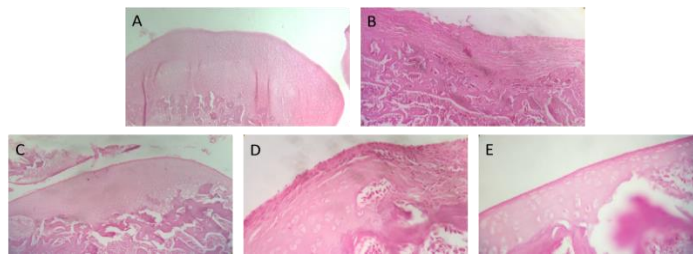
اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه استئوآرتریت ($P < 0/05$)

¶ اختلاف معنی‌دار گروه ژل نانو نسبت به گروه ژل اسانس ($P < 0/05$)

نتایج بافت‌شناسی:

نتایج حاصل از بررسی بافتی نشان داد که بافت مفصل موش‌های گروه شم طبیعی بوده و اثری از تخریب غضروف و وجود سلول‌های التهابی دیده نمی‌شود. درحالی‌که تزریق مونوسدیم یدواستات موجب تخریب غضروف و جایگزینی بافت فیبروهمبندی به جای آن گردیده است. در برخی نواحی ضخامت غضروف کاهش یافته و بر سطح آن فیبریلایسیون و جداشدن قطعات غضروف دیده شد. همچنین احتقان عروقی، ادم و ارتشاح سلول‌های التهابی دیده شد. در گروه ژل نانو کاهش ضخامت غضروف و فیبریلایسیون

سطحی همراه با احتقان عروقی دیده می‌شود. در گروه ژل اسانس علاوه بر کاهش نسبتاً شدید ضخامت غضروف، تخریب غضروف و تشکیل بافت همبندی به جای آن دیده می‌شود. همچنین آنژیوژنز نیز مشاهده می‌گردد. در گروه ژل دیکلوفناک در برخی مناطق فیبریلایسیون سطح غضروف و ارتشاح سلول‌های التهابی و در برخی نواحی مفصل غضروف طبیعی دیده می‌شود. در مجموع می‌توان گفت نانوامولسیون و دیکلوفناک نسبت به گروه ژل اسانس وضعیت پاتولوژیک بهتری دارند.



تصویر 1- غضروف مفصل زانوی موش‌های صحرایی (رنگ آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین). A: گروه شم (ضخامت و ساختار غضروف طبیعی است). B: گروه استئوآرتریت (تخریب شدید بافت غضروف و جایگزینی بافت همبند). C: گروه دریافت کننده ژل نانوامولسیون (فیبریلایسون و التهاب سطح غضروف، ضخامت غضروف کاهش یافته است). D: گروه دریافت کننده ژل اسانس (فیبریلایسون غضروف و التهاب در بافت، کاهش ضخامت غضروف). E: گروه دریافت کننده ژل دیکلوفناک (فیبریلایسون سطحی خفیف، ساختار طبیعی غضروف با ضخامت کم).

بحث

در مطالعه حاضر برای بررسی اثر ضد دردی نانوامولسیون حاوی اسانس رزماری و نعناع فلفلی از مدل حیوانی استئوآرتریت استفاده شد. نتایج حاکی از آن بود که مصرف روزانه نانوامولسیون می‌تواند سبب کاهش درد در موش‌های صحرایی مبتلا به استئوآرتریت گردد. استفاده از این نانوامولسیون سبب کاهش میزان لنگیدن در حیوانات گردید. داده‌های حاصل از بررسی‌های بافت‌شناسی نیز نشان دهنده بهبود وضعیت مفصل زانو در موش‌های صحرایی پس از دریافت نانوامولسیون بود. همچنین ژل حاصل از ترکیب اسانس‌های رزماری و نعناع فلفلی سبب کاهش درد و بهبود وضعیت پاتولوژیک زانوی موش‌ها گردید، اما این اثر بهبود دهنده کمتر از اثر نانوامولسیون مورد استفاده بود. این امر می‌تواند به دلیل افزایش جذب و پایداری فیزیکی دارو پس از تبدیل به نانوامولسیون باشد.

