

## تأثیر تجویز پیش درمانی با عصاره‌های گیاهان بومادران زرد (*Achillea santolina* L.) و سنبله (Stachys athorecalyx) بر روند التهاب حاد ناشی از CFA در موش‌های صحرایی نر

اللهه تکیه<sup>۱</sup>، شمسعلی رضازاده<sup>۲</sup>، هما مناهجی<sup>۱</sup>، اختر اکبری<sup>۱</sup>، جلال زرین قلم<sup>۱\*</sup>

۱- استادیار، گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۲- استادیار، گروه فارماکوگنوزی و داروسازی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، تهران

\* آدرس مکاتبه: استادیار، گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، تلفن: ۰۹۱۲۵۱۶۸۳۱۳، نمبر: ۰۲۱ ۲۲۴۳۹۹۷۱

پست الکترونیک: jzaringhalam@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۸۹/۲/۱۰

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۲۱

### چکیده

مقدمه: علایم التهابی، ادم و هایپرآلرژی، پاسخی فیزیولوژیک به عوامل محرك است که می‌تواند به وسیله‌ی میانجی‌های متفاوتی مانند سایتوکاین‌ها القاء شود. گیاهان دارویی یکی از عوامل مهم مورد استفاده در بهبود علایم التهابی می‌باشند.

هدف: با توجه به این مطالب و نقش IL-6 در ایجاد هایپرآلرژی و ادم، هدف از این مطالعه بررسی اثرات پیش درمانی با عصاره‌های دو گیاه بومادران زرد<sup>۱</sup> و سنبله<sup>۲</sup> بر روی التهاب حاد ایجاد شده به وسیله‌ی CFA است.

روش بررسی: عصاره‌های متابولیک و چربی‌زدایی شده‌ی هر دو گیاه از بخش‌های هوایی آنها تهیه و به صورت پیش درمانی مورد استفاده قرار گرفتند. دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره‌های هر گیاه برای تزریق استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان داد که پیش درمانی با عصاره‌های متابولیک و چربی‌زدایی شده‌ی گیاه سنبله باعث کاهش وابسته به دوز هایپرآلرژی و ادم ایجاد شده به وسیله‌ی CFA می‌شود، ولی فقط عصاره متابولیک گیاه بومادران زرد باعث کاهش علایم التهاب شد.

نتیجه‌گیری: این نتایج می‌تواند نشان دهد که پیش درمانی با عصاره‌های گیاهان بومادران زرد و سنبله می‌تواند در بهبود علایم التهاب موثر باشد، اما مواد موثر آنها متفاوت بوده و شناسایی دقیق آنها نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

گل واژگان: هایپرآلرژی، ادم، CFA، *Stachys athorecalyx*، *Achillea santolina*، عصاره،

<sup>۱</sup> *Achillea santolina* L.

<sup>۲</sup> *Stachys athorecalyx*



## مقدمه

می‌گرفته است [۸]. مطالعات فارماکولوژیکی اولیه نشان داده‌اند که عصاره یا ترکیبات متعلق به گونه *Stachys* دارای اثرات ضدبacterیایی [۹، ۱۰]، آنتی‌اسیداتیو [۹، ۱۱]، آنتی‌نفرتیک، ضداصطرباب، ضداسترس و ضددردی است [۱۰، ۱۱]. تحقیقات فیتوشیمیایی چندین گروه از ترکیبات موجود در این گیاه را شناسایی کرده‌اند که شامل: فنیل اتانوئیدها [۱۲]، گلیکوزیدها، ترپن‌وئیدها، استروئیدها، دی‌ترپن‌ها و فلاونوئیدها می‌باشد [۱۳، ۱۴، ۱۵].

گونه *Achiellea (Asteraceae)* شامل بیش از ۱۰۰ رده می‌باشد که به طور عمده در نیمکره شمالی گستردۀ شده است. این گیاه با گلهای زردرنگ کوچک است که در ایران به طور سنتی با عنوان بومادران زرد شناخته می‌شود و برای درمان التهاب و بیماری‌های باکتریایی مورد استفاده قرار می‌گرفته است. برخی مطالعات اثرات ضدالتهابی بومادران را بر روی فاز حاد التهاب (در ۲۴ ساعت نخست پس از تجویز کاراثیلن) نشان داده‌اند [۱۶، ۱۷]. این گیاه شامل ترکیباتی از جمله گلیکوفلاونوئیدها است که در قسمت‌های هوایی گیاه شامل گلهای، برگ‌ها و ساقه آن همراه دیگر مواد لیبوفیلیک، تجمع پیدا کرده است [۱۸، ۱۹]. در طب سنتی ایران دم کرده این گیاه برای درمان بیماری‌هایی مثل: آرتربیت، گاستریت، آسم و انواع بیماری‌های کبدی مورد استفاده قرار می‌گرفته است [۲۰، ۲۱]. هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه تاثیر پیش درمانی<sup>۱</sup> با عصاره‌های متانولیک و چربی‌زدایی شده گیاهان بومادران زرد و سنبله در تغییرات ادم، هایپرآلرژی و مقادیر IL-6 سرمی طی التهاب حاد ناشی از CFA در موش‌های صحرایی نر می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری و عصاره‌گیری گیاهان

قسمت‌های هوایی هر دو گیاه بومادران زرد و سنبله (*S. athorecalyx* و *A. santolina*) در طی زمان گل‌دهی جمع‌آوری شده، در سایه خشک شده و در پژوهشکده گیاهان

التهاب پاسخ فیزیولوژیک به محرک‌های گوناگون مانند عفونت و زخم‌های بافتی است که به دنبال حضور عامل محرک به سرعت ایجاد می‌شود. برانگیزاننده‌های التهاب می‌توانند میکروبیولوژیکی (باکتری، ویروس، قارچ)، شیمیایی (مواد حساسیتزا و غیره) و یا جسمانی (گرما، پرتوهای یون‌ساز، پرتوهای فرابنتش و غیره) باشند [۱]. در مرحله حاد، التهاب را می‌توان نتیجه‌ای از افزایش سریع ترشح میانجی‌های التهابی دانست که منجر به ایجاد علایمی مثل درد و ادم می‌شوند. ترشح کنترل نشده‌ی پرتوئین‌های فاز حاد و میانجی‌های پیش‌التهابی سلولی به ویژه سایتوکاین‌ها شامل: ایترولوکین ۱، ۶ و TNF- $\alpha$  نقش بسیار مهمی را در ایجاد بیماری‌های التهابی به ویژه التهاب حاد دارد [۲، ۳]. التهاب ناشی از تزریق CFA<sup>۱</sup> یکی از مدل‌های رایج التهابی برای مطالعات بیماری‌های انسان به ویژه مطالعات دارویی است.

