



Effect of alcoholic extract of Iranian red onion on diabetic neuropathic pain in streptozotocin-diabetic rats

Omid Reza Tamtaji¹, Sayyed Alireza Talaei¹, Zahra Tamassoki¹, Mohsen Taghizadeh^{2*}

1. Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

2. Research Center for Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

Received: 23 Jul 2014

Accepted: 25 Sept 2014

Abstract

Introduction: Neuropathic pain is one of the common complications of diabetes mellitus which is caused by impairment in nerve conductivity. The role of flavonoid and polyphenol compounds in treatment of neuropathic pain has been revealed, and extract of onion contains significant amounts of these compounds. The aim of this study was to investigate the effect of alcoholic extract of onion on diabetic neuropathic pain in streptozotocin-diabetic rats.

Methods: In this experimental study, 40 male Wistar rats were divided into 5 groups: normal control, diabetic control and groups receiving alcoholic extract of onion (125, 250 and 500 mg/kg/day). After injection of streptozotocin (55 mg/kg), the extract was administered for 3 weeks. At days 0, 7, 14 and 21 after injection of streptozotocin, assessment of neuropathic pain was performed by thermal allodynia, mechanical allodynia, hyperalgesia and formalin test.

Results: Behavioral responses to thermal and mechanical stimuli in diabetic control rats showed significant reduction ($P < 0.05$). Oral administration of alcoholic extract of onion at doses of 125 and 250 led to improvement in diabetic neuropathic pain in all 4 tests. However, dose of 500 mg didn't improve neuropathic pain.

Conclusion: Oral administration of alcoholic extract of Iranian red onion improves diabetic neuropathic pain in rats.

Key words: Onion, Neuropathic pain, Allodynia, Formalin test, Streptozotocin

* Corresponding author e-mail: taghizadeh_m@kaums.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

بررسی اثر عصاره الکلی پیاز قرمز ایرانی بر درد نوروپاتی دیابتی در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

- امیدرضا تمناچی^۱، سید علیرضا طلایی^۲، زهرا تمسکی^۳، محسن تقی‌زاده^{۴*}
۱. مرکز تحقیقات فیزیولوژی، کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان
 ۲. مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان
 ۳. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان
 ۴. مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان

پذیرش: ۳ مهر ۹۳

دریافت: ۱ مرداد ۹۳

چکیده

مقدمه: درد نوروپاتی یکی از عوارض شایع بیماری دیابت است که به علت ایجاد اختلال در هدایت پیام‌های عصبی ایجاد می‌شود. نقش ترکیبات پلی‌فنولی و فلاونوئیدی در درمان درد نوروپاتی دیابتی محرز شده است. و عصاره پیاز دارای مقادیر قابل توجهی از این ترکیبات می‌باشد. هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی تاثیر عصاره الکلی پیاز قرمز ایرانی بر درد نوروپاتی در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین می‌باشد.

روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد وبستار به ۵ گروه تقسیم شدند. گروه کنترل نرمال، گروه کنترل دیابتی و گروه‌های دیابتی دریافت کننده عصاره الکلی پیاز (۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن). پس از القای دیابت با استرپتوزوتوسین به مدت سه هفته عصاره الکلی پیاز قرمز ایرانی به صورت خوراکی به موش‌های صحرایی تجویز شد. طی روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ بعد از تزریق استرپتوزوتوسین بررسی درد نوروپاتی دیابتی توسط آزمون‌های آلودینیای حرارتی، آلودینیای مکانیکی، صفحه داغ و آزمون فرمالین انجام گردید.

یافته‌ها: پاسخ رفتاری به محرک‌های حرارتی و مکانیکی در موش‌های کنترل دیابتی کاهش قابل توجهی داشت ($p < 0.05$). تجویز خوراکی عصاره الکلی پیاز در دوز ۱۲۵ و ۲۵۰ به‌طور قابل توجهی باعث بهبود درد نوروپاتی دیابتی در هر چهار آزمون گردید ($p < 0.05$). اما دوز ۵۰۰ میلی‌گرم هیچ تأثیری در بهبود درد نوروپاتی دیابتی نداشت. **نتیجه‌گیری:** تجویز خوراکی عصاره الکلی پیاز قرمز ایرانی باعث بهبود درد نوروپاتی دیابتی در موش‌های صحرایی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پیاز، درد نوروپاتی، آلودینیای، آزمون فرمالین، استرپتوزوتوسین

مقدمه

دارای عوارض مختلفی از جمله بیماری قلبی عروقی، اختلال بینایی و همچنین نوروپاتی دیابتی می‌باشد. در نوروپاتی دیابتی پایانه‌های عصبی و سرعت هدایت پیام‌های عصبی دچار اختلال می‌شوند و این اختلال با اندازه نوروپاتی ارتباط مستقیمی دارد، طوری که در نوروپاتی بزرگ‌تر مانند نوروپاتی‌های پا این اختلال شایع‌تر بوده و زودتر از سایر اندام‌ها درگیر می‌شود. از دست دادن حس و عدم پاسخ به محرک‌های آسیب‌زا عوارضی مانند زخم پای دیابتی و قطع عضو را به دنبال

دیابت یک بیماری متابولیکی است که عمدتاً به دلیل اختلال در گیرنده‌های انسولین یا کاهش انسولین ایجاد شده و باعث افزایش قندخون و آنزیم‌های کبدی می‌شود. این بیماری

taghizadeh_m@kaums.ac.ir

* نویسنده مسئول مکاتبات:

www.phypha.ir/ppj

وبگاه مجله:

تزریق میزان قند خون آن‌ها اندازه‌گیری شد و پس از اثبات دیابتی بودن آن‌ها گاوآژ عصاره الکلی پیاز به مدت سه هفته انجام گردید. روز اندازه‌گیری قند خون و اثبات دیابتی بودن موش‌ها، روز صفر در نظر گرفته شد. در این مدت جهت بررسی نوروپاتی دیابتی از چهار آزمون آلودینیای حرارتی، آلودینیای مکانیکی، هیپرآلژزیای حرارتی و آزمون فرمالین در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ استفاده گردید.

