

بررسی اثر تجویز درازمدت سیلی‌مارین بر هیپرالژزیای حرارتی و شیمیایی در مدل تجربی نوروپاتی دیابتی در موش صحرایی نر

دکتر توراندخت بلوچ‌نژاد مجرد^۱، دکتر مهرداد روغنی^۲، زینب خواست خدایی^۱

(۱) گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، (۲) گروه فیزیولوژی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه شاهد، نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول: تهران، بزرگراه همت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز علوم پایه پزشکی، گروه فیزیولوژی، دکتر توراندخت بلوچ‌نژاد مجرد
e-mail: tmojarad@yahoo.com

چکیده

مقدمه: هیپرآلرژی یکی از مشخصه‌های بارز نوروپاتی دیابتی است. با توجه به اثر هیپوگلیسمیک و آنتی‌اکسیدانی سیلی‌مارین، در مطالعه‌ی حاضر اثر ضد درد سیلی‌مارین، در مدل تجربی نوروپاتی دیابتی در موش‌های صحرایی نر بررسی شد. مواد و روش‌ها: برای انجام آزمون Warm tail immersion، موش‌ها به چهارگروه شاهد، دیابتی، کنترل و دیابتی تیمار شده با سیلی‌مارین تقسیم شدند. در آزمون فرمالین، به چهار گروه فوق دو گروه شاهد و دیابتی دریافت‌کننده‌ی سدیم‌سالیسیلات نیز اضافه شد. برای دیابتی شدن از داروی استریتوزوتوسین به میزان ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی استفاده شد. دو گروه تیمار شده با سیلی‌مارین، در ابتدا (در گروه حیوانات دیابتی، قبل از دیابتی شدن آنها به وسیله‌ی تزریق داخل صفاقی داروی استریتوزوتوسین) ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و سپس به مدت ۸ هفته روزانه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سیلی‌مارین به روش داخل صفاقی دریافت کردند. یافته‌ها: یافته‌ها نشان داد که در پایان هفته‌ی هشتم، نمره‌های درد در موش‌های دیابتی، در دو فاز حاد و مزمن آزمون فرمالین افزایش (۰/۰۰۶-۰/۰۰۳، $P=0/03$)، زمان تأخیر خارج کردن دم از آب گرم نیز کاهش می‌یابد ($P=0/02$). درمان با سیلی‌مارین به مدت هشت هفته، موجب کاهش معنی‌داری در نمره‌های درد در مراحل حاد و مزمن شده (۰/۰۰۰۶-۰/۰۰۶، $P=0/06$)، و زمان تأخیر خارج کردن دم از آب گرم را نیز افزایش می‌دهد ($P=0/03$). از طرف دیگر، کاهش معنی‌داری در نمره‌های درد گروه شاهد تیمار شده با سیلی‌مارین در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نشد. نتیجه‌گیری: به طور خلاصه، به نظر می‌رسد تجویز داخل صفاقی سیلی‌مارین به مدت هشت هفته موجب کاهش معنی‌داری در میزان شدت درد در مدل تجربی نوروپاتی دیابتی می‌شود که این را می‌تواند به عنوان یک درمان کمکی در هیپرآلژی دیابتی مطرح شود.

واژگان کلیدی: سیلی‌مارین، نوروپاتی دیابتی، آزمون فرمالین، آزمون Warm tail immersion، موش صحرایی

دریافت مقاله: ۸۸/۱/۱۷ - اصلاحیه: ۸۸/۵/۱۹ - پذیرش مقاله: ۸۸/۵/۲۲

مقدمه

بیماری دیابت قندی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های غدد درون‌ریز بدن محسوب می‌شود که بر اساس پیش‌بینی به عمل آمده، شیوع آن در جامعه انسانی در آینده بیش از این افزایش خواهد یافت.^۱ کمبود و یا کاهش نسبی میزان انسولین در این بیماری، با عوارض متابولیک حاد مانند کتواسیدوز و

اغمای هیپراسمولار و با یک اختلال متابولیک مزمن و عوارض نامطلوب در درازمدت مانند رتینوپاتی، گرفتاری عروق کلیوی، نوروپاتی، ضایعات پوستی، اختلال‌های سیستم قلبی - عروقی همراه است.^۲ درد ناشی از نوروپاتی اعصاب محیطی یکی از شکایت‌های مهم بالینی افراد مبتلا به دیابت قندی محسوب می‌شود که کیفیت زندگی آنها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بنابراین، تعدیل درد در این افراد از اهمیت