داروهای ضدالتهابی در فعالیت میانجی‌ها و آنزیم‌هایی که موجب التهاب و تورم می‌شوند تاثیر می‌گذارند. از روش‌های درمانی که به طور سنتی در بسیاری از کشورها از دیرباز رایج بوده است، استفاده از گیاهان دارویی است.

وجود عوارض جانبی و عدم دسترسی به داروهای سنتیک موجب گرایش بسیاری از مردم جهان به ویژه در کشورهای در حال توسعه به گیاهان دارویی شده و موجب شده است که تحقیقات بسیار گسترده‌ای بر روی گونه‌های ویژه‌ای از گیاهان دارویی که دارای اثرات مناسبی بر روی بسیاری از بیماری‌های بشر دارند صورت گیرد [۴، ۵]. از جمله گیاهان دارویی که به طور سنتی در کشور ما، ایران برای درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شده است

*Achiella santolina* و *Stachys athorecalyx* می‌باشد [۶، ۷].

گیاه سنبله متعلق به گونه *Stachys* است. به طور سنتی دم کرده قسمت‌های هوایی این گیاه برای درمان عفونت‌ها، آرتربیت و بیماری‌های التهاب تنفسی مورد استفاده قرار

<sup>۱</sup> Pre-treatment

<sup>۱</sup> Complete Freund Adjuvant

## حیوانات آزمایشگاهی

در این آزمایش از رت‌های ویستار نر با میانگین وزنی ۱۸۰ - ۲۰۰ گرم استفاده شد. رت‌ها در قفس‌های پلی پروپیلن در شرایط استاندارد ( $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد - رطوبت ۶۰ - ۷۰ درصد و سیکل زمانی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری شدند. غذا و آب کافی هم در اختیار همه حیوانات قرار گرفت. روش استفاده از حیوانات آزمایشگاهی براساس قوانین کمیته اتیک، کار با حیوانات آزمایشگاهی بوده و برای ایجاد درد در حیوانات آزمایشگاهی نیز بر طبق استانداردهای Zimmerman 1983 عمل شد.

## ایجاد التهاب ناشی از CFA

التهاب به وسیله‌ی تزریق زیر جلدی ( $100 \mu\text{l}$ ) از CFA (باسیل سل ضعیف شده) حل شده در روغن معدنی استریل (Sigma, St Louis, MO, USA 10 mg/ml;) در کف پای راست حیوانات در روز صفر ایجاد شد. در رت‌های کترول تنها روغن معدنی استریل ( $100 \mu\text{l}$ ) تزریق شد. ساعت اول بعد از تزریق CFA به کف پا ادم غیر دوطرفه ایجاد می‌شود و این شرایط طی ۲۴ ساعت بعد از تزریق نیز ادامه پیدا می‌کند.

## سنجهش ادم پا

برای تایید سنجهش تزریق صحیح CFA، حجم هر پا قبل و بعد از تزریق در طی زمان‌های متفاوت مورد سنجهش قرار گرفت. سنجهش حجم پا به وسیله‌ی جایه جایی یک محلول الکترولیتی در پلتیسمومتر (model 7141; Ugo Basile; Comerio VA, Italy) انجام شد. به طور خلاصه، پای رت‌ها درون یک محفظه‌ی شفاف حاوی محلول الکترولیتی شفاف فرو برده شد و حجم مایع جایه جا شده که با حجم پا برابر است به وسیله‌ی یک نشانگر دیجیتال نمایش داده شد. اندازه‌گیری حجم پا برای هر پا دوبار انجام و میانگین آنها محاسبه شد. مقدار ادم به وسیله سنجهش تفاوت حجم پا بین ساعت صفر و زمان‌های مختلف محاسبه شد. حجم اندازه‌گیری شده به وسیله‌ی درصد حجم نسبت به ساعت صفر گزارش شد.

دارویی جهاددانشگاهی<sup>۱</sup> شناسایی شدند. قسمت‌های هوایی تمیز و خشک شد و به صورت پودر ذخیره شدند. بخش‌های هوایی خشک شده ( $50$  گرم از بومادران زرد و  $200$  گرم از سنبله) به مدت  $72$  ساعت در متابول ۹۹/۹ درصد خیسانده شده و عصاره متابولیک آنها فیلتر شد. به منظور تهیه عصاره چربی‌زدایی شده، عصاره متابولیک به دو حجم مساوی تقسیم شده و یک قسمت آن به وسیله پترولیوم اتر ( $40 - 60$ )  $3$  بار عصاره‌گیری شد. عصاره‌های متابولی و چربی‌زدایی شده به دست آمده پس از تغليظ توسط دستگاه تقطیر (دمای دستگاه روتاری بین  $35 - 40$  درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود) در خلا در ظروف شیشه‌ای رنگی تا زمان انجام آزمایش نگهداری شدند.

## بررسی فیتوشیمیایی

تست‌های فیتوشیمیایی نرمال به روش‌های استاندارد موجود به منظور شناسایی ساپونین، آلکالوئید و ترپنoidها انجام شد.

## فرمولاسیون

عصاره‌های خشک شده در آب استریل تقطیر شده حاوی Tween 80، به عنوان ماده حلال، حل شده، سپس به وسیله‌ی کاغذ صافی فیلتر شدن دو در نهایت محلول‌های فیلتر شده به منظور تزریق داخل صفاقی (ip) مورد استفاده قرار گرفتند. برای تعیین مقدار واقعی غلظت ذرات فیلتر شده کاغذهای صافی خشک شده و غلظت ذرات موجود بر روی آن محاسبه شد. عصاره‌های گیاهان با غلظت‌های ( $100$ ,  $200$ ,  $400$  mg/ml) Stachys:  $400$  و Achillea:  $100$ ,  $50$  و  $200$  با توجه به مطالعات قبلی به صورت داخل صفاقی در حجمی کمتر از  $1$  میلی‌لیتر استفاده شدند. ایندو-متاسین نیز به عنوان داروی استاندارد ضدالتهابی غیراستروئیدی به روش بالا و در دوز  $5$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تزریق شد. حجم تزریق دارو در حدی بود که اندازه پا به دنبال تزریق دارو تغییری نشان نداد.

<sup>1</sup> ACECR



هایپرآلرژی، ادم و سطوح IL-6 سرمی در ساعت صفر (قبل از تزریق CFA)، ساعت ۱، ۴ و ۲۴ بعد از تزریق CFA سنجیده شدند. ایندوماتاسین به عنوان داروی ضدالتهاب غیراستروییدی استاندارد به صورت داخل صفاقی<sup>۱</sup> در گروه گروه کنترل مثبت تزریق شد (۵ میلی گرم بر کیلو گرم).