حیوانات: ۴۰ موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۵۰ گرم به طور تصادفی در ۵ گروه ۸ تایی تقسیم بندی شدند:

گروه اول: کنترل نرمال که هیچ مداخله‌ای روی آن‌ها صورت نگرفته است. گروه دوم: کنترل دیابتی، که استرپتوزوتوسین به مقدار ۵۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی به آن‌ها تزریق شد. گروه سوم: گروه موش‌های دیابتی که روزانه عصاره الکلی پیاز را به مقدار ۱۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و به صورت گاوآژ دهانی دریافت کردند. گروه چهارم: گروه موش‌های دیابتی که روزانه عصاره الکلی پیاز را به مقدار ۲۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و به صورت گاوآژ دهانی دریافت کردند. گروه پنجم: گروه موش‌های دیابتی که روزانه عصاره الکلی پیاز را به مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و به صورت گاوآژ دهانی دریافت کردند.

تهیه و آماده‌سازی عصاره: به منظور تهیه عصاره الکلی، ابتدا پیاز مورد نیاز از فروشگاه‌های شهر کاشان خریداری شده و از نظر هرباریوم و سلامت، توسط کارشناس ارشد گیاه-شناسی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی شرکت بارچ اسانس مورد تایید قرار گرفت. پیازهای خریداری شده خرد و سپس در دمای اتاق خشک شد. سپس پیاز خشک شده آسیاب شد. پس از آسیاب کردن پودر بدست آمده در داخل پرکولاتور قرار داده شد و به میزان کافی الکل اتیلیک ۹۶درجه به آن اضافه گردید تا ۵ سانتی متر از سطح پیاز را الکل بگیرد. پس از ۷۲ ساعت، سطح مایع حاصل از پرکولاتور با استفاده از کاغذ صافی، صاف گردید و به منظور تغلیظ، محلول حاصل در دمای ۴۰ درجه قرار گرفت تا تمامی الکل آن خارج شود. در نهایت مقدار ماده خشک عصاره تغلیظ شده جهت گاوآژ اندازه‌گیری شد.

القای دیابت: القای دیابت توسط تزریق داخل صفاقی

دارد [۱۹، ۱۲]. رادیکال‌های آزاد، آپوپتوز و TNF- α و آنزیم-های کبدی در بیماری دیابت افزایش می‌یابند و افزایش این فاکتورها می‌تواند نقش مهمی در بروز عوارضی مانند پایین آمدن آستانه درد در نوروپاتی دیابتی داشته باشد [۲۱، ۴۰].

مطالعات زیادی جهت بررسی تاثیر گیاهان مختلف بر بهبود درد نوروپاتی انجام شده است [۹، ۲۰]. برگ زیتون می‌تواند از طریق کاهش آپوپتوز نورون‌ها درد نوروپاتی دیابتی را در موش‌های صحرایی بهبود ببخشد [۲۰]. عصاره گیاه شاهدانه با فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود می‌تواند درد نوروپاتی را در موش‌های صحرایی دیابتی کاهش دهد [۹]. ثابت شده است که بین خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان و فلاونوئیدهای آن‌ها ارتباط مستقیمی وجود دارد [۲۸، ۳۳]. و در مطالعات مختلف ثابت شده است که این ترکیبات نوروپاتی دیابتی را بهبود می‌بخشند. رسوراترول و کورکومین می‌توانند با کاهش TNF- α باعث بهبود درد نوروپاتی شوند [۳۵]. ترکیب فلاونوئیدی کوئرستین نیز می‌تواند باعث بهبود درد نوروپاتی دیابتی شود [۲]. در مطالعه‌ای مشخص شد که کوئرستین می‌تواند از طریق تاثیر بر مکانیسم‌های اوبیوئیدی باعث بهبود درد نوروپاتی گردد [۳]. پیاز (*Allium cepa*) گیاهی از تیره سوسنیان (*Liliaceae*) می‌باشد [۳۴]. پیاز قرمز حاوی مقادیر زیادی از ترکیبات پلی فنولی و فلاونوئیدی مانند کوئرستین، روتین و کامپفرول می‌باشد [۲۷، ۳۲]. پیاز گیاهی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی بوده و در درمان هیپوگلیسمی نقش موثری دارد [۷]. در مطالعات مختلف اثر ضد باکتریایی و همچنین اثر مثبت این گیاه بر درمان ایسکمی قلبی گزارش شده است که در این مطالعات علت این اثر درمانی را خاصیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه عنوان کرده‌اند [۶، ۳۱].

با توجه به تأثیرات مثبت کوئرستین بر بهبود درد نوروپاتی دیابتی و همچنین وجود مقادیر زیادی از این ترکیب آنتی‌اکسیدان در پیاز، این مطالعه با هدف بررسی اثر عصاره خشک‌شده الکلی پیاز بر درد نوروپاتی دیابتی در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین انجام گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه پس از القای دیابت، در روز پنجم پس از

هایپرآلژیای حرارتی (Radiant Heat Plantar test): در این آزمایش از دستگاه Radiant heat plantar test (Ugo Bassil, Italy) استفاده شد. با استفاده از این دستگاه با تاباندن اشعه مادون قرمز از میان سطح پلکسی گلاس به کف پای سالم، میزان تحمل حیوان نسبت به محرک آسیب رسان حرارتی مورد سنجش قرار می‌گرفت. این روش توسط Hargreaves و همکارانش معرفی شده است [۱۵]. در این روش، بخش میانی کف پای حیوان در معرض اشعه قرار گرفته و زمان تأخیر در عقب کشیدن پا Paw Withdrawal Latency (PWL) ثبت می‌گردد. تحریکات حرارتی سه مرتبه و با فواصل ۵ تا ۱۰ دقیقه تکرار می‌شد. نقطه برش آزمایش ۲۲ ثانیه بود.