خاصی برخوردار است.^۴ یافته‌های تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که هیپرگلیسمی می‌تواند با اعمال اثر توکسیک خود بر سیستم عصبی محیطی و ایجاد تغییرات خاص شیمیایی، یکی از علل بروز نوروپاتی دردناک باشد.^۵ از طرف دیگر، بر خلاف شواهد موجود، یافته‌های برخی از مطالعه‌ها نشان داده‌اند که هیپرگلیسمی تأثیری در تغییر آستانه درد ندارد.^۶ با توجه به این‌که تا کنون ترکیب دارویی مناسبی (نظیر سالیسیلات‌ها و ترکیبات ضد التهابی غیر استروئیدی) که عاری از عوارض جانبی باشد در مورد دیابت قندی یافت نشده است،^۷ توجه محققان برای یافتن داروهای ضد درد به استفاده از گیاهان دارویی معطوف شده است.^۸ در حال حاضر، سیلی‌مارین که از گیاه ماریتیغال^۱ استخراج می‌شود به دلیل دارا بودن خواص گسترده بر اندام‌های مختلف بدن بسیار مورد توجه قرار گرفته است. سیلی‌مارین یک فلاونولیکان است که از چند ایزومر با عنوان سیلی‌بین، ایزوسیلی‌بین، سیلی‌کریستین، سیلی‌دیانین، دهیدروسیلی‌بین و دهیدروسیلی‌کریستین تشکیل شده است.^۵ در گذشته عصاره‌ی گیاه ماریتیغال برای درمان بیماری‌های گوارشی و صفرای و امروزه برای جلوگیری و درمان مسمومیت‌های کبدی، درمان سیروز کبدی، پیشگیری و درمان سرطان کبد نیز استفاده می‌شود.^۶ تجویز درازمدت سیلی‌مارین به موش‌های دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین علاوه بر اثر هیپوگلیسمیک، سطح تری‌گلیسرید، کلسترول تام و کلسترول LDL را کاهش و میزان کلسترول HDL را افزایش می‌دهد (در دست چاپ). سیلی‌مارین با جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد اکسیژن از قبیل آنیون‌های هیدروکسیل، رادیکال‌های فنوکسی و اسید هیپوکلر در نمونه‌های مختلف از قبیل پلاکت‌ها، فیبروبلاست‌ها، میکروزوم‌های کبدی و میتوکندری‌ها موجب مهار استرس اکسیداتیو می‌شود.^۵ همچنین، سیلی‌مارین با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی و تعدیل میزان گلوکوتایون توانایی حفاظت نوروپاتی‌ها را در برابر استرس اکسیداتیو دارد.^{۷،۸} علاوه بر اثر حفاظتی سیلی‌مارین بر سلول که ناشی از اثر آنتی‌اکسیدانی آن است، تعامل آن با گلیکوپروتئین‌های P، گیرنده‌های استروژنی و گیرنده‌های هسته‌ای نیز گزارش شده است.^۹ همچنین، سیلی‌مارین با پیشگیری از تخلیه‌ی گلوکوتایون و حتی افزایش میزان آن، القای آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و مهار آنزیم ۵- لپو

اکسیژناز مانع پراکسیداسیون لیپیدی شده، از تولید ROS پیشگیری به عمل می‌آورد^{۱۰} و از این طریق قادر به جلوگیری از آسیب کلیوی، کبدی، قلبی، و مغزی است که در همین راستا اثربخشی آن در مدل‌های ایسکمی بافتی مورد تأیید قرار گرفته است.^{۱۱} مطالعه‌ها نشان داده‌اند که سیلی‌بین یا سیلی‌بینین که یکی از مواد تشکیل‌دهنده‌ی کمپلکس سیلی‌مارین است نقش عمده‌ای در بروز خواص بیولوژیک سیلی‌مارین دارد.^۵ با توجه به نقش استرس اکسیداتیو و تغییرات آنزیمی در بروز برخی تغییرات بیوشیمیایی و بافتی نامطلوب ناشی از دیابت به ویژه نوع یک،^{۱۲} در این مطالعه، اثر ضد درد سیلی‌مارین بر شدت میزان درد نوروپاتی دیابتی در موش صحرایی نر بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی و به روش مداخله‌ای در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (۵۴=تعداد) با محدودی وزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم انجام شد. در حیوانخانه، حیوانات در دمای ۲۲-۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در گروه‌های ۳-۴ تایی در هر قفس قرار داده شدند و آزادانه به آب و غذای فشرده‌ی مخصوص موش (شرکت خوراک دام پارس، کرج) به مدت ۸ هفته دسترسی داشتند. در این بررسی از آن دسته موش‌های صحرایی استفاده شد که در شرایط طبیعی بدون برقراری حالت روزه‌داری (Non-fasting) میزان گلوکز سرم کمتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر داشتند.^{۱۳} در این خصوص از شبکه‌ی رترواوربیتال و لوله‌ی موئینه برای خونگیری استفاده شد. اندازه‌گیری میزان گلوکز سرم توسط روش آنزیمی گلوکز اکسیداز تهیه شده از شرکت زیست‌شیمی تهران و با استفاده از اسپکتروفتومتر (Spectronic, USA)، قبل از شروع آزمایش و در پایان هفته‌ی هشتم، و قبل از انجام آزمون درد انجام شد. موش‌ها به طور کاملاً تصادفی به شش گروه یکسان شامل شاهد، شاهد دریافت‌کننده‌ی سیلی‌مارین، شاهد دریافت‌کننده‌ی سدیم سالیسیلات، دیابتی، دیابتی دریافت‌کننده‌ی سدیم سالیسیلات (شاهد مثبت) و دیابتی دریافت‌کننده‌ی سیلی‌مارین تقسیم شدند. دو گروه شاهد و دیابتی دریافت‌کننده‌ی سدیم سالیسیلات پس از گذشت دو ماه، سدیم سالیسیلات را به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (سیگما، آلمان) به طور داخل صفاقی یک‌ساعت قبل از