### آنالیزهای آماری

نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف از معیار استاندارد<sup>۲</sup> گزارش شدند. آنالیزهای داخل گروهی با استفاده از ANOVA یکطرفه و بررسی های تكمیلی با استفاده از post hoc Tukey's و مطالعات بین گروهی از طریق unpaired t-test برای تعیین اختلافات معنی دار مقادیر IL-6، ادم و هایپرآلرژی انجام شد. فاصله معنی داری  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد.

### نتایج

اثرات پیش درمانی با عصاره های متانولیک و چربی زدایی شده گیاهان بومادران و سنبله بر روی تغییرات حجم پا در التهاب حاد ناشی از CFA

التهاب حاد ایجاد شده در رت های گروه کنترل نشان دهنده افزایش معنی دار حجم پا در یک ساعت بعد از تزریق CFA بود و این افزایش تا ۲۴ ساعت بعد از تزریق نیز ادامه یافت. تزریق عصاره متانولیک گیاه بومادران زرد به صورت پیش درمانی باعث کاهش وابسته به دوز ادم ناشی از تزریق CFA شد. عصاره متانولیک با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم این گیاه اثر معنی داری را بر روی کاهش حجم پا طی ۲۴ ساعت بعد از تزریق CFA نداشت. پیش درمانی با دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم عصاره متانولیک در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش معنی دار حجم پا در ساعت های ۱ و ۴ بعد از تزریق CFA شد (به ترتیب  $p < 0.001$  و  $p < 0.01$ ). گروه کنترل و آزمایش تفاوت معنی داری را در کاهش حجم پا در ساعت ۲۴ بعد از تزریق CFA نشان ندادند. همچنین تفاوت

### سنجهش هایپرآلرژی حرارتی

پس کشیدن پا<sup>۱</sup> در اثر حرارت به وسیله ای تست های کفپایی (Ugo Basile, Verse, Italy) در گروه های کنترل و آزمایش انجام شد. رت ها در اتفاق های پلکسی گلاس به مدت ۱۰ - ۱۵ دقیقه قبل از آزمایش قرار داده شدند تا به محیط آزمایش عادت کنند. عقب کشیدن پا به طور اتوماتیک به وسیله ای تایمر دیجیتال که به یک منبع حرارتی متصل است ثبت شد. PWL ۳ بار برای هر پا در یک فاصله زمانی ۵ - ۱۰ دقیقه سنجیده و مقدار میانگین محاسبه شد. مقدار محاسبه شده پای تزریق شده از مقدار محاسبه شده مربوط به پای دیگر کم شده و مقدار به دست آمده در صورت منفی بودن نشان دهنده هایپرآلرژی در پای موردنظر است.

### سنجهش سطوح IL-6 سرمی در نمونه های خونی

نمونه خونی از عروق رترواوریتال گوشه چشم رت هایی که به وسیله ایزوفلوران بیوهش شده بودند به وسیله ای لوله مویین هپارینه تهیه شد. نمونه های خونی سانتریفیوژ شده و سرم حاصل در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد ذخیره شد. سطوح سرمی IL-6 به وسیله ای کیت ELISA استاندارد رت سرمی (Bender Med System, Uk) سنجیده شد. محدوده ای سنجش حدود ۱۲/۲ pg/ml بود. واکنش متقابل کیت با IL-6 سرم رت ها بر اساس دستور العمل کیت سنجیده شد.

### روش های آزمایشگاهی

برای تعیین اثرات عصاره های گیاهان بومادران زرد و سنبله بر روی روند التهاب دوز های مختلف از هر دو نوع عصاره متانولیک و چربی زدایی شده هر دو نوع گیاه مورد آزمایش قرار گرفت. عصاره های متانولیک و چربی زدایی شده هر دو نوع عصاره به صورت پیش درمانی در دوز های متفاوت به صورت داخل صفاقی نیم ساعت قبل از تزریق CFA، تزریق شد. التهاب به وسیله ای تزریق CFA در کف پای رت ها ایجاد شد.

<sup>1</sup> ip

<sup>2</sup> SEM

<sup>1</sup> PWL: paw withdrawal latency

پیش درمانی باعث کاهش وابسته به دوز هایپرآلرژی ناشی از تزریق CFA شد. عصاره مтанولیک با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم این گیاه اثر معنی داری را بر روی کاهش هایپرآلرژی طی ۲۴ ساعت بعد از تزریق CFA نداشت. پیش درمانی با دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره مтанولیک در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش معنی دار هایپرآلرژی در ساعت های ۱ و ۴ بعد از تزریق CFA شد (به ترتیب  $p < 0.001$  و  $p < 0.05$ ). گروه کنترل و آزمایش تفاوت معنی داری را در کاهش هایپرآلرژی در ساعت ۲۴ بعد از تزریق CFA نشان ندادند. تزریق دوز موثر عصاره مтанولیک بومادران زرد در مقایسه با گروه تیمار شده با ایندوماتاسین (۵ میلی گرم بر کیلوگرم) تاثیر بیشتری در کاهش هایپرآلرژی در ساعت ۱ بعد از تزریق CFA داشت ( $p < 0.01$ ). اما در ساعت های ۴ و ۲۴ تفاوت معنی داری وجود نداشت. دوزهای متفاوت عصاره چربی زدایی شده گیاه بومادران زرد (۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) اثر معنی داری را بر روی کاهش هایپرآلرژی نشان نداد (شکل شماره ۳).

پیش درمانی با عصاره های مтанولیک و چربی زدایی شده گیاه سنبله باعث کاهش وابسته به دوز هایپرآلرژی شد. هر دوی عصاره های مтанولیک و چربی زدایی شده این گیاه با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم اثر مشخصی را در کاهش هایپرآلرژی طی ۲۴ ساعت بعد از تزریق CFA نشان ندادند اما تزریق دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم آن باعث کاهش معنی دار هایپرآلرژی در ساعت ۱ و ۴ بعد از تزریق CFA شد (به ترتیب  $p < 0.01$  و  $p < 0.001$ ). تفاوت مشخصی در کاهش هایپرآلرژی در ساعت ۲۴ بعد از تزریق CFA و همچنین بین دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم آن وجود نداشت. تزریق دوز موثر هر دو نوع عصاره دارای تاثیر بیشتری از تزریق ایندوماتاسین (۵ میلی گرم بر کیلوگرم) بر روی کاهش حجم پا در ساعت های ۱ و ۴ بعد از تزریق CFA داشت (به ترتیب  $p < 0.05$  و  $p < 0.01$ ) اما در ساعت ۲۴ تفاوت معنی داری وجود نداشت (شکل شماره ۲).