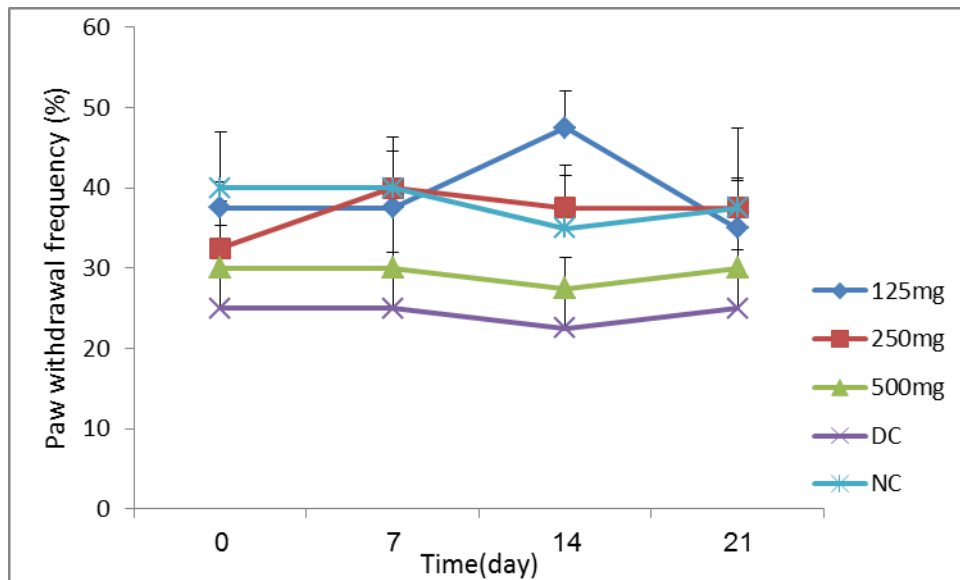
آزمون فرمالین: یک روش استاندارد جهت اندازه‌گیری پاسخ‌های ایجاد شده به محرک‌های دردزای شیمیایی می‌باشد که اولین بار توسط Dubission & Dennis معرفی گردید [۱۰]. در این آزمون، حیوان در یک جایگاه ویژه که شامل یک چهار پایه آلومینیومی است و روی آن یک صفحه شیشه‌ای قرار دارد، درون اتاقکی مستقر می‌شود. در زیر صفحه شیشه‌ای، آینه‌ای با زاویه ۴۵ درجه تعبیه شده است که مشاهدات را آسان‌تر و دقیق‌تر می‌کند. قبل از هر آزمایش، برای سازگاری با محیط جدید، ۳۰ دقیقه قبل از شروع آزمون، حیوان درون جایگاه مشاهده قرار داده می‌شد. پس از آن حیوان را در محفظه مقید کننده (Restrainer) گذاشته و مقدار ۵۰ میکرولیتر محلول فرمالین رقیق شده ۲/۵ درصد با استفاده از سرنگ انسولین به زیر پوست کف پای چپ حیوان تزریق می‌شد. پس از تزریق فرمالین حیوان بلافاصله به جایگاه مشاهده بازگردانده شده و به مدت ۶۰ دقیقه پاسخ‌های حیوان به محرک‌های دردزا ثبت می‌گردید. رفتارهای ناشی از درد به صورت قراردادی به شرح زیر امتیازدهی می‌شود: صفر - حیوان کف پای تزریق شده را روی زمین گذاشته و هیچ علامتی مبنی بر احساس درد نشان نمی‌دهد؛ یک - حیوان کف پای تزریق شده یا نوک انگشتان خود را با احتیاط روی زمین گذاشته، اما وزن خود را روی آن قرار نمی‌دهد؛ دو - حیوان کاملاً پای تزریق شده را از زمین بلند کرده و بدون هیچ تماسی به زمین نزدیک بدن خود قرار می‌دهد؛ و سه - حیوان علاوه بر بالا آوردن پای تزریق شده، شروع به تکان دادن،

استرپتوزوتوسین (Sigma-Aldrich, USA) حل شده در بافر سیترات با PH=4.5 به مقدار ۵۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن انجام شد. پس از ۵ روز موش‌هایی که قند خون آن‌ها اندازه‌گیری شد و موش‌هایی که قند خونشان بیش از ۲۵۰ میلی‌گرم در هر دسی لیتر بود دیابتی تلقی می‌شدند [۱۸].

آزمون‌های رفتاری: جهت بررسی درد نوروپاتی دیابتی در موش‌های صحرایی توسط چهار آزمون آلودینیای حرارتی، آلودینیای مکانیکی، هایپرآلژیای حرارتی و آزمون مکانیکی صورت گرفت.

آلودینیای حرارتی: جهت مشخص کردن حساسیت حیوان به آلودینیای حرارتی از پاشیدن استون به کف پا استفاده شد [۴۱]. در این روش حیوان بر روی یک شبکه سیمی قرار داده شد و به وسیله یک سرنگ انسولین که به جای سوزن آن یک لوله باریک پلی‌پروپیلن قرار داشت، یک قطره استون به کف پای چپ حیوان پاشیده شد. این آزمایش ۵ بار و هر بار به فاصله ۳ دقیقه انجام گرفت. 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. درصد پاسخ از طریق تعداد پاسخ مثبت حیوان نسبت به کل تعداد تحریک محاسبه گردید.

