مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و سوم / مهر و آبان 1397/109 -100

Eavaluation of antinociceptic effect of nano-emulsion gel conataining rosemary and peppermint essential oils in a rat model of osteoarthritis

Mojgan Mohammadifar[1], Sayyed Alireza Talaei[2], Zarichehr Vakili[3], Fereshteh Bahmani[4], Mohammad Reza Memarzadeh[5], Mohammad Hossein Aarabi[6]

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 1^{st}, 4^{th} , 7^{th} and 14^{th} 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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.52547/sjku.23.4.100]

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

مژگان محمدی فر[1]، سید علیرضا طلائی[2]، زریچهر وکیلی[3]، فرشته بهمنی[4]، محمدرضا معمارزاده[5]، محمد حسین اعرابی[6]

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 آسیب‌شناسی، 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 باریج اسانس، کاشان، ایران
6. دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران(نویسنده مسئول)،تلفن ثابت: 37927052-031،
E-mail: aarabimh@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: اگرچه اثرات ضددردی اسانس رزماری و نعناع فلفلی نشان داده شده، اما استفاده از اسانس‌ها به‌دلیل حلالیت پایین در آب و فراهمی زیستی پایین با محدودیت‌هایی روبه‌رواست؛ استفاده از نانوذرات یکی از راه‌های رفع این محدودیت‌ها می‌باشد. هدف از این مطالعه تعیین اثر ضددردی نانوامولسیون حاوی اسانس رزماری و نعناع فلفلی در موش‌های صحرایی مبتلا به استئوآرتریت می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی نانوامولسیون حاوی اسانس رزماری و نعناع فلفلی به روش امولسیون‌سازی خودبه‌خودی ساخته شد. جهت بررسی اثر ضددردی 30 سر موش صحرایی نر به‌طور تصادفی به گروه‌های شم (تزریق سالین در زانو)، استئوآرتریت (تزریق 2 میلی‌گرم مونوسدیم‌یدواستات در مفصل)، استئوآرتریت گیرنده ژل نانوامولسیون، ژل اسانس‌های رزماری و نعناع فلفلی، و دیکلوفناک سدیم تقسیم شدند. درمان‌ها به‌صورت موضعی با دوز 1 میلی‌لیتر در روز انجام شد. آلودینیای مکانیکی و حرارتی و هایپرآلژزی حرارتی در روزهای 1، 4، 7 و 14 پس از جراحی انجام شد. داده‌ها با آزمون آماری repeated measures ANOVA آنالیز شدند.

یافته‌ها: پاسخ رفتاری موش‌های گروه استئوآرتریت به محرک‌های مکانیکی و حرارتی در تمامی روزهای آزمون نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت($P<0/001$). دریافت ژل نانو و دیکلوفناک به‌طور معنی‌داری موجب افزایش آستانه پاسخ به تارهای ون‌فری($P<0/001$)، کاهش پاسخ به استون ($P<0/05$) و افزایش تاخیر در عقب کشیدن پا ($P<0/05$) گردید. بررسی بافت‌شناسی نتایج آزمون‌های رفتاری را تایید نمود.

نتیجه‌گیری: نانوامولسیون حاوی اسانس گیاهان رزماری و نعناع فلفلی سبب کاهش درد در موش‌های مبتلا به استئوآرتریت می‌شود. به‌نظر می‌رسد فرایند نانوامولسیونه کردن، اثر ضد دردی اسانس‌های رزماری و نعناع فلفلی را تقویت می‌کند.

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

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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.52547/sjku.23.4.100]

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 می تواند درد ناشی هایپرآلژزی 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 بی‌حس کنندگی و ضد درد آن به اثبات رسیده است(6و 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(9و 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 نانوامولسیون‌ها است(10) که به‌دلیل پایداری بالاتر از سایر نانوذرات لیپیدی، بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند(11). نانوامولسیون-ها، امولسیون‌هایی هستند که اندازه ذرات آنها از 20 تا 200 نانومتر متغیر بوده و معمولا زیر 100 نانومتر می‌باشد. انکپسولاسیون اسانس‌ها در نانوامولسیون، 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 کِرِم و اسپری، افزایش کارایی دارو و روش‌های تهیه ساده آن، از جمله ویژگی‌های مهم نانوامولسیون‌ها به شمار می‌آید(14و 13). بنابراین به نظر می رسد تولید نانوامولسیون حاوی اسانس‌ها، بتواند اثرضد دردی اسانس‌ها را افزایش دهد. یکی از بهترین مدل-های 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 نانوامولسیونه کردن بتواند اثربخشی اسانس‌های رزماری و نعناع فلفلی را افزایش دهد، هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد دردی ژل نانوامولسیونی 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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.52547/sjku.23.4.100]