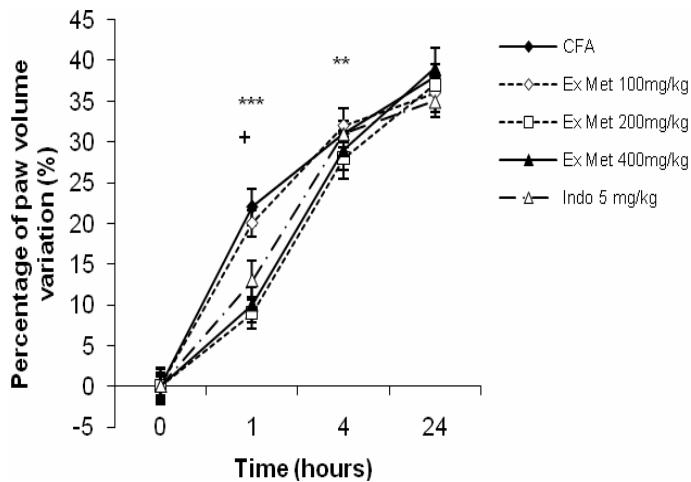


مشخصی بین گروه های تیمار شده با دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره مтанولیک گیاه بومادران زرد در طی مراحل فاز حاد در طی این مطالعه وجود نداشت. تزریق دوز موثر عصاره مтанولیک بومادران زرد در مقایسه با گروه تیمار شده با ایندوماتاسین (۵ میلی گرم بر کیلوگرم) تاثیر بیشتری در کاهش حجم پا در ساعت ۱ بعد از تزریق CFA داشت ( $p < 0.05$ ). اما در ساعت های ۴ و ۲۴ تفاوت معنی داری وجود نداشت. دوزهای متفاوت عصاره چربی زدایی شده گیاه بومادران زرد (۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) اثر معنی داری را بر روی کاهش حجم پا نشان نداد (شکل شماره ۱).

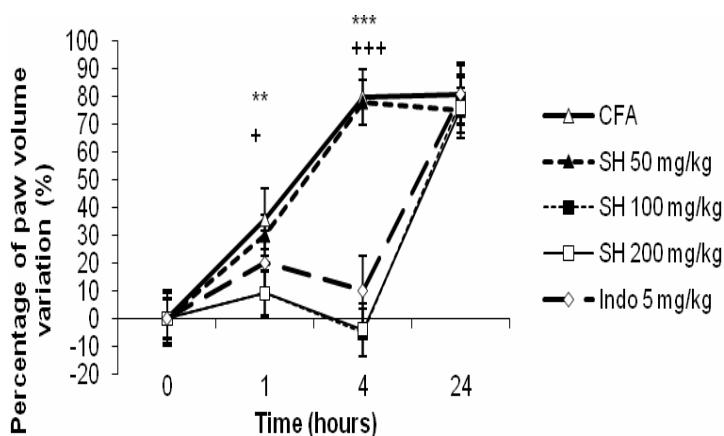
پیش درمانی با عصاره های مтанولیک و چربی زدایی شده گیاه سنبله باعث کاهش وابسته به دوز حجم پا شد. هر دوی عصاره های مtanولیک و چربی زدایی شده ای این گیاه با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم اثر مشخصی را در کاهش حجم پا طی ۲۴ ساعت بعد از تزریق CFA نشان نداد، اما تزریق دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم آن باعث کاهش معنی دار حجم پا در ساعت های ۱ و ۴ بعد از تزریق CFA شد (به ترتیب  $p < 0.01$  و  $p < 0.001$ ). تفاوت مشخصی در کاهش حجم پا در ساعت ۲۴ بعد از تزریق CFA و همچنین بین دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم آن وجود نداشت. تزریق دوز موثر هر دو نوع عصاره دارای تاثیر بیشتری از تزریق ایندوماتاسین (۵ میلی گرم بر کیلوگرم) بر روی کاهش حجم پا در ساعت های ۱ و ۴ بعد از تزریق CFA داشت (به ترتیب  $p < 0.05$  و  $p < 0.01$ ) اما در ساعت ۲۴ تفاوت معنی داری وجود نداشت (شکل شماره ۲).

اثرات پیش درمانی با عصاره های مtanولیک و چربی زدایی شده گیاهان بومادران زرد و سنبله بر روی تغییرات هایپرآلرژی در التهاب حاد ناشی از CFA تزریق CFA موجب افزایش مشخص در هایپرآلرژی شده که در ساعت اول بعد از تزریق آغاز شده و تا ۲۴ ساعت بعد ادامه یافت.

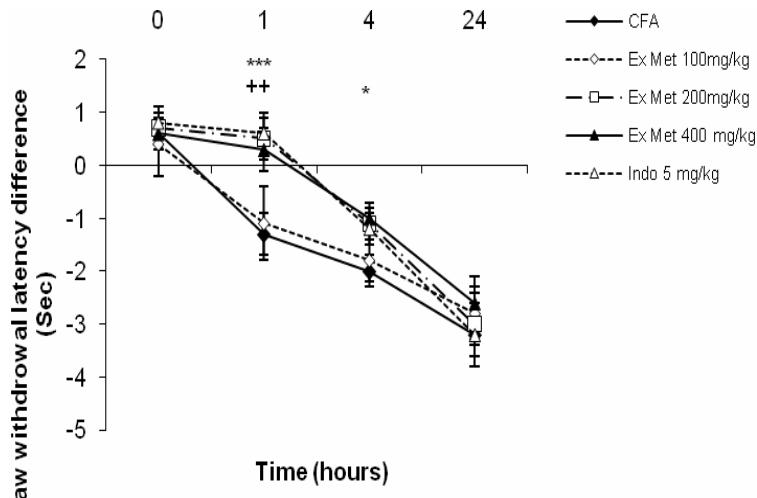
تزریق عصاره مtanولیک گیاه بومادران زرد به صورت



شکل شماره ۱- اثرات عصاره‌های مтанولیک و چربی‌زدایی شده‌ی گیاه بومادران زرد (۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و ایندومتاسین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر روی تغییرات حجم پا ناشی از تزریق CFA. نتایج به صورت  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  بیان شده و  $n=6$  است.  
 $p<0.001$  و  $p<0.0001$ : مقایسه تاثیر پیش درمانی با دوز موثر عصاره مтанولیک (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر روی کاهش حجم پا با گروه کنترل مثبت و ساعت صفر، در ساعت‌های ۱ و ۴ بعد از تزریق CFA.  
 $p<0.05$ : مقایسه تاثیر پیش درمانی با دوز موثر عصاره مтанولیک گیاه بومادران زرد با تزریق ایندومتاسین بر روی کاهش حجم پا در ساعت ۱.