off، ۳۰ ثانیه بود.^{۱۵} تمام داده‌ها در بررسی حاضر به صورت میانگین±خطای استاندارد بیان شدند. برای آنالیز آماری در مورد نتایج وزن و گلوکز از آزمون آنووا برای مقادیر تکرارشونده، و در مورد درد از آزمون آنووی یک‌طرفه و در مورد اخیر در صورت معنی‌دار شدن از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. به علاوه، $(P<۰/۰۵)$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، ۲ موش در گروه دیابتی و ۲ موش در گروه دیابتی تحت درمان با سیلی‌مارین درمان می‌شدند، تلف شدند. مقایسه‌ی وزن موش‌ها و گلوکز سرم آنها در چهار گروه مورد بررسی در پایان هفته‌ی هشتم نشان داد که وزن حیوانات در گروه دیابتی در مقایسه با گروه شاهد $۱۵/۶\%$ کاهش یافته است $(P=۰/۰۰۳)$. در مقایسه با حیوانات دیابتی، تیمار حیوانات دیابتی با سیلی‌مارین موجب افزایش ۶% وزن در آنها می‌شد ولی این افزایش معنی‌دار نبود. از نظر میزان گلوکز سرم نیز مشخص شد که در پایان هفته‌ی هشتم، میزان گلوکز سرم در حیوانات دیابتی حدود $۱۹۷/۳\%$ بیش از حیوانات گروه شاهد بود $(P<۰/۰۰۰۱)$. به علاوه، تیمار حیوانات دیابتی با سیلی‌مارین موجب کاهش $۴۳/۶\%$ گلوکز سرم در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده گردید $(P<۰/۰۰۰۱)$ (جدول ۱).

i- Streptozotocin

بررسی شدت درد دریافت نمودند.^{۱۳} برای دیابتی نمودن حیوانات از داروی استرپتوزوتوسین (STZ^۱ Upjohn, France) به صورت تک دوز و داخل صفاقی به میزان ۶۰ حل شده در محلول سرم فیزیولوژیک سرد استفاده شد. گروه شاهد و گروه دیابتی (قبل از دریافت استرپتوزوتوسین) دریافت‌کننده‌ی سیلی‌مارین، ابتدا در شروع آزمایش، ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای وزن بدن و سپس به مدت هشت هفته روزانه ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای وزن بدن سیلی‌مارین را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. حجم محلول تزریق شده به حیوانات در هر گروه ۰/۵ میلی‌لیتر بود. پس از گذشت دو ماه، آزمون Warm tail immersion و سپس آزمون فرمالین با رعایت فاصله‌ی زمانی ۴ روز از یکدیگر در مورد هر یک از موش‌ها بین ساعت ۹ تا ۱۳ انجام شد. در بررسی حاضر، وزن موش‌ها و گلوکز سرم آنها در شروع آزمایش و در پایان هفته‌ی هشتم اندازه‌گیری شد.

برای انجام آزمون فرمالین از روش متداول Dubuisson and Dennis استفاده شد.^{۱۴} به علاوه، در مورد هر موش آزمون فرمالین فقط یک بار انجام شد.