آلودینیای مکانیکی: حیوانات را بر روی یک شبکه سیمی و در داخل یک محفظه پلاکسی گلاس به ابعاد ۲۰×۲۰ و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر قرار داده و بعد از عادت کردن حیوان به محیط جدید از تارهای مختلف von-Frey جهت سنجش آلودینیای مکانیکی استفاده شد. در این آزمایش از تارهای فوق در محدوده ۲ تا ۶۰ گرم ساخت شرکت Stoelting, USA استفاده شد. هر آزمایش را با تار دارای کمترین وزن شروع کرده و به ترتیب در صورت عدم پاسخ حیوان، تار با شماره بالاتر انتخاب می‌گردید. هر تار را سه بار متوالی به فاصله ۵ ثانیه و هر بار به مدت یک ثانیه به کف پای حیوان فشار داده، اگر ۲ بار متوالی پاسخ داده می‌شد (حیوان پای خود را بلند می‌کرد) آستانه پاسخ به حساب می‌آمد و دیگر آزمایش ادامه پیدا نمی‌کرد. در صورتی که حیوان به تار شماره ۶۰ نیز پاسخ نمی‌داد، عدد ۶۰ به عنوان آستانه پاسخ در نظر گرفته می‌شد [۸].



شکل ۱- بررسی تاثیر دریافت دوزهای مختلف عصاره الکلی پیاز بر فرکانس پس کشیدن پا در آزمون آلودینیای حرارتی طی چهار هفته پس از تزریق استرپتوزوتوسین. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد میانگین نمایش داده شده‌اند. * اختلاف فرکانس پس کشیدن پا بین گروه کنترل دیابتی و نرمال معنی‌دار بود ($P=0.019$). ** اختلاف فرکانس پس کشیدن پا بین گروه ۱۲۵ میلی‌گرم و گروه کنترل دیابتی $P=0.009$ بود. *** اختلاف فرکانس پس کشیدن پا بین گروه ۲۵۰ میلی‌گرم و کنترل دیابتی $P=0.039$ بود.

DC: Diabetic Control, NC: Normal Control

ترکیبات موجود در عصاره الکلی پیاز قرمز، میانگین پلی‌فنول‌ها براساس اسید گالیک معادل ۸/۳۶ درصد به ازای هر گرم ماده خشک و میزان فلاونوئیدهای آن بر اساس کوئرستین معادل ۴ درصد به ازای هر گرم ماده خشک بود.

آلودینیای حرارتی: نتایج حاصل از آزمون آلودینیای حرارتی نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مطالعه نسبت به فرکانس پس کشیدن در طول این چهار هفته وجود دارد ($F_{4,35}=4.767$; $P<0.05$). پس آزمون Tukey نشان داد که اختلاف فرکانس پس کشیدن پا بین گروه کنترل و گروه کنترل دیابتی معنی‌دار بود ($P=0.019$). تجویز خوراکی عصاره الکلی پیاز به مقدار ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم باعث بهبود درد نوروپاتی دیابتی در این آزمون گردید و اختلاف آن‌ها با گروه کنترل دیابتی به ترتیب ($P=0.009$) ($P=0.039$) بود. اما برخلاف دوز ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه ۵۰۰ میلی‌گرم و گروه کنترل دیابتی مشاهده نگردید.

آلودینیای مکانیکی: نتایج حاصل از آزمون آلودینیای مکانیکی نشان داد که اختلاف آستانه پاسخ حیوانات نسبت به تحریک مکانیکی توسط تارهای Von-Frey، بین گروه‌های مورد مطالعه قابل توجه بوده است ($F_{4,35}=3.714$; $P<0.05$).

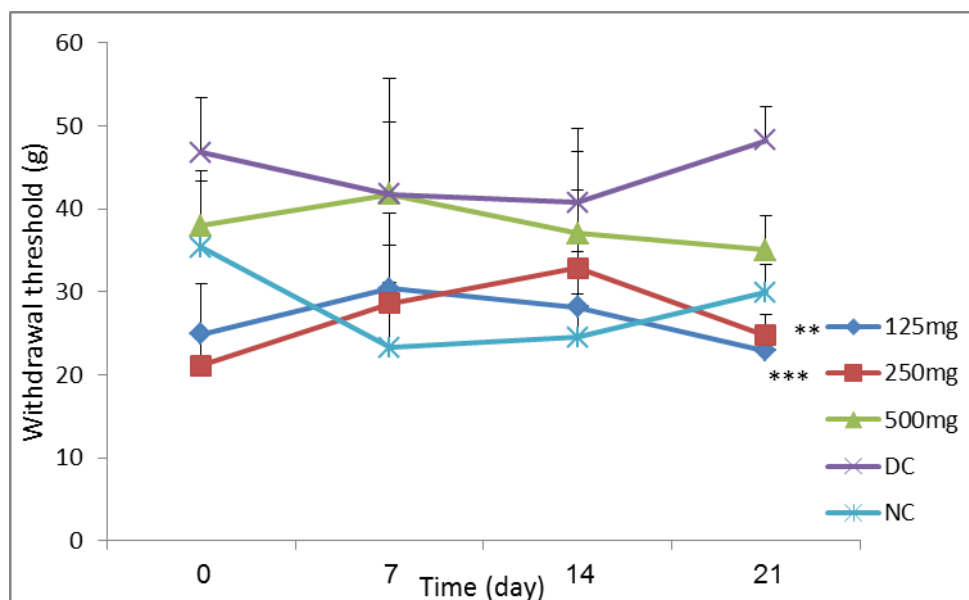
لیسیدن و یا گاز گرفتن آن می‌کند.