حیوان‌خانه با دمای C° 2±22 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 به‌صورت تصادفی به گروه‌های زیر تقسیم شدند: گروه شم (تزریق سالین در مفصل زانو)، گروه استئوآرتریت، و گروه‌های استئوآرتریت دریافت کننده ژل نانوامولسیون (ژل نانو)، ژل حاوی اسانس‌های رزماری و نعناع فلفلی (ژل‌اسانس) و ژل دیکلوفناک. داروها روزانه به میزان 1 میلی‌لیتر به صورت موضعی به مدت 14 روز روی زانوی حیوانات مالیده شده و گروه استئوآرتریت حامل دارو را دریافت می‌نمود.

ایجاد مدل استئوآرتریت:

برای ایجاد استئوآرتریت از تزریق مونوسدیم یدواستات (MIA) استفاده گردید(19). بدین‌ترتیب که ابتدا حیوان با تزریق داخل صفاقی کتامین- زایلازین (به‌ترتیب 100 و 10 میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شده و سپس با استفاده از سرسوزن شماره 27 مقدار 2 میلی‌گرم مونوسدیم یدواستات 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 باریج اسانس کاشان خریداری شدند. جهت ساخت نانوامولسیون از روش امولسیون‌سازی خودبه‌خودی (Spotaneous emulsification) استفاده شد. در مطالعه قبلی انجام گرفته توسط محققین مرکز تحقیقات ما به‌منظور 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 1:1:3 به ترتیب برای کرودرت، توئین 20 و توئین 80 می باشد. همچنین کمک حلال‌های پروپیلین گلایکول و پلی اتیلن گلایکول 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 هرکدام به‌صورت جداگانه تهیه شدند. در مرحله بعد فاز آبی به آرامی به فاز روغنی که در حال همگن شدن بود، اضافه شد. فرآیند همگن‌سازی به‌مدت 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؛ بدین‌صورت‌که کربومر در میزان مشخصی آب مقطر هیدراته شده سپس pH آن با تری-اتانول‌آمین روی 0/2± 6/8 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 حیوانات20 دقیقه قبل از انجام تست، روی یک شبکه سیمی در داخل یک محفظه پلاکسی گلاس قرار داده شدند. جهت سنجش آلودینیای مکانیکی از تارهایvon 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 به‌ترتیب 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. درصورتی‌که حیوان به تار شماره 60 نیز

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.52547/sjku.23.4.100]

پاسخ نمی‌داد، عدد 60 به عنوان آستانه پاسخ در نظرگرفته 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. درصورتی‌که 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 به‌صورت 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 جداشده پس از شستشو در نرمال سالین برای انجام بررسی‌های پاتولوژیک درون فرمالین 10 درصد قرارگرفت. 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 رنگ‌آمیزی گردید. لام‌های تهیه شده توسط پاتولوژیست و با میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

آنالیز آماری داده‌ها:

داده‌ها به‌صورت میانگین ± 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 دوبه‌دوی گروه‌ها از پس‌آزمون 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 به‌طور 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 گروه‌های دریافت کننده ژل نانو، ژل اسانس و دیکلوفناک در روزهای 4، 7 و 14 پس از تزریق معنی دار بوده است ($P<0/01$). همچنین، آنالیز داده ها حاکی از آن است که اختلاف بین گروه ژل نانو و ژل دیکلوفناک معنی دار نیست ($P<0/05$) ، این در حالی است که اثر ضددردی ژل نانو به‌طور معنی‌داری بیشتر از ژل اسانس بوده است ($P<0/05$).

آلودینیای حرارتی (تست استون):