استئوآرتریت یکی از شایع‌ترین اختلالات عضلانی اسکلتی است که شکایت اصلی بیماران مبتلا به آن درد مفاصل می‌باشد (15). برای کاهش این درد می‌توان از داروهای خوراکی یا موضعی استفاده نمود. عمده‌ترین داروی مورد استفاده در این بیماران ضدالتهاب‌های غیر استروئیدی می‌باشند که عوارض جانبی آنها مشخص شده است (22). جهت کاهش درد در این بیماران می‌توان از داروهای گیاهی استفاده نمود. برای مثال، قناری و همکاران نشان داده‌اند که پماد حاوی امولسیون اسانس‌های رزماری و اسطوخدوس می‌تواند شدت درد زانو را در بیماران مبتلا به

استئوآرتریت کاهش دهد (17). همچنین، در مطالعه Abdelhalim و همکاران نشان داده شد که عصاره گیاه رزماری سبب کاهش درد ناشی از هایپرآلژزی حرارتی شده و از طریق عمل بر گابا در سیستم اعصاب مرکزی موجب بروز اثرات ضد درد و ضد افسردگی در موش‌های صحرایی می‌گردد (2). در مطالعه دیگری بیان شده است که رزمارینیک اسید می‌تواند ادم و التهاب ناشی از کاراجینان را در موش‌های آزمایشگاهی بهبود بخشد (23). در پژوهش Mannelli و همکاران بیان شده است که ترپنوئیدهای موجود در رزماری می‌تواند آلودینیای مکانیکی و حرارتی ایجاد شده در مدل آسیب فشاری مزمن عصب سیاتیک را بهبود بخشد (24). اسانس نعناع هم از دیر باز به عنوان یک ضداسپاسم به کار می‌رفته است. نشان داده شده است که اسانس نعناع درد ناشی از تزریق فرمالین و استیک اسید را در موش‌های صحرایی کاهش می‌دهد (25). همچنین در مطالعه دیگری بیان شده است که اسانس نعناع می‌تواند پردردی ناشی از حرارت را در تست پلانتر کاهش دهد (26). در پژوهش دیگری نشان داده شده است که کرم حاوی اسانس نعناع فلفلی، کافور و کاج کاشفی درد ناشی از استئوآرتریت را کاهش می‌دهد (18).

همانطور که گفته شد اسانس‌های رزماری و نعناع فلفلی سبب کاهش درد در بیماران استئوآرتریت شده‌اند. اما به دلیل جذب پایین و روغنی بودن اسانس‌ها، استفاده از آنها در فرمولاسیون‌های دارویی مشکل می‌باشد. استفاده از اسانس‌های گیاهان دارویی نیز به دلیل ناپایداری و حلالیت

پوستی آن می‌شود (27). بنابراین به نظر می‌رسد تبدیل داروها به نانوامولسیون می‌تواند موجب افزایش جذب و اثربخشی آنها گردد.

نتیجه گیری

در کل می‌توان گفت نانوامولسیون حاوی اسانس گیاهان رزماری و نعناع فلفلی، درد حیوانات مبتلا به استئوآرتریت را به طور موثرتری نسبت به اسانس‌ها کاهش می‌دهد و می‌توان این نانوامولسیون را در قالب فرمولاسیون‌های دارویی همچون ژل به کار برد. به نظر می‌رسد این فرآورده بتواند جایگزین مناسبی برای فرآورده‌های موضعی ضد درد از جمله غیر التهاب‌های استروئیدی گردد. البته این امر مستلزم بررسی‌های بیشتر و کارآزمایی‌های بالینی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از نتایج پایان نامه دوره کارشناسی ارشد است که هزینه آن از طریق طرح تحقیقاتی شماره 96145 مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان تامین شده است. بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از آن معاونت و آقایان سید مهدی جلالی و حسین عصار، کارمندان مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی کاشان اعلام می‌دارند.