برای به دست آوردن زمان تأخیر پاسخ به محرک درد آور حرارتی، تمام طول دم به سرعت در آب ۴۹ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. این زمان از لحظه‌ی قرار گرفتن دم در آب تا زمانی‌که حیوان دم خود را از آب خارج کرد، محاسبه شد. برای هر حیوان متوسط سه زمان تأخیر با فواصل یک دقیقه‌ای در نظر گرفته شد. در این آزمایش Cut

جدول ۱- اثر تجویز داخل صفاقی سیلی‌مارین بر وزن و میزان گلوکز سرم موش‌های صحرایی نر

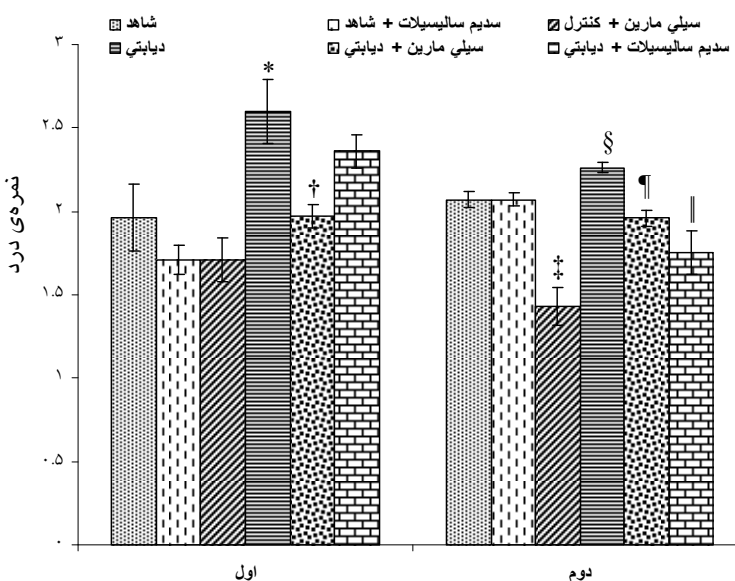
گروه‌ها	وزن (گرم)		گلوکز (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	
	ابتدای آزمایش	انتهای آزمایش	ابتدای آزمایش	انتهای آزمایش
شاهد	۲۷۸/۳±۳/۳*	۲۸۲/۳±۳/۳	۱۲۲/۳±۵/۵	۱۱۹/۴±۶/۶
شاهد+ سیلی‌مارین	۲۷۷/۲±۷/۸	۲۷۵±۳/۶	۱۳۴/۱۱±۲۲/۲	۱۷۸/۸۷±۳۴/۴
دیابتی	۲۶۹±۲/۹	۲۳۸/۳۳±۶/۴†	۱۲۹/۶±۷/۵	۳۵۵±۱۲/۱‡
دیابتی + سیلی‌مارین	۲۵۶/۳±۹/۶	۲۵۳/۵±۶/۹۸	۱۴۱/۳±۶/۹	۲۰۰/۰۷±۱۶/۹§

* اعداد به صورت میانگین ± خطای استاندارد بیان شده‌اند. † $P=۰/۰۰۳$ (مقایسه‌ی وزن گروه دیابتی با گروه شاهد)، ‡ $P<۰/۰۰۰۱$ (مقایسه‌ی میزان گلوکز سرم گروه دیابتی با گروه شاهد)، § $P<۰/۰۰۰۱$ (مقایسه‌ی میزان گلوکز سرم گروه دیابتی + سیلی‌مارین با گروه دیابتی)

آزمون فرمالین بیش از گروه شاهد بود ($P=0/006$) -
 دو فاز حاد و مزمن در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد.
 تزریق کف پایی فرمالین یک پاسخ بارز دو فازی را در
 تمام گروه‌ها ایجاد نمود. هیپرالژزی القا شده بر اثر
 فرمالین در موش‌های دیابتی درمان نشده در هر دو فاز

نمودار ۱، یافته‌های حاصل از آزمون فرمالین را در
 دو فاز حاد و مزمن در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد.
 تزریق کف پایی فرمالین یک پاسخ بارز دو فازی را در
 تمام گروه‌ها ایجاد نمود. هیپرالژزی القا شده بر اثر
 فرمالین در موش‌های دیابتی درمان نشده در هر دو فاز

نمودار ۱- اثر پیش‌درمان و تجویز هشت هفته‌ای و
 داخل صفاقی سیلی‌مارین بر میزان شدت درد در دو فاز
 اول (حاد) و دوم (مزمن) آزمون فرمالین در موش‌های
 صحرایی سالم و دیابتی شده توسط
 استرپتوزوتوسین، $P=0/03$ * (گروه دیابتی در
 مقایسه‌ی با گروه شاهد در فاز اول آزمون فرمالین)،
 $P=0/06$ † (گروه دیابتی + سیلی‌مارین در مقایسه‌ی با
 گروه دیابتی در فاز اول آزمون فرمالین)،
 $P=0/003$ ‡ (گروه شاهد + سدیم‌سالیسیلات در مقایسه‌ی با گروه
 شاهد در فاز دوم آزمون فرمالین)،
 $P=0/006$ § (گروه دیابتی در مقایسه با گروه شاهد در فاز دوم آزمون
 فرمالین)،
 $P=0/006$ ¶ (گروه دیابتی + سیلی‌مارین در
 مقایسه با گروه دیابتی در فاز دوم آزمون فرمالین)،
 $P<0/01$ || (گروه دیابتی + سدیم‌سالیسیلات در
 مقایسه‌ی با گروه دیابتی در فاز دوم آزمون فرمالین)