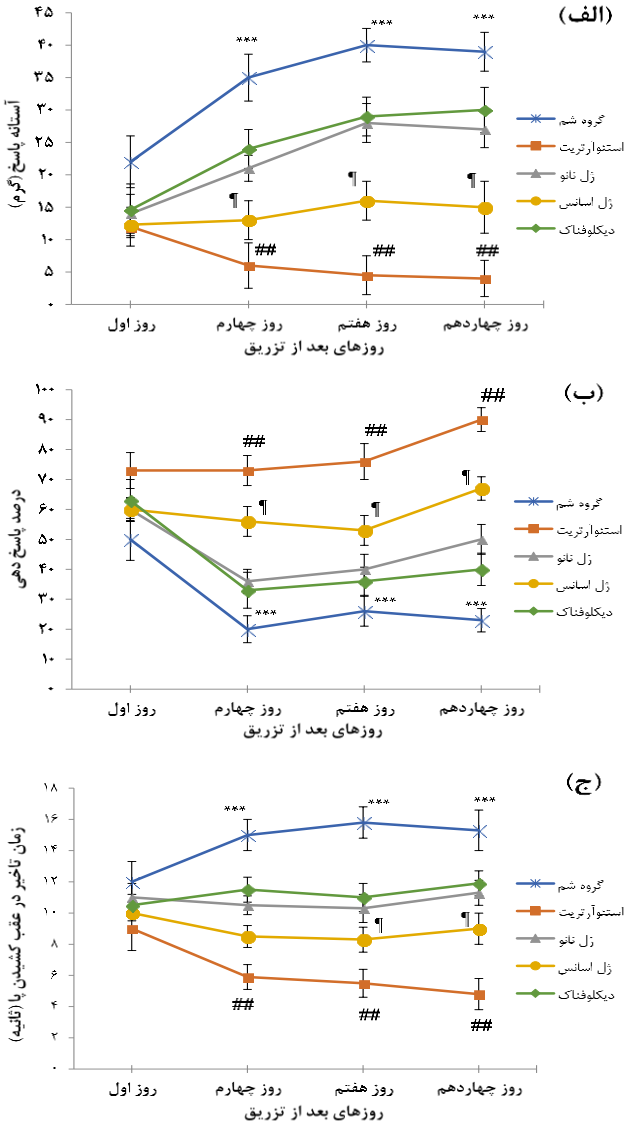
نتایج نشان داد که اختلاف بین گروه استئوآرتریت و گروه شم در تمامی روزها معنی‌دار است ($P<0/001$). دریافت ژل‌های نانو، اسانس و دیکلوفناک در روزهای 4، 7 و 14 بعد از تزریق توانست درصد پاسخ به استون را نسبت به گروه استئوآرتریت کاهش دهد ($P<0/01$). همچنین، آنالیز آماری نشان دهنده این بود که ژل نانو نسبت به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

هایپرآلژزیای حرارتی (تست پلانتار):

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.52547/sjku.23.4.100]

همان‌طور که در نمودار 1-ج نشان داده شده است و اختلاف بین گروه‌های استئوآرتریت و شم در روزهای 4، 7 و 14 بعد از تزریق معنی‌دار بوده است (P<0/001). دریافت ژل نانو، ژل اسانس و ژل دیکلوفناک توانست زمان تاخیر در عقب کشیدن پا را نسبت به گروه استئوآرتریت 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 معنی‌دار نیست (P=0/09).



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

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

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

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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.52547/sjku.23.4.100]

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). آنالیزآماری داده ها نشان داد که میزان لنگیدن موش-های گروه ژل نانو و دیکلوفناک نسبت به گروه ژل اسانس به‌طور معنی‌داری کمتر می‌باشد ($P<0/05$).

جدول 1- میزان لنگیدن موش‌های صحرایی 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؛ و سه: حیوان از پای آسیب دیده استفاده نمی‌کند.

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

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

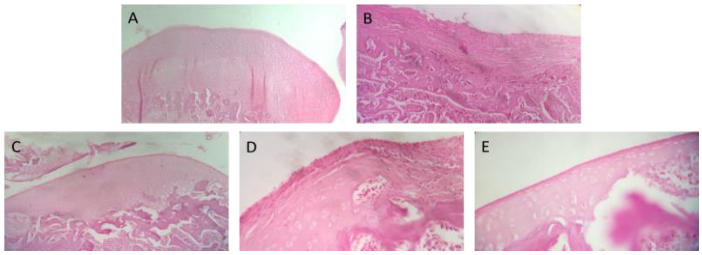
¶ اختلاف معنی دار گروه ژل نانو نسبت به گروه ژل اسانس ($P<0/05$)