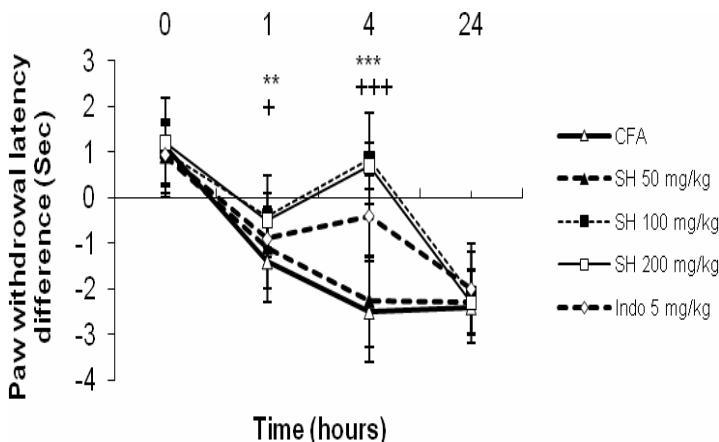
شکل شماره ۲- اثرات عصاره‌های مтанولیک و چربی‌زدایی شده‌ی گیاه سنبله (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و ایندومتاسین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر روی تغییرات حجم پا ناشی از تزریق CFA. نتایج به صورت  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  بیان شده و  $n=6$  است.  
 $p<0.001$  و  $p<0.0001$ : مقایسه تاثیر پیش درمانی با دوزهای موثر عصاره مтанولیک و چربی‌زدایی شده (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر روی کاهش حجم پا با گروه کنترل مثبت و ساعت صفر، در ساعت‌های ۱ و ۴ بعد از تزریق CFA.  
 $p<0.05$  و  $p<0.001$ : مقایسه تاثیر پیش درمانی با دوزهای موثر عصاره مтанولیک و چربی‌زدایی شده گیاه سنبله با تزریق ایندومتاسین بر روی کاهش حجم پا در ساعت‌های ۱ و ۴.



شکل شماره ۳- اثرات عصاره‌های مтанولیک و چربی‌زدایی شده‌ی گیاه بومادران زرد (۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و ایندومتاسین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر روی هایپرآلرژی ناشی از تزریق CFA. نتایج به صورت  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  بیان شده و  $n=6$  است.

$p < 0.001$  و  $p < 0.05$ : مقایسه پیش‌درمانی با دوز موثر عصاره مтанولیک (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر روی کاهش هایپرآلرژی با گروه کنترل مثبت و ساعت صفر، در ساعت‌های ۱ و ۴ بعد از تزریق CFA.

$p < 0.001$ : مقایسه تاثیر پیش‌درمانی با دوز موثر عصاره مтанولیک گیاه بومادران زرد با تزریق ایندومتاسین بر روی کاهش هایپرآلرژی در ساعت ۱.



شکل شماره ۴- اثرات عصاره‌های مтанولیک و چربی‌زدایی شده‌ی گیاه سبله (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و ایندومتاسین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر روی افزایش هایپرآلرژی ناشی از تزریق CFA. نتایج به صورت  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  بیان شده و  $n=6$  است.

$p < 0.001$  و  $p < 0.001$ : مقایسه پیش‌درمانی با دوزهای موثر عصاره مтанولیک و چربی‌زدایی شده (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر روی کاهش هایپرآلرژی با گروه کنترل مثبت و ساعت صفر، در ساعت‌های ۱ و ۴ بعد از تزریق CFA.

$p < 0.005$  و  $p < 0.001$ : مقایسه پیش‌درمانی با دوزهای موثر عصاره مтанولیک و چربی‌زدایی شده گیاه سبله با تزریق ایندومتاسین بر روی کاهش هایپرآلرژی در ساعت‌های ۱ و ۴.



وجود نداشت. تزریق دوز موثر هر دو نوع عصاره دارای تاثیر بیشتری از تزریق ایندوماتاسین (۵ میلی گرم بر کیلوگرم) بر روی کاهش سطوح سرمی IL-6 در ساعت ۴ بعد از تزریق CFA بود (شکل ۶). ( $p < 0.05$ ).

## بحث

هدف از این مطالعه بررسی اثرات پیش درمانی با عصاره های متانولیک و چربی زدایی شده گیاهان بومادران زرد و سنبله بر روی التهاب حاد (۲۴ ساعته) ایجاد شده به وسیله ای CFA است. نتایج نشان داد که عصاره های متانولیک و چربی زدایی شده گیاه سنبله و عصاره های متانولیک گیاه بومادران زرد باعث کاهش وابسته به دوز عالیم التهاب حاد ایجاد شده به وسیله ای CFA می شود. التهاب ایجاد شده به وسیله ای CFA یکی از مدل های رایج برای ایجاد التهاب در حیوانات آزمایشگاهی است که شباهت بسیاری به بیماری های التهابی انسان به ویژه بیماری آرتربیت روماتوئید<sup>۱</sup> دارد و در بسیاری از مطالعات دارویی مورد استفاده قرار می گیرد [۲۲، ۲۳، ۲۴]. این مطالعه نشان داد که پیش درمانی با دوز های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره های متانولیک و چربی زدایی شده گیاه سنبله باعث کاهش مشخص ادم، هایپرآلزی و سطوح سرمی IL-6 در ساعت های ۱ و ۴ بعد از تزریق CFA می شود. در مورد گیاه بومادران زرد فقط دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره متانولیک آن باعث کاهش عالیم التهاب (هایپرآلزی و ادم) و همچنین کاهش سطوح سرمی IL-6 شد.

در برخی مطالعات قبلی فعالیت ضدالتهابی و آنتی اکسیدانتیو گیاهان بومادران زرد و سنبله به اثبات رسیده است [۲۵، ۲۶].