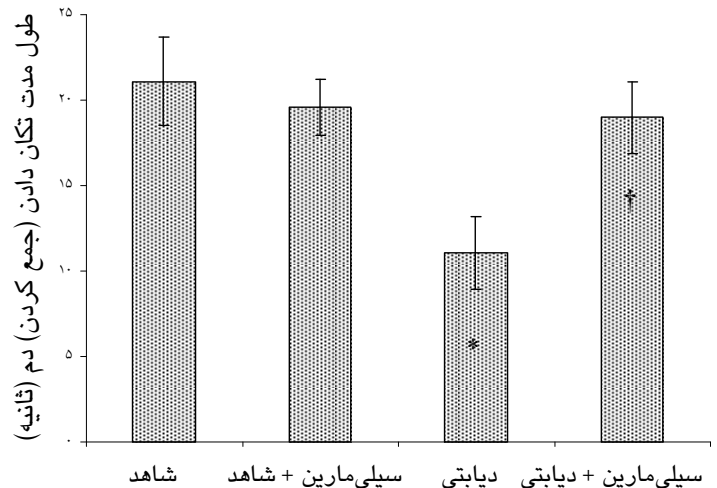
یافته‌های به دست آمده از این آزمون نشان داد که مدت
 زمانی که طول می‌کشد تا حیوان دم خود را از آب ۴۹
 درجه‌ی سانتی‌گراد خارج کند (Tail Flick Latency)، در
 حیوانات دیابتی در مقایسه با حیوانات سالم کاهش قابل
 ملاحظه‌ای می‌یابد ($P=0/02$). از طرف دیگر، این زمان
 تاخیر در حیوانات سالم تیمار نشده نسبت به حیوانات سالمی
 که با سیلی‌مارین تیمار شده بودند، تفاوت معنی‌داری نشان
 نداد، به علاوه، این زمان تأخیر در حیوانات دیابتی درمان
 شده با سیلی‌مارین، نسبت به حیوانات دیابتی بدون درمان به
 طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت ($P=0/03$) (نمودار ۲).

مقایسه با گروه‌های شاهد و دیابتی شد ($P=0/01-0/003$).
 همچنین، شدت درد در هر دو فاز آزمون فرمالین در دو
 گروه شاهد تیمار نشده و تیمار شده با سیلی‌مارین تفاوت
 معنی‌داری نشان نداد. از طرف دیگر، در حیوانات دیابتی
 درمان شده با سیلی‌مارین در مقایسه با حیوانات دیابتی
 بدون درمان، شدت درد در فاز اول و دوم آزمون فرمالین،
 کاهش معنی‌داری یافت ($P=0/06$ و $P<0/001$). مقایسه‌ی اثر
 ضد دردی سدیم‌سالیسیلات و سیلی‌مارین در فاز دوم
 آزمون فرمالین نشان داد با آن‌که تفاوت معنی‌داری در اثر
 کاهش‌دهندگی درد میان این دو وجود ندارد، اثر ضد درد
 سیلی‌مارین ۹/۲٪ کمتر از سدیم‌سالیسیلات است.

گلیسرید، LDL-C و VLDL-C سرم افزایش و سطح HDL-C کاهش می‌یابد.^{۱۹} هیپرگلیسمی از طریق گلیکاسیون غیرآنزیمی پروتئین‌ها^{۲۰} و یا از طریق احیای گلوکز به سوربیتول به وسیله آنزیم آلدوز ردوکتاز باعث القای استرس اکسیداتیو می‌شود.^{۲۱} همچنین، برخی از گزارش‌ها حاکی از آن است که در دیابت نوع I و II میان هیپرگلیسمی و مارک‌های پراکسیداسیون لیپیدی و سوپراکسید سرم ارتباط وجود دارد.^{۲۲،۲۳} در بیماری دیابت نوع I، استرس اکسیداتیو چند سال بعد از تشخیص دیابت و قبل از ایجاد عوارض بوجود می‌آید و با پیشرفت بیماری، میزان آنتی‌اکسیدان‌ها کاهش و تولید محصولات پراکسیداسیون لیپیدی افزایش می‌یابد که این امر بستگی به میزان کنترل قند خون دارد.^{۲۴} سیلی‌مارین با تأثیر بر کینتیک گلوکز ۶-فسفاتاز و مهار گلوکونوژنز موجب کاهش گلوکز خون می‌شود.^{۲۵} در مطالعه‌ی حاضر نیز اثر هیپوگلیسمیک تجویز درازمدت سیلی‌مارین دیده شد. به نظر می‌رسد به دلیل وجود ارتباط مستقیم میان میزان گلوکز خون گلیکاسیون پروتئینی^{۲۶}، تولید ROS و تخلیه‌ی گلوتاتیون، یکی از اثرهای کاهش گلوکز خون به وسیله‌ی سیلی‌مارین، کاهش استرس اکسیداتیو باشد. از طرف دیگر، از آن‌جا که فرایندهای التهابی نقش مهمی در پاتوژنز بیماری دیابت دارد.^{۲۷} در حال حاضر نقش عوامل ضد التهاب از جمله مهارکننده‌های COX-2 در تخفیف عوارض ناشی از بیماری دیابت بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