فاکتورهای بیوشیمیایی خون: جهت بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی خون، حیوانات با اتر بیهوش شدند سپس خونگیری از طریق دم موش به میزان دو سی سی انجام شد و سرم آن با دستگاه سانتریفوژ و دور ۲۴۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه جدا گردید. در نهایت میزان گلوکز خون ناشتا به روش فلورومتری و میزان آنزیم‌های کبدی به روش فلورومتری آنزیمی با استفاده از کیت (پارس آزمون، ایران) و دستگاه ۳۰۰۰BT اندازه‌گیری شدند.

آنالیز آماری: نتایج به دست آمده از آزمایشات رفتاری با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۷ و با آزمون Repeated measurement Two-way ANOVA مقایسه گردیدند. همچنین داده‌های مربوط به نتایج حاصل از سنجش قند خون و آنزیم‌های کبدی با استفاده از آزمون Two-way ANOVA و پس آزمون Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. $P<0.05$ معنی‌دار تلقی شد.

یافته ها

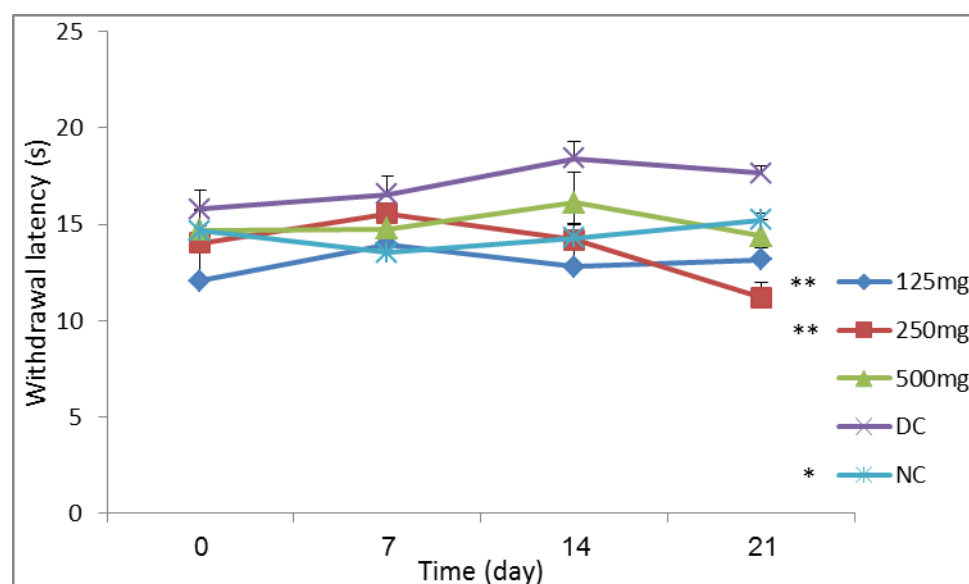
آنالیز عصاره: با توجه به روش‌های ذکر شده برای آنالیز



شکل ۲- بررسی تاثیر دریافت دوزهای مختلف عصاره الکلی پیاز در پاسخ به تحریک ناشی از تماس von-Frey در آزمون آلودینیای مکانیکی. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد میانگین نمایش داده شده‌اند.

* اختلاف بین گروه کنترل دیابتی و نرمال معنی‌دار بود ($P=0.046$). ** اختلاف بین گروه ۱۲۵ میلی‌گرم و کنترل دیابتی در تحریک نسبت به آلودینیای مکانیکی $P=0.041$ بود. *** اختلاف بین گروه ۲۵۰ میلی‌گرم و کنترل دیابتی در تحریک نسبت به آلودینیای مکانیکی $P=0.041$ بود.

DC: Diabetic Control, NC: Normal Control



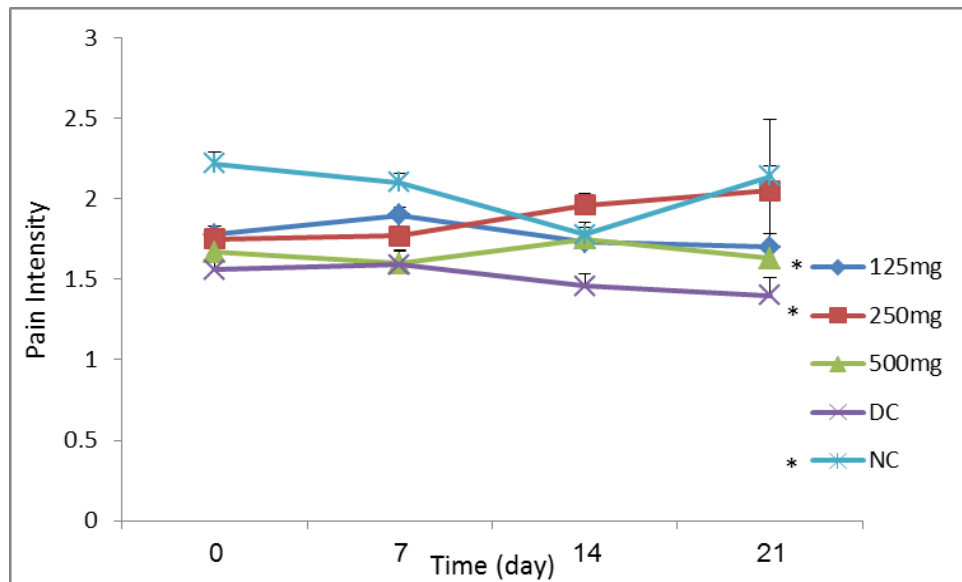
شکل ۳- بررسی تاثیر دریافت دوزهای مختلف عصاره الکلی پیاز نسبت به تحریک ناشی از Radiant Heat در آزمون هایپرآلژیای حرارتی. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد میانگین نمایش داده شده‌اند.