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 فیبریلاسیون و جداشدن قطعات غضروف دیده شد. همچنین احتقان عروقی، ادم و ارتشاح سلول‌های التهابی دیده شد. در گروه ژل نانو کاهش ضخامت غضروف و فیبریلاسیون سطحی همراه با احتقان عروقی دیده می شود. در گروه ژل اسانس علاوه بر کاهش نسبتا شدید ضخامت غضروف، تخریب غضروف و تشکیل بافت همبندی به جای آن دیده می شود. همچنین آنژیوژنز نیز مشاهده می‌گردد. در گروه ژل دیکلوفناک در برخی مناطق فیبریلاسیون سطح غضروف و ارتشاح سلول‌های التهابی و در برخی نواحی مفصل غضروف طبیعی دیده می شود. در مجموع می توان گفت نانوامولسیون و دیکلوفناک نسبت به گروه ژل اسانس وضعیت پاتولوژیک بهتری دارند.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.52547/sjku.23.4.100]



تصویر 1- غضروف مفصل زانوی موش‌های صحرایی (رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین). 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 (فیبریلاسیون و التهاب سطح غضروف، ضخامت غضروف کاهش یافته است) D: گروه دریافت کننده ژل اسانس (فیبریلاسیون غضروف و التهاب در بافت،کاهش ضخامت غضروف).E: گروه دریافت‌کننده ژل دیکلوفناک (فیبریلاسیون 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 بافت شناسی نیز نشان دهنده بهبود وضعیت مفصل زانو در موش های 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 ازتبدیل 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، قنادی 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 درموش های صحرایی می‌گردد(2). در مطالعه دیگری بیان شده است که رزمارینیک اسید می‌تواند ادم و التهاب ناشی از کاراجینان را در موش های آزمایشگاهی بهبود بخشد(23). در پژوهش Mannelli و همکاران بیان شده است که ترپنوئیدهای موجود در رزماری می توانند آلودینیای مکانیکی و حرارتی ایجاد شده در مدل آسیب فشاری مزمن عصب سیاتیک را بهبود بخشند(24). اسانس نعناع هم از دیر باز به عنوان یک ضداسپاسم به کار می رفته است. نشان داده شده است که اسانس نعناع درد ناشی از تزریق فرمالین و استیک اسید را در موش های صحرایی کاهش می‌دهد(25). همچنین در مطالعه دیگری بیان شده است که اسانس نعناع می‌تواند پردردی ناشی از حرارت را در تست پلانتار 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 شده اند. 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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.52547/sjku.23.4.100]

پایین اسانس‌ها با محدودیت‌هایی روبروست. در صورتی که در مطالعات مختلف نشان داده شده است که اسانس‌ها پتانسیلی امیدوار کننده 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 این‌حال، 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(9و 8). استفاده از نانومولسیون‌ها برای فرموله کردن اسانس‌ها می‌تواند راهکار مناسبی برای حل این مشکلات باشد.

نانومولسیون‌ها، امولسیون‌هایی با مقیاس نانو هستند که جهت بهبود رسانش ترکیبات دارویی فعال، تولید شده‌اند. در دهه-های اخیر، گرایش به نانومولسیون‌ها به دلیل پایداری بالا و ویژگی‌هایی که در دارورسانی دارند، به‌طور چشمگیر رشد یافته است. انکپسولاسیون اسانس‌ها در نانومولسیون، حفاظت از اسانس و رهاسازی کنترل شده آن را نیز تضمین می‌کند(12). در مطالعه Dhawan و همکاران نشان داده شده است که ژل نانومولسیونی حاوی پیروکسیکام می تواند جذب پوستی این دارو را افزایش دهد(11). در مطالعه دیگری بیان شده است که تبدیل کتوپروفن به نانومولسیون سبب افزایش حلالیت این دارو و در نتیجه افزایش جذب پوستی آن می‌شود(27). بنابراین به نظر می‌رسد تبدیل داروها به نانومولسیون می‌تواند موجب افزایش جذب و اثربخشی آنها گردد.

نتیجه گیری

درکل می‌توان گفت نانومولسیون حاوی اسانس گیاهان رزماری و نعناع فلفلی، درد حیوانات مبتلا به استئوآرتریت را به طور موثرتری نسبت به اسانس‌ها کاهش می‌دهد و می-توان این نانومولسیون را در قالب فرمولاسیون‌های دارویی همچون ژل به کار برد. به‌نظر می‌رسد این فراورده بتواند جایگزین مناسبی برای فراورده‌های موضعی ضد درد از جمله غیر التهاب‌های استروئیدی گردد. البته این امر مستلزم بررسی‌های بیشتر و کارآزمایی‌های بالینی می باشد.

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. بدین‌وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از آن معاونت و آقایان سید مهدی جلالی و حسین عصاری، 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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]
[DOI: 10.52547/sjku.23.4.100]

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.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.52547/sjku.23.4.100]

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.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.52547/sjku.23.4.100]