مطالعه فیتوشیمیابی هر دو گیاه نشان داد که: در گیاه سنبله انواع متعددی از مواد شیمیابی مثل ترپنوتیدها، ساپونین گلیکوزیدها و فلاونوئیدها و در گیاه بومادران زرد ترکیبات فلاونوئیدها به ویژه کوئرستین<sup>۲</sup> وجود دارند، که نقش بسیار

اثرات پیش درمانی با عصاره های متانولیک و چربی زدایی شده گیاهان بومادران زرد و سنبله بر روی تغییرات سطوح سرمی IL-6 در التهاب حاد ناشی از

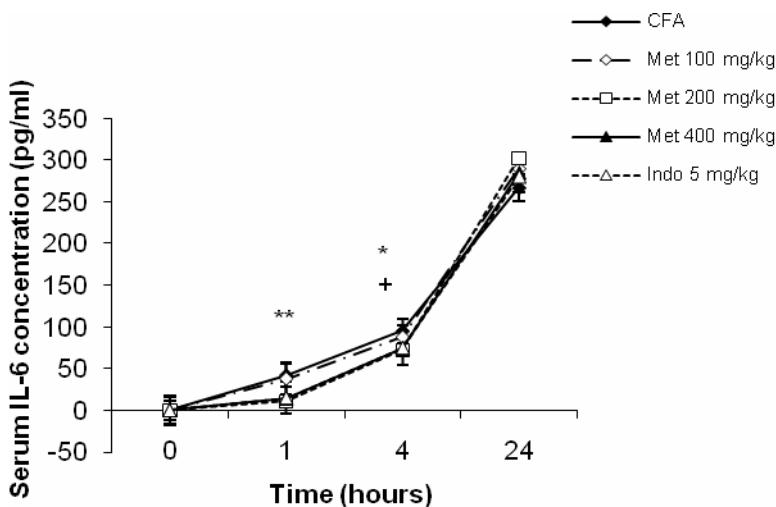
سطوح سرمی IL-6 در رت های گروه کنترل افزایش معنی داری را در یک ساعت بعد از تزریق CFA نشان داد و این افزایش تا ۲۴ ساعت بعد از تزریق نیز ادامه یافت. تزریق عصاره متانولیک گیاه بومادران زرد به صورت پیش درمانی باعث کاهش وابسته به دوز سطوح سرمی IL-6 شد. عصاره متانولیک با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم این گیاه اثر معنی داری را بر روی کاهش سطوح سرمی IL-6 طی ۲۴ ساعت بعد از تزریق CFA نداشت. پیش درمانی با دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره متانولیک در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش معنی دار سطوح سرمی IL-6 در ساعت های ۱ و ۴ بعد از تزریق CFA شد (به ترتیب  $p < 0.01$  و  $p < 0.05$ ). گروه کنترل و آزمایش تفاوت معنی داری را در کاهش سطوح سرمی IL-6 در ساعت ۲۴ بعد از تزریق CFA نشان ندادند. تزریق دوز موثر عصاره متانولیک بومادران زرد در مقایسه با گروه تیمار شده با ایندوماتاسین (۵ میلی گرم بر کیلوگرم) تاثیر بیشتری در کاهش هایپرآلزی در ساعت ۴ بعد از تزریق CFA داشت ( $p < 0.05$ ). اما در ساعت های ۱ و ۲۴ تفاوت معنی داری وجود نداشت. پیش درمانی با دوز های متفاوت عصاره چربی زدایی شده گیاه بومادران زرد (۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) اثر معنی داری را بر روی کاهش هایپرآلزی نشان نداد (شکل شماره ۵).

پیش درمانی با عصاره های متانولیک و چربی زدایی شده گیاه سنبله باعث کاهش وابسته به دوز سطوح سرمی IL-6 شد. هر دوی عصاره های متانولیک و چربی زدایی شده این گیاه با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم اثر مشخصی را در کاهش سطوح سرمی IL-6 طی ۲۴ ساعت بعد از تزریق CFA نشان نداد. اما تزریق دوز های ۱۰۰، ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم آن باعث کاهش معنی دار سطوح سرمی IL-6 در ساعت ۱ و ۴ بعد از تزریق CFA شد ( $p < 0.01$ ). تفاوت مشخصی در کاهش سطوح سرمی IL-6 در ساعت ۲۴ بعد از تزریق CFA و همچنین بین دوز های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم آن

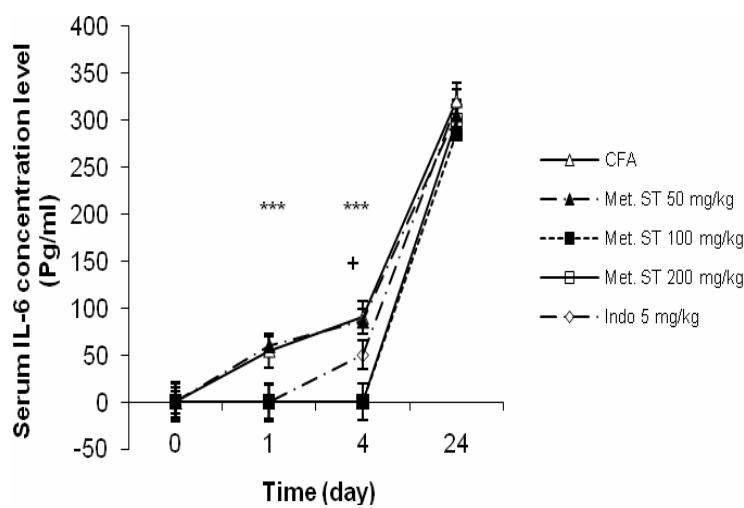
<sup>1</sup> RA

<sup>2</sup> Quercetin





شکل شماره ۵ - اثرات عصاره‌های متابولیک و چربی‌زدایی شده‌ی گیاه بومادران زرد (۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و ایندومتاسین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر روی کاهش سطوح سرمی IL-6 نتایج به صورت  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  بیان شده و  $n=6$  است.  
 $p<0.01$  و  $p<0.05$ : مقایسه پیش‌درمانی با دوز موثر عصاره متابولیک (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر روی کاهش سطوح سرمی IL-6 با گروه کنترل مثبت و ساعت صفر، در ساعت‌های ۱ و ۴ بعد از تزریق CFA.  
 $p<0.05$ : مقایسه میزان پیش‌درمانی با دوز موثر عصاره متابولیک گیاه بومادران با تزریق ایندومتاسین بر روی کاهش سطوح سرمی IL-6 در ساعت ۴.



شکل شماره ۶ - اثرات عصاره‌های متابولیک و چربی‌زدایی شده‌ی گیاه سبله (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg) و ایندومتاسین (۵ mg/kg) بر روی کاهش سطوح سرمی IL-6 نتایج به صورت  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  بیان شده و  $n=6$  است.  
 $p<0.001$ : مقایسه پیش‌درمانی با دوزهای موثر عصاره متابولیک و چربی‌زدایی شده (۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg) بر روی کاهش سطوح سرمی IL-6 با گروه کنترل مثبت و ساعت صفر، در ساعت‌های ۱ و ۴ بعد از تزریق CFA.  
 $p<0.05$ : مقایسه پیش‌درمانی با دوزهای موثر عصاره متابولیک و چربی‌زدایی شده گیاه سبله با تزریق ایندومتاسین بر روی کاهش سطوح سرمی IL-6 در ساعت ۴.