* اختلاف بین گروه کنترل دیابتی و نرمال در پاسخ به تحریک ناشی از Radiant Heat معنی‌دار بود ($P=0.012$). ** اختلاف بین گروه‌های ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم در پاسخ به تحریک ناشی از Radiant Heat با کنترل دیابتی نیز معنی‌دار بود ($P<0.0001$).

DC: Diabetic Control, NC: Normal Control

که این اختلاف به ترتیب ($P=0.041$) و ($P=0.046$) بود. اما هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری در آستانه پاسخ حیوانات گروه ۵۰۰ میلی‌گرم با گروه کنترل دیابتی مشاهده نگردید. هایپرآلژیای حرارتی: با بررسی یافته‌های حاصل از آزمون

آستانه پاسخ حیوانات گروه کنترل دیابتی نسبت به کنترل نرمال افزایش قابل توجهی داشت ($P=0.046$). دوزهای ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم عصاره الکلی پیاز به طور قابل توجهی منجر به کاهش آستانه پاسخ و بهبود درد نوروپاتی در این آزمون شدند



شکل ۴- بررسی تاثیر دریافت دوزهای مختلف عصاره الکلی پیاز نسبت به درد ناشی از تزریق فرمالین در آزمون فرمالین. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد میانگین نمایش داده شده‌اند. * اختلاف بین گروه‌های نرمال، ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم با گروه کنترل دیابتی در پاسخ به درد ناشی از تزریق فرمالین معنی‌دار بود ($P < 0.0001$).

DC: Diabetic Control, NC: Normal Control

NC	DC	500 mg/kg	250 mg/kg	125 mg/kg	
۱۱۹/۷۵ \pm ۱۰/۵۱	۴۲۳/۲۵ \pm ۲۵/۲۹	۱۹۹/۳۷ \pm ۲۳/۳۶**	۲۰۴/۵ \pm ۳۸/۹۸**	۲۲۸/۷۵ \pm ۳۳/۶۹**	FBS
۲۰۲/۱۲ \pm ۱۲/۵۰	۳۳۵/۵ \pm ۲۶/۹۴	۲۷۲/۲۵ \pm ۱۵/۸۸	۲۲۵/۲۵ \pm ۲۳/۹۸*	۲۲۸ \pm ۱۰/۷۰*	AST
۵۴/۵ \pm ۳/۲۸	۱۴۵/۶۲ \pm ۱۳/۱۰	۱۲۸/۷۵ \pm ۱۳/۴۵	۱۱۷/۶۲ \pm ۷/۱۶	۱۰۲/۶۲ \pm ۱۰/۸۸*	ALT

*: معنی‌دار بودن هر فاکتور در گروه‌های دریافت کننده عصاره با گروه کنترل دیابتی ($P < 0.05$)

**:: معنی‌دار بودن هر فاکتور در گروه‌های دریافت کننده عصاره با گروه کنترل دیابتی ($P < 0.0001$)

DC: Diabetic Control, NC: Normal Control, FBS: Fasting blood sugar, ALT: Alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase

توجه می‌باشد ($F_{4,35}=30.488$; $P < 0.0001$). پس آزمون Tukey نشان داد که حیوانات گروه کنترل نرمال درد بیش-تری را نسبت به حیوانات گروه کنترل دیابتی حس می‌کردند ($P < 0.0001$). تجویز عصاره الکلی پیاز در دوز ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم باعث بهبود درد نوروپاتی دیابتی گردید ($P < 0.0001$). درحالی که دوز ۵۰۰ میلی‌گرم هیچ تاثیر در بهبود درد نوروپاتی نداشت.

فاکتورهای بیوشیمیایی خون: همانطور که در جدول یک نشان داده شده است اختلاف قند خون بین کنترل دیابتی و نرمال معنی‌دار بوده ($P < 0.0001$) و تجویز عصاره الکلی پیاز باعث کاهش قند خون گردید ($P < 0.0001$). اختلاف میزان آنزیم‌های کبدی بین دو گروه کنترل نیز قابل توجه بود ($P < 0.05$). دوز ۱۲۵ میلی‌گرم باعث کاهش آنزیم‌های کبدی

هایپرآلژزیای حرارتی مشخص شد که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها نسبت به حرارت ناشی از اشعه مادون قرمز وجود دارد ($F_{4,35}=3.979$; $P < 0.0001$). حیوانات گروه کنترل دیابتی با تأخیر بیشتری نسبت به حیوانات گروه کنترل نرمال نسبت به حرارت ناشی از تابش اشعه مادون قرمز عکس‌العمل نشان دادند ($P = 0.012$). درحالی که حیوانات گروه‌های دریافت کننده عصاره الکلی پیاز به مقدار ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم در مدت زمان کم‌تری در مقایسه با حیوانات گروه کنترل دیابتی پای خود را بلند می‌کردند ($P < 0.0001$). اما هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه ۵۰۰ میلی‌گرم و گروه کنترل دیابتی مشاهده نشد.

آزمون فرمالین: بررسی داده‌ها نشان داد که اختلاف حس درد ناشی از تزریق فرمالین بین گروه‌های مورد مطالعه قابل-

گردید ($P < 0.05$) درحالی که دوز ۲۵۰ هیچ تاثیر قابل توجهی در کاهش ALT نداشت و دوز ۵۰۰ میلی گرم نیز تأثیری در کاهش هردو آنزیم کبدی از خود نشان نداد.