یکی از عوارض افزایش بیان آنزیم COX-2 در بافت‌های عروقی و اعصاب محیطی،^{۲۸} افزایش تولید PGE2، افزایش فعالیت NF-κB، افزایش فعالیت لیپواکسیژناز، اینترلوکین ۱ و TNF و COX-2 ایجاد التهاب است. از آن‌جا که سیلی‌مارین قادر به مهار آنزیم ۵-لیپو اکسیژناز و در نتیجه تولید لوکوترین است، به نظر می‌رسد که این ماده بتواند از این طریق مانع بروز التهاب شود.^{۲۹}

همچنین، بر اساس یافته‌های موجود موادی همچون ماده P و برادی کینین (BK) در ایجاد حس درد در فاز اول آزمون فرمالین و تغییر آستانه‌ی Thermonociceptive در آزمون Tail Flick نقش دارند. با آن‌که آگونیست‌های گیرنده‌ی B1 تأثیری بر آستانه‌ی درد در حیوانات سالم ندارند، ۲۴ ساعت بعد از تزریق STZ موجب پردردی می‌شوند که این پاسخ به طور کامل توسط آنتاگونیست‌های گیرنده‌ی B1 مهار می‌شود. از آن‌جا که آنتاگونیست‌های ماده‌ی P، NOS



نمودار ۲- اثر پیش‌درمان و تجویز هشت هفته‌ای و داخل صفاقی سیلی‌مارین بر مدت زمان تأخیر در آزمون Warm Tail Flick در موش‌های صحرایی سالم و دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین، * P=۰/۰۲ (گروه دیابتی در مقایسه با گروه شاهد)، † P=۰/۰۳ (گروه دیابتی + سیلی‌مارین در مقایسه با گروه دیابتی)

بحث

یافته‌های بررسی حاضر اثر هیپرالژزی را در موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین با استفاده از آزمون فرمالین و Warm Tail Immersion نشان داد. در این ارتباط، یافته‌های پژوهش‌های قبلی در موش‌های صحرایی دیابتی نیز نشان‌دهنده یک رفتار تشدید شده‌ی مربوط به درد در آزمون فرمالین به دنبال تجویز محرک‌های شیمیایی به داخل پنجه‌ی پا پس از گذشت ۳-۴ هفته و کاهش زمان تأخیر Warm Tail flick است.^{۱۶} همچنین، وجود هیپرالژزی مکانیکی به عنوان اولین شاخص نوروپاتی دیابتی به اثبات رسیده است.^{۱۷} از طرف دیگر، یافته‌های تحقیقات اخیر نشان داده‌اند با توجه به این‌که نشانه‌های هیپرالژزی و آلودینی^۱ یک تا دو ماه پس از دیابتی شدن حیوان توسط استرپتوزوتوسین بخوبی مشاهده می‌شود،^{۱۸} در گزارش‌ها از این حیوانات می‌توان به عنوان مدل درد مزمن استفاده نمود. همان‌طور که مطالعه‌های قبلی نشان داده‌اند در موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط آلوکسان یا استرپتوزوتوسین علاوه بر افزایش سطح گلوکز خون، سطح کلسترول، تری

با توجه به نقش هیستامین در ایجاد درد در فاز دوم آزمون فرمالین، این احتمال وجود دارد که سیلی‌مارین با مهار آزادسازی هیستامین به وسیله نوتروفیل‌ها مانع ایجاد التهاب و احساس درد در حیوانات دیابتی شود.^{۲۲} همچنین، سیلی‌مارین با مهار آنزیم فسفودی‌استراز وابسته به cAMP و افزایش میزان cAMP موجب پایداری غشای لیزوزوم‌ها شده و از این طریق نیز مانع بروز التهاب می‌شود.^۵ در مجموع، یافته‌های این پژوهش نشان داد که پیش درمان و تجویز دراز مدت سیلی‌مارین در موش‌های صحرایی دیابتی شده می‌تواند موجب تخفیف معنی‌دار هیپرآلژزی حرارتی و شیمیایی ناشی از دیابت قندی در آزمون‌های فرمالین و Warm Tail Immersion شود.