سطح سرمی IL-6 باعث بهبود علایم التهاب در طی این مطالعه شدند. در این مطالعه دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلیگرم بر کیلوگرم از عصاره‌های متانولیک و چربی‌زدایی شده‌ی دو گیاه بومادران زرد و سنبله به صورت پیش‌درمانی (نیم ساعت قبل از تزریق CFA) به رت‌های نر تزریق شد و هایپرآلرژی، ادم و سطوح سرمی IL-6 در ساعت‌های ۱، ۴ و ۲۴ مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان دادند که پیش‌درمانی با دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلیگرم عصاره‌های متانولیک و چربی‌زدایی شده‌ی گیاه سنبله باعث کاهش مشخص ادم، هایپرآلرژی و CFA می‌شود. تفاوت معنی‌داری بین میزان اثرگذاری دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ میلیگرم بر کیلوگرم گیاه سنبله وجود نداشت و دوز ۱۰۰ میلیگرم بر کیلوگرم به عنوان دوز موثر در نظر گرفته شد. در مورد گیاه بومادران زرد فقط دوز ۲۰۰ میلیگرم بر کیلوگرم عصاره متانولیک آن باعث کاهش علایم التهاب (هایپرآلرژی و ادم) و همچنین کاهش سطوح سرمی IL-6 شد و دوز ۱۰۰ میلیگرم بر کیلوگرم عصاره متانولیک و هر سه دوز عصاره چربی‌زدایی شده‌ی آن تاثیر مشخصی بر روند التهاب نداشت. پیش‌درمانی با دوزهای موثر هر دو گیاه در مقایسه با تزریق ایندوماتاسین (۵ میلیگرم بر کیلوگرم) دارای اثرات بیشتری بر روی کاهش حجم پاؤ هایپرآلرژی (در ساعت ۱) و سطوح سرمی IL-6 (در ساعت ۴) بود که می‌تواند نشان‌دهنده اثرگذاری و پایداری بیشتر این عصاره‌ها نسبت به ایندوماتاسین باشد. با توجه به نتایج این بخش از مطالعه چنین می‌توان استنباط کرد که اولاً عوامل ضدالتهابی عصاره گیاه بومادران عمدتاً در بخش غیرقطبی عصاره (متانولیک) واقع شده‌اند ولی در مورد گیاه سنبله عوامل قطبی و غیرقطبی هر دو به یک میزان در التهاب موثر می‌باشند. همچنین به نظر می‌رسد عوامل موثر عصاره متانولیک گیاه سنبله از نظر اثرات ضدالتهابی و ضددردی نسبت به عصاره بومادران در دوزهای یکسان موثرتر بوده و یا غلظت بالاتری داشته باشد که هر دو این موارد نیاز به مطالعات تکمیلی دارد.

در نهایت نتایج این مطالعه را این‌گونه می‌توان جمع‌بندی کرد که علی‌رغم موثر بودن عصاره گیاهان سنبله و بومادران در

مهمی در کاهش علایم التهاب دارند [۲۷]. فلاونوئیدها دارای خاصیت مهارکنندگی بر روی بسیاری از آنزیم‌های موثر در التهاب مثل پروتئین کیناز C، فسفولیپاز A<sub>2</sub> و فسفودی استرازها است [۲۸]. از طرفی در گزارش‌های متفاوتی اثرات ضددردی ترپنoidها و ساپونین‌ها نشان داده شده است [۲۹، ۳۰].

تزریق CFA در کف پای رت‌ها باعث ایجاد واکنش‌های التهابی می‌شود که برای بررسی فعالیت عناصر ضدالتهابی مناسب است. در التهاب ایجاد شده به وسیله‌ی CFA دو فاز متفاوت وجود دارد که شامل: مرحله حاد و مزمون است. در فاز حاد التهاب ایجاد شده به وسیله‌ی CFA عمدتاً میانجی‌های متنوعی شامل هیستامین، سروتونین و کینین‌ها نقش دارند که از لکوسیت‌های مهاجرت کرده به بافت آسیب دیده آزاد می‌شوند [۳۱]. متابولیت‌های آراشیدونیک اسید که از مسیرهای سیکلواکسیژنаз ولیپوآکسیژناز آزاد می‌شوند [۳۲]، ترشح سایتوکاین‌ها و ایجاد رادیکال‌های آزاد نقش مهمی در ایجاد علایم پاتولوژیک التهاب ایفا می‌کنند. در بسیاری از مطالعات ثابت شده است که آنتی‌اکسیدانت‌ها دارای اثرات درمانی بر روی علایم التهاب هستند [۳۳]. در تحقیقی که به وسیله‌ی اردستانی و همکارانش انجام شد. اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدرادیکال‌های آزاد عصاره بومادران زرد نشان داده شده است [۲۱]. در مورد گیاه سنبله به نظر می‌آید که اثرات ضدالتهابی و ضددردی پیش‌درمانی با عصاره‌های این گیاه ممکن است مربوط به مهار ستر و آزادسازی آنزیم‌های التهابی و محصولات آنها باشد.

IL-6 یکی از مهم‌ترین سایتوکاین‌های درگیر در روند التهاب است که در طی فازهای متفاوت التهاب ناشی از CFA ترشح می‌شود. برخی از مطالعات نشان می‌دهند که افزایش سطوح سرمی IL-6 بعد از تزریق CFA باعث ایجاد علایمی مانند ادم و هایپرآلرژی شود [۱]. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که تزریق عصاره‌های گیاهان بومادران زرد و سنبله باعث کاهش واپسیه به دوز سطح سرمی IL-6 می‌شود که منجر به کاهش علایم التهاب از جمله ادم و هایپرآلرژی شد. بنابراین به نظر می‌آید که پیش‌درمانی با دوزهای موثر عصاره‌های گیاهان بومادران زرد و سنبله به وسیله‌ی کاهش

دوز و عوامل موثر ضدالتهابی عصاره‌های این دو گیاه با هم متفاوت می‌باشند که نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد.