بحث

یافته‌های مطالعه ما نشان داد که حیوانات گروه کنترل دیابتی پاسخ‌های رفتاری کمتری در برابر محرک‌های حرارتی و مکانیکی نسبت به گروه کنترل نرمال از خود نشان دادند که می‌تواند به دلیل نوروپاتی دیابتی و اختلال در سرعت هدایت پیام‌های حسی و حرکتی باشد. درحالی که تجویز خوراکی عصاره الکلی پیاز باعث بهبود درد نوروپاتی دیابتی در موش‌های صحرايي گردید. این مطالعه نشان داد که عصاره الکلی پیاز در دوزهای ۱۲۵ و ۲۵۰ به طور قابل توجهی مانع از ایجاد نوروپاتی دیابتی در هر چهار آزمون آلودینیلای حرارتی، آلودینیلای مکانیکی، هایپرآلژیای حرارتی و آزمون فرمالین شده و باعث افزایش پاسخ‌های رفتاری نسبت به محرک‌های حرارتی و مکانیکی در این آزمون‌ها گردید. اما در حیوانات گروه ۵۰۰ میلی گرم هیچ گونه اثر قابل توجهی در بهبود نوروپاتی دیابتی مشاهده نگردید. یافته‌های حاصل از جدول شماره یک نشان می‌دهد که با تجویز عصاره الکلی پیاز در دوز ۵۰۰ میلی گرم هیچ کاهش محسوسی در آنزیم‌های کبدی مشاهده نگردید. بنابراین می‌توان گفت علت عدم تاثیر مثبت این عصاره در دوز ۵۰۰ میلی گرم ممکن است سمیت این عصاره باشد. همچنین در این مطالعه تجویز خوراکی عصاره الکلی پیاز باعث کاهش قند خون گردید که در مطالعات قبلی نیز اثر مثبت این گیاه بر بهبود فاکتورهای بیوشیمیایی خون در بیماری دیابت به اثبات رسیده است [۱۷، ۲۴].

در بیماری دیابت عوامل مختلفی مانند افزایش رادیکال‌های آزاد، افزایش $TNF-\alpha$ ، آپوپتوز سلولی و فعالیت آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ می‌تواند نقش مهمی در ایجاد نوروپاتی دیابتی داشته باشد [۲۰، ۲۱، ۴۰]. در مطالعات مختلف گزارش شده است که درمان با ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌تواند منجر به بهبود نوروپاتی دیابتی گردد [۱۱، ۳۸] و ترکیبات فلاونوئیدی نیز جز ترکیباتی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند [۲۸، ۳۳]. ترکیب فلاونوئیدی جنیستین با مهار رادیکال‌های آزاد درد

نوروپاتی دیابتی را در موش‌های سورس دیابتی شده با استرپتوزوتوسین کاهش می‌دهد [۳۷]. در مطالعه دیگری نشان داده شد که ترکیبات فلاونوئیدی رسوراترول و کورکومین درد نوروپاتی دیابتی را در موش‌های سوری دیابتی بهبود می‌بخشد [۳۵]. همچنین تاثیر مثبت ترکیب فلاونوئیدی نارینجین بر درمان نوروپاتی دیابتی در موش‌های صحرايي گزارش شده است [۲۱].

بیان شده است که مهار سیتوکین‌های التهابی مانند $TNF-\alpha$ می‌تواند در بهبود درد نوروپاتی مفید باشد [۱۴]. در مطالعه Sharma و همکاران نشان داده شد که ترکیب رسوراترول و کورکومین با انسولین به طور قابل توجهی باعث افزایش پاسخ به محرک‌های حرارتی در آزمون‌های غوطه ور شدن دم و صفحه داغ در موش‌های صحرايي دیابتی می‌شود. این محققین بیان کرده‌اند که علت این افزایش پاسخ می‌تواند مهار $TNF-\alpha$ توسط رسوراترول و کورکومین باشد [۳۵]. همچنین مشخص شده است کوئرستین با کاهش قند خون و $TNF-\alpha$ باعث بهبود درد نوروپاتی در موش‌های صحرايي دیابتی شده با استرپتوزوتوسین می‌گردد [۲۲]. پیش‌درمانی با ترکیب فلاونوئیدی روتین نیز باعث کاهش $TNF-\alpha$ در موش‌های صحرايي دیابتی می‌شود [۴، ۲۶].

گزارش شده است که ترکیبات پلی‌فنولی و فلاونوئیدی آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ را نیز مهار می‌کنند [۱، ۵، ۲۵]. ترکیب فلاونوئیدی روتین با تاثیر بر آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ باعث کاهش التهاب در موش‌های صحرايي دیابتی می‌شود [۱۶]. در مطالعه Yadi و همکاران بیان شده است که ترکیب فلاونوئیدی میرستین و لوتئولین در محیط آزمایشگاهی (In vitro) آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ را مهار می‌کنند [۲۹]. ترکیبات فلاونوئیدی کوئرستین و کامپفرول نیز نقش مهمی در مهار آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ دارند [۱۳].

علاوه بر اثر مثبت ترکیبات فلاونوئیدی و پلی‌فنولی بر مهار رادیکال‌های آزاد، سیتوکین‌های التهابی و آنزیم سیکلواکسیژناز ۲، یکی دیگر از مکانیسم‌های احتمالی در بهبود درد نوروپاتی دیابتی می‌تواند مهار آپوپتوز سلولی توسط این ترکیبات باشد [۳۶]. در مطالعه‌ای نشان داده شد که ترکیب فلاونوئیدی آپیجین سلولی در سلول‌های سرطانی را مهار می‌کند [۳۹]. همچنین در مطالعه دیگری ثابت شده است

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی کاشان با کد ۹۲۰۸۶ می‌باشد. بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی این دانشگاه به‌دلیل همکاری و حمایت‌های مالی، کمال تشکر و قدردانی را به‌عمل می‌آورند.