سپاسگزاری: بودجه‌ی تحقیقاتی پژوهش حاضر از محل اعتبار پژوهشی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران در سال ۱۳۸۷ تأمین شده است. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

inhibitor و مهارکننده‌ی COX-2 نیز موجب مهار پردردی می‌شوند، به نظر می‌رسد که بین فعالیت گیرنده‌ی B1 مرکزی و آزادسازی ماده P، تولید NO و پروستاگلندین‌ها ارتباطی داشته باشد.^{۲۰}

با توجه به برخی از اثرهای فارماکولوژیک سیلی‌مارین، احتمال دارد یکی از سازوکارهای سیلی‌مارین در کاهش میزان شدت درد در حیوانات دیابتی کاهش مستقیم و غیر مستقیم بیان گیرنده‌ی B1 باشد. همان‌گونه که یافته‌های مطالعه‌ی حاضر نشان داد، در حیوانات دیابتی تجویز سیلی‌مارین میزان شدت درد را در فاز دوم آزمون فرمالین نیز کاهش داد. بر اساس یافته‌های موجود، فرآیندهای التهابی و مهاجرت نوتروفیل‌ها^{۲۱} نقش مهمی در ایجاد فاز دوم آزمون فرمالین دارند. در این فاز، موادی مانند هیستامین، پروستاگلندین، سروتونین و برادی‌کینین آزاد می‌شوند.^{۲۱}

References

1. Tripathi BK, Srivastava AK. Diabetes mellitus: complications and therapeutics. *Med Sci Monit* 2006; 12: RA130-47.
2. Wandell PE. Quality of life of patients with diabetes mellitus. An overview of research in primary health care in the Nordic countries. *Scand J Prim Health Care* 2005; 23: 68-74.
3. Suji G, Sivakami S. Approaches to the treatment of diabetes mellitus: an overview. *Cell Mol Biol* 2003; 49: 635-9.
4. Shapiro K, Gong WC. Natural products used for diabetes. *J Am Pharm Assoc* 2002; 42: 217-26.
5. WHO monographs on selected medicinal plants. World Health Organisation, Geneva 2002; 2: 306-317.
6. Van Erp NP, Baker SD, Zhao M, Rudek MA, Guchelaar HJ, Nortier JW, et al. Effect of milk thistle (*Silybum marianum*) on the pharmacokinetics of irinotecan. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7800-6.
7. Courteix C, Eschalier A, Lavarenne J. Streptozotocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain* 1993; 53: 81-8.
8. Zhang D L, Zhang Y T, Yin J J, Zhao B L. Oral administration of crataegus Flavonoids protects against ischemia/reperfusion brain damage in gerbils. *J Neurochem* 2004; 90: 211-9.
9. Kittur S, Wilasrusmee S, Pedersen WA, Mattson MP, Straube-West K, Wilasrusmee C, et al. Neurotrophic and neuroprotective effects of milk thistle (*Silybum marianum*) on neurons in culture. *J Mol Neurosci* 2002; 18(3): 265-9.
10. Moreland N, Grang L, Montoya R. Impact of in utero exposure to EtOH on corpus callosum development and paw preference in rats: protective effects of silymarin. *BMC complement Altern Med* 2002; 2:10.
11. Skottova N, Kazdova L, Oliyarnyk O, Vecera R, Sobolova L, Ulrichova J. Phenolics-rich extracts from *Silybum marianum* and *Prunella vulgaris* reduce a high- sucrose diet induced oxidative stress in hereditary hypertriglyceridemic rats. *Pharmacol Res* 2004; 50:123-30.
12. Nitta A, Murai R, Suzuki N, Ito H, Nomoto H, Katoh G. Diabetic neuropathies in brain are induced by deficiency of BDNF. *Neurotoxicol Teratol* 2002; 24: 695-701.
13. Hemalatha S, Wahi AK, Singh PN, Chansouria JP. Hypoglycemic activity of *Withania coagulans* Dunal in streptozotocin induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2004; 93:261-4.
14. 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: 161-174.
15. Gelgor L, Phillips S, Mitchell D. Hyperalgesia following ischaemia of the rat's tail. *Pain* 1986; 24: 251-7.
16. Cesena RM, Caleutt NA. Gabapentin prevents hyperalgesia during the formalin test in diabetic rats. *Neurosci Lett* 1999; 262: 101-4.
17. Calcutt NA. Potential mechanisms of neuropathic pain in diabetes. *Int Rev Neurobiol* 2002; 50: 205-28.
18. Piercy V, Banner SE, Bhattacharyya A, Parsons AA, Sanger GJ, Smith SA, et al. 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: 163-9.
19. Yanardag R, Bolkent S, Ozsoy-Sacan O, Karabulut-Bulan O. The effect of chard (*Beta vulgaris* L. var. cicla) extract on the kidney tissue, serum urea, and creatinine levels of diabetic rats. *Phytother Res* 2002; 16: 758-61.
20. Lal S, Szwergold BS, Taylor AH, Randall WC, Kappler F, Wells-Knecht K, et al. Metabolism of fructose-3-phosphate