کاهش وابسته به دوز عالیم التهابی به ویژه هایپرآلزی، ادم و سطوح سرمی IL-6 طی التهاب حاد ناشی از تزریق CFA

## منابع

- 1.** Zaringhalam J, Manaheji H, Mghsoodi N, Farokhi B, Mirzaiee V. Spinal  $\mu$ -opioid receptor expression and hyperalgesia with dexamethasone in chronic adjuvant-induced arthreitis in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiol.* 2008; 35: 1309 - 15.
- 2.** Nishimoto N, Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. *Nature Clinical Practice Rheumatol.* 2006; 2: 619 - 26.
- 3.** Lipsky Peter E. Interleukin-6 and rheumatic diseases. *Arthritis Research & Therapy* 2006; 8 (suppl 2): S4.
- 4.** Cowan MMN. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Rev.* 1999; 12 (4): 564 - 582.
- 5.** Magaji MG, Anuka JA, Abdu-Aguye I, Yaro AH, Hussaini IM. Preliminary studies on anti-inflammatory and analgesic activities of Securinega virosa (Euphorbiaceae) in experimental animal models. *JMPR* 2008; 2 (2): 39 - 44.
- 6.** Mozaffarian V. A Dictionary of Iranian Plant Names. Tehran: Farhang Moaser 1996, pp: 522 - 3.
- 7.** Rechinger KH. Flora Iranica, No: 150, LBIATAE. Akademische Druck-u, Verlagsanstalt, Graz 1982, pp: 354 - 96.
- 8.** Skaltsa HD, Lazari DM, Chinou IB, Loukis AE. Composition and antibacterial activity of the essential oils of stachys candida and S.chrysanthra from southern Greece. *Planta Med.* 1999; 65: 255-6.
- 9.** Zinchenko TV. Flavonoid glycosides of Stachys neglecta. *Farm-ZhKiev (Farmatsevtichnii zhurnal)*. 1970; 25 (4): 81 - 2.
- 10.** Maleki N, Garjani A, Nazemiye H. Potent anti-inflammatory activities of hydroalcoholic extract from aerial parts of Stachys inflata on rats. *J. Ethnopharmacol.* 2001; 75: 213 – 18.
- 11.** Khanavi M, Sharifzadeh M, Hadjakhoondi A, Shafiee A. Photochemical investigation and anti-inflammatory activity of aerial parts of stachys byzantina C.Koch. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 97: 463 - 8.
- 12.** Nishimura H, Sasaki H, Inagaki, N, Chin M, Mitsuhashi H. Nine phenethyl alcohol glycosides from Stachys sieboldii. *Phytochem.* 1991; 30 (3): 965 - 9.
- 13.** Ross SA, Zinchenko TV. Study of triterpenoids and steroids of Stachys palustris L. *Farm-Zh-Kiev (Farmatsevtichnii-Zhurnal)* 1975; 30 (3): 91 - 2.
- 14.** Yamamoto R, Miyase T, Ueno A. Stachys saponins I –VIII,new oleanane-type triterpene saponins from Stachys riederi Chamisso. *Chem. Pharma. Bullet.* 1994; 42: 1291 – 6.
- 15.** EL-Ansari MA, Barron D, Abdalla MF, Saleh NAM, LE-Quere, JL. Flavonoid constituents of Stachys aegyptica. *Phytochem.* 1991; 30 (4): 1169 – 73.
- 16.** Gomez MA, Saenz MT, Garcia MD, Fenandez MA. Study of the topical anti-inflammatory activity of Achillea ageratum on chronic and acute inflammation models. *IBIDS. Z Naturforsch* 1999; 54 (11): 937 - 41.
- 17.** Okunrobo L. Usifoh C. Ching P. Bariweni M. Anti-inflammatory evaluation of methanol extract and aqueous fraction of the leaves of Anthocleista djalonensis A. *Chev (Gentianaceae).* *The Internet J. Pharmacol.* 2009; 7: 1.
- 18.** Saeidnia S, Moradi-Afrapoli F, Gohari AR, Malmir M. Cytotoxic Flavonoid from *Achillea talagonica* Bioss. *J. Medicinal Plants* 2009; 8 (5): 52 - 6.
- 19.** Wollenweber E, Valant- Vetschera KM, Ivancheva S and Kusmanov B. Flavonoids



- aglycones from the leaf surfaces of some Achillea species. *Phytochem.* 1987; 26: 181 - 2.
- 20.** Demirci F, Demirci B, Gorboz L, Yesilada E, Hosmo Can Baser K. Characterization and biological activity of Achillea teretifolia willd. And A. nobilis L. subsp. Neilreichi (kerner) formanek essential oils. *Turk J. Biol.* 2009; 33: 129 - 36.
- 21.** Ardestani A, Yazdanparast R. Antioxidant and free radical scavenging potential of Achillea santolina extracts. *Food Chem.* 2007; 104 (1): 21 - 9.
- 22.** Woode E, Ainooson1 GK, Boakye-Gyasi1 E et al. Anti-arthritis and antioxidant properties of the ethanolic stem bark extract of *Newbouldia laevis* (P. Beauv.) Seaman ex Bureau (Bignoniaceae). *J. Med. Plants Res.* 2008; 2 (8): 180 - 8.
- 23.** Hamada T, Arima N, Shindo M et al. Suppression of adjuvant arthritis of rats by a novel matrix metalloproteinase-inhibitor. *Br. J. Pharmacol.* 2000; 131: 1513 – 20.
- 24.** Jones RS, Ward JW. Adjuvant-induced polyarthritis in rats. In: E. Bajusz and G. Jasmin, Editors, Methods and Achievements in Experimental Pathology, S. Karger, Basel/New York 1966, pp: 607 – 38.
- 25.** Demirci F, Demirci B, Gorboz L, Yesilada E, Hosmo Can Baser K. Characterization and biological activity of Achillea teretifolia willd. And A. nobilis L. subsp. Neilreichi (kerner) formanek essential oils. *Turk J. Biol.* 2009; 33: 129 - 36.
- 26.** Hajhashemi V, Ghannadi A, Sadighifar H. Analgesic and anti-inflammatory properties of hydroalcholic, polyphenolic and boiled extracts of *stachys lavadulifolia*. *Res. Pharmac. Sci.* 2007; 2: 92 - 8.
- 27.** Rajnarayana K, Reddy MS, Chaluvadi MR, Krishna DR. Bioflavanoids Classification, Pharmacological, Biochemical effects and Therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol.* 2001; 33: 2 - 16.
- 28.** Middleton E. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1998; 439: 175 - 82.
- 29.** De Araujo PF, Coelho-de-Souza AN, Morais SM, Ferreira SC, Leal- Cardoso JH. Antinociceptive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* on mice. *Phytomedicine* 2005; 12: 482 - 686.
- 30.** Reanmongkol W, Subhadhirasakul S, Thienmontree S, Thanyapanit K, Kalnaowakul J, Sengsui S. Antinociceptive activity of the alkaloid extract from *Kopsia macrophylla* leaves in mice. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 2005; 27: 509 - 16.
- 31.** Salvemini D, Wang ZQ, Wyatt DM, Bourdon MH, Marino PT, Currie MG. Nitric oxide: A key mediator in the early and late phase and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 1996; 118: 829 – 38.
- 32.** Cunha TM, Verri, Jr. Neutrophils: are they hyperalgesic or anti-hyperalgesic? *J. Leukocyte Biology.* 2006; 80; 727-28.
- 33.** Taniguchi N, Kanai S, Kawamoto M, Endo H, Higashino H. Study on application of static magnetic field for adjuvant arthritis rats. *Evid. Based Complement. Altern. Med* 2004; 1: 187 – 91.