Reference

1. Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res* 2007; 21: 308-23.
2. Abdelhalim A, Karim N, Chebib M, Aburjai T, Khan I, Johnston GA, et al. Antidepressant, anxiolytic and antinociceptive activities of constituents from *Rosmarinus officinalis*. *J Pharm Pharm Sci* 2015; 18: 448-59.
3. Bakırel T, Bakırel U, Keleş OÜ, Ülgen SG, Yardibi H. In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *J Ethnopharmacol* 2008; 116: 64-73.
4. Rahbardar Ghasemzadeh M, Amin B, Mehri S, Mirnajafi-Zadeh SJ, Hosseinzadeh H. Effect of alcoholic extract of aerial parts of *Rosmarinus officinalis* L. on pain, inflammation

پایین اسانس‌ها با محدودیت‌هایی روبروست. در صورتی که در مطالعات مختلف نشان داده شده است که اسانس‌ها پتانسیلی امیدوارکننده برای حفظ و ارتقای سلامت، پیشگیری و درمان برخی از بیماری‌ها را دارا می‌باشند (1). اسانس‌ها در صنایع دارویی، غذایی، کشاورزی، آرایشی و بهداشتی اهمیت تجاری دارند. با این حال، اسانس‌ها ترکیبات ناپایدار، فرار و دارای ماهیت هیدروفوبی‌اند. وزن مولکولی بالا و حساس بودن به نور و اکسیژن، منجر به کاهش فراهمی زیستی (Bioavailability) و افزایش کلیرانس آنها در بدن می‌گردد که سبب نیاز به افزایش دوز مصرفی و تجویز مکرر دارو می‌گردد (9 و 8). استفاده از نانوامولسیون‌ها برای فرموله کردن اسانس‌ها می‌تواند راهکار مناسبی برای حل این مشکلات باشد.

نانوامولسیون‌ها، امولسیون‌هایی با مقیاس نانو هستند که جهت بهبود رسانش ترکیبات دارویی فعال، تولید شده‌اند. در دهه‌های اخیر، گرایش به نانوامولسیون‌ها به دلیل پایداری بالا و ویژگی‌هایی که در دارورسانی دارند، به‌طور چشمگیر رشد یافته است. انکپسولاسیون اسانس‌ها در نانوامولسیون، حفاظت از اسانس و رهاسازی کنترل شده آن را نیز تضمین می‌کند (12). در مطالعه Dhawan و همکاران نشان داده شده است که ژل نانوامولسیونی حاوی پیروکسیکام می‌تواند جذب پوستی این دارو را افزایش دهد (11). در مطالعه دیگری بیان شده است که تبدیل کتوپروفن به نانوامولسیون سبب افزایش حلالیت این دارو و در نتیجه افزایش جذب