- in the diabetic rat lens. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1995; 318: 191-9.
21. Nagamatsu M, Nickander KK, Schmelzer JD, Raya A, Wittrock DA, Tritschler H, et al. Lipoic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress and improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1995; 18: 1160-7.
22. Altomare E, Vendemiale G, Chicco D, Procacci V, Cirelli F. Increased lipid peroxidation in type 2 poorly controlled diabetic patients. *Diabetes Metab* 1992; 18: 264-71.
23. Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Dello Russo P, Lefebvre P J. Metabolic control may influence the increased superoxide generation in diabetic serum. *Diabetic Med* 1991; 8: 540-2.
24. Tsai EC, Hirsch IB, Brunzell JD, Chait A. Reduced plasma peroxy radical trapping capacity and increased susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM. *Diabetes* 1994; 43:1010-14.
25. Guigas B, Naboulsi R, Villanueva GR, Taleux N, Lopez-Novoa JE, Leverage XM, et al. The flavonoid silibinin decreases glucose-6-phosphate hydrolysis in perfused rat hepatocytes by an inhibitory effect on glucose-6-phosphatase. *Cell Physiol Biochem* 2007; 20: 925-34.
26. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 2001; 44: 129-46.
27. Celik S, Erdogan S. Caffeic acid phenethyl ester protects brain against oxidative stress and inflammation induced by diabetes in rats. *Mol Cell Biochem* 2008; 312: 39-46.
28. Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Dello Russo P, Lefebvre P J. Metabolic control may influence the increased superoxide generation in diabetic serum. *Diabetic Med* 1991; 8: 540-2.
29. Rui YC, Zhang DZ, Sun DX, Zeng GQ. Effects of silybin on production of oxygen free radical, lipoperoxide and leukotrienes in brain following ischemia and reperfusion. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1990; 11: 418-21.
30. Couture R, Lindsey CJ. Brain kallikrein-kinin system: from receptors to neuronal pathways and physiological functions. *Handbook of Chemical Neuroanatomy* 2000; part I, vol 16, 241-300.
31. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: Characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989; 38: 347-52.
32. Miadonna A, Tedeschi A, Leggieri E, Lorini M, Foldi M, Zanussi C. Effects of silybin on histamine release from human basophil leucocytes. *Br J Clin Pharmacol* 1987; 24:747-52.

Original Article

Evaluation of the Effect of Chronic Administration of Silymarin on Thermal and Chemical Hyperalgesia in an Experimental Model of Diabetic Neuropathy in Male Rats

Baluchnejadmojarad T¹, Roghani M², Khaste khodaie Z³

¹Department of Physiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, ²Department of Physiology and Medicinal Plant Research Center, School of Medicine, Shahed University, ³Department of Physiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

e-mail: tmojarad@yahoo.com

Received: 06/04/2009, Accepted: 13/07/2009

Abstract

Introduction: Hyperalgesia is recognized as one of the marked signs of diabetic neuropathy. Considering the hypoglycemic and antioxidant effects of silymarin, this study was designed to investigate the analgesic effect of silymarin in an experimental model of diabetic neuropathy in male rats. **Materials and Methods:** In warm tail immersion test, rats were divided into control, silymarin-treated control, diabetic, silymarin-treated diabetic groups. For the formalin test, sodium salicylate (SS)-treated control and diabetic groups were added to the previous four groups. For induction of diabetes, streptozotocin (60 mg/Kg, i.p., STZ) was administered as a single dose. The treatment groups (in diabetic group, before induction of diabetes), first received a single dose (200mg/kg; i.p) and then a daily dose (100mg/kg; i.p) of silymarin for eight weeks. **Results:** Results showed that diabetic rats exhibited a higher score of pain during both phases of the formalin test ($P=0.03-0.006$) and significant decrease in tail flick latency ($P<0.02$) after eight weeks of diabetic induction in the warm tail immersion test. Treatment with silymarin for eight weeks caused significant decrease in pain scores at both phases of the formalin test ($P=0.06-0.0006$) and increase in tail flick latency ($P=0.03$). On the other hand, silymarin caused no significant decrease in pain scores of control rats. **Conclusion:** It seems that eight weeks i.p. administration of silymarin could attenuate nociception in an experimental model of diabetic neuropathy, which may be considered as a treatment for painful diabetic neuropathy.

Keywords: Silymarin, Diabetic neuropathy, Formalin test, Warm tail immersion, Rat