- and apoptosis induced by chronic constriction injury (CCI) model of neuropathic pain in rats. *J Ethnopharmacol* 2016; 194: 117-30.
5. de Sousa AAS, Soares PMG, de Almeida ANS, Maia AR, de Souza EP, Assreuy AMS. Antispasmodic effect of *Mentha piperita* essential oil on tracheal smooth muscle of rats. *J Ethnopharmacol* 2010; 130: 433-6.
 6. Guimaraes AG, Quintans JS, Quintans Junior LJ. Monoterpenes with analgesic activity—a systematic review. *Phytother Res* 2013; 27: 1-15.
 7. Taher YA. Antinociceptive activity of *Mentha piperita* leaf aqueous extract in mice. *Libyan J Med* 2012; 7: 10.3402/ljm.v7i0.16205.
 8. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oil- a review. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 446-75.
 9. Raut JS, Karuppayil SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind Crops Prod* 2014; 2014: 250-64.
 10. Thakkar PJ, Madan P, Lin S. Transdermal delivery of diclofenac using water-in-oil microemulsion: formulation and mechanistic approach of drug skin permeation. *Pharm Dev Technol* 2013; 19: 373-84.
 11. Dhawan B, Aggarwal G, Harikumar S. Enhanced transdermal permeability of piroxicam through novel nanoemulgel formulation. *International journal of pharmaceutical investigation* 2014; 4: 65.
 12. El Asbahani A, Miladi K, Badri W, Sala M, Ait Addi EH, Casabianca H, et al. Essential oils: from extraction to encapsulation. *Int J Pharm* 2015; 483: 220-43.
 13. Okonogi S, Chaiyana W. Enhancement of anti-cholinesterase activity of *Zingiber cassumunar* essential oil using a microemulsion technique. *Drug Discov Ther* 2012; 6: 249-55.
 14. Shakeel F, Baboota S, Ahuja A, Ali J, Shafiq S. Skin permeation mechanism and bioavailability enhancement of celecoxib from transdermally applied nanoemulsion. *J Nanobiotechnology* 2008; 6: 8.
 15. Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, Conaghan PG, Cooper C, Goldring MB, et al. Osteoarthritis. *Nat Rev Dis Primers* 2016; 2: 16072.
 16. Blaney Davidson EN, van Caam AP, van der Kraan PM. Osteoarthritis year in review 2016: biology. *Osteoarthritis Cartilage* 2017; 25: 175-80.
 17. Ghannadi A, Karimzadeh H, Tavakoli N, Darafsh M, Ramezanloo P. Efficacy of a combined rosemary and lavender topical ointment in the treatment of patients with osteoarthritis of the knee. *Zahedan J Res Med Sci* 2013; 15: 29-33.
 18. Wadnap N, Johnson J, Bhatt N, Chitre D. Efficacy and safety of RA-11 (O)—A herbal analgesic cream. *Indian J Tradit Know* 2006; 5: 384-7.
 19. Marker CL, Pomonis JD. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis pain in the rat. *Methods Mol Biol* 2012; 851: 239-48.
 20. Hamidi GA, Ramezani MH, Arani MN, Talaei SA, Mesdaghinia A, Banafshe HR. Ethosuximide reduces allodynia and hyperalgesia and potentiates morphine effects in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2012; 674: 260-4.
 21. Miao X-R, Gao X-F, Wu J-X, Lu Z-J, Huang Z-X, Li X-Q, et al. Bilateral downregulation of Nav1.8 in dorsal root ganglia of rats with bone cancer pain induced by inoculation with Walker 256 breast tumor cells. *BMC Cancer* 2010; 10: 216.
 22. Dougados M. Why and how to use NSAIDs in osteoarthritis. *Cardiovasc Pharmacol Ther* 2006; 47: S49-54.

23. Boonyarikpunchai W, Sukrong S, Towiwat P. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid isolated from *Thunbergia laurifolia* Lindl. *Pharmacol Biochem Behav* 2014; 124: 67-73.
24. Di Cesare Mannelli L, Micheli L, Maresca M, Cravotto G, Bellumori M, Innocenti M, et al. Anti-neuropathic effects of *Rosmarinus officinalis* L. terpenoid fraction: relevance of nicotinic receptors. *Scientific Reports* 2016; 6: 34832.
25. Sousa PJ, Linard CF, Azevedo-Batista D, Oliveira AC, Coelho-de-Souza AN, et al. Antinociceptive effects of the essential oil of *Mentha x villosa* leaf and its major constituent piperitenone oxide in mice. *Braz Jmed Biol Res* 2009; 42: 655-9.
26. Atta AH, Alkofahi A. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of some Jordanian medicinal plant extracts. *J Ethnopharmacol* 1998; 60: 117-24.
27. Arora R, Aggarwal G, Harikumar SL, Kaur K. Nanoemulsion Based Hydrogel for Enhanced Transdermal Delivery of Ketoprofen. *J Adv Med Med Res* 2014; 2014: 12.