که ترکیبات پلی‌فنولی موجود در چای سبز نیز آپوپتوز سلولی را در سلول‌های چربی در محیط آزمایشگاهی (In vitro) کاهش می‌دهند [۳۰].

بنابراین باتوجه به مطالعات ذکر شده می‌توان گفت علت اثر مثبت عصاره الکلی پیاز بر بهبود درد نوروپاتی ممکن است مهار رادیکال‌های آزاد، کاهش TNF- α ، مهار آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ و کاهش آپوپتوز سلولی توسط ترکیبات فلاونوئیدی و پلی‌فنولی موجود در عصاره این گیاه باشد.

References

- [1] Ahmed S, Rahman A, Hasnain A, Lalonde M, Goldberg VM, Haqqi TM, Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the IL-1 β -induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes. *Free Radic Biol Med* 33 (2002) 1097-1105.
- [2] Anjaneyulu M, Chopra K, Quercetin attenuates thermal hyperalgesia and cold allodynia in STZ-induced diabetic rats. *Indian J Exp Biol* 42 (2004) 766-769.
- [3] Anjaneyulu M, Chopra K, Quercetin, a bioflavonoid attenuates thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27 (2003) 1001-1005.
- [4] Arjumand W, Seth A, Sultana S, Rutin attenuates cisplatin induced renal inflammation and apoptosis by reducing NF κ B, TNF- α and caspase-3 expression in wistar rats. *Food Chem Toxicol* 49 (2011) 2013-2021.
- [5] Bengmark S, Curcumin, an atoxic antioxidant and natural NF κ B, cyclooxygenase-2, lipooxygenase, and inducible nitric oxide synthase inhibitor: a shield against acute and chronic diseases. *J Parenter Enteral Nutr* 30 (2006) 45-51.
- [6] Benkeblia N, Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Food Sci Technol* 37 (2004) 263-268.
- [7] Campos KE, Diniz YS, Cataneo AC, Faine LA, Alves MJ, Novelli EL, Hypoglycaemic and antioxidant effects of onion, *Allium cepa*: dietary onion addition, antioxidant activity and hypoglycaemic effects on diabetic rats. *Int J Food Sci Nutr* 54 (2003) 241-246.
- [8] Chaplan S, Bach F, Pogrel J, Chung J, Yaksh T. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53 (1994) 55-63.
- [9] Comelli F, Bettoni I, Colleoni M, Giagnoni G, Costa B, Beneficial effects of a Cannabis sativa extract treatment on diabetes-induced neuropathy and oxidative stress. *Phytother Res* 23 (2009) 1678-1684.
- [10] 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* 4 (1978) 161-174.
- [11] Feldman EL, Oxidative stress and diabetic neuropathy: a new understanding of an old problem. *J Clin Invest* 111 (2003) 431-433.
- [12] Forbes JM, Cooper ME, Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev* 93 (2013) 137-188.
- [13] García-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ, González-Gallego J, The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Euro J Pharmacol* 557 (2007) 221-229.
- [14] George A, Schmidt C, Weishaupt A, Toyka KV, Sommer C, Serial determination of tumor necrosis factor-alpha content in rat sciatic nerve after chronic constriction injury. *Exp Neurol* 160 (1999) 124-132.
- [15] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32 (1988) 77-88.
- [16] Javed H, Khan MM, Ahmad A, Vaibhav K, Ahmad ME,

- Khan A, Ashafaq M, Islam F, Siddiqui MS, Safhi MM, Islam F, Rutin *prevents* cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. *Neuroscience* 210 (2012) 340-352.
- [17] Jevas C, Anti-diabetic effects of *Allium cepa* (onions) aqueous extracts on alloxan-induced diabetic *Rattus norvegicus*. *J Med Plants Res* 5 (2011) 1134-1139.
- [18] Ji W, Huang H, Chao J, Lu W, Guo J, Protective Effect of *Agaricus brasiliensis* on STZ-Induced Diabetic Neuropathic Pain in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014 (2014) 679259.
- [19] Jin H, Gu Z, Yu C, Li Y, Association of non-alcoholic fatty liver disease with type 2 diabetes: clinical features and independent risk factors in diabetic fatty liver patients. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 4 (2005) 389-392.
- [20] Kaeidi A, Esmaeili-Mahani S, Sheibani V, Abbasnejad M, Rasouljan B, Hajjalizadeh Z, Afrazi S, Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract attenuates early diabetic neuropathic pain through prevention of high glucose-induced apoptosis: In vitro and in vivo studies. *J Ethnopharmacol* 136 (2011) 188-196.
- [21] Kandhare AD, Raygude KS, Ghosh P, Ghule AE, Bodhankar SL, Neuroprotective effect of naringin by modulation of endogenous biomarkers in streptozotocin induced painful diabetic neuropathy. *Fitoterapia* 83 (2012) 650-659.
- [22] Kandhare AD, Raygude AD, Kymar VS, Rajmane AR, Visnagri A, Ghule AE, Ghosh P, Badole SA, Bodhancar SL, Ameliorative effects quercetin against impaired motor nerve function, inflammatory mediators and apoptosis in neonatal streptozotocin-induced diabetic neuropathy in rats. *Biomed Aging Pathol* 2 (2012) 173-186.
- [23] Kellogg AP, Pop-Busui R, Peripheral nerve dysfunction in experimental diabetes is mediated by cyclooxygenase-2 and oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 7 (2005) 1521-1529.
- [24] Kook S, Kim GH, Choi K, The antidiabetic effect of onion and garlic in experimental diabetic rats: meta-analysis. *J Med Food* 12 (2009) 552-560.
- [25] Kumar A, Sharma SS, NF- κ B inhibitory action of resveratrol: a probable mechanism of neuroprotection in experimental diabetic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 394 (2010) 360-365.
- [26] Kyung TW, Lee EJ, Shin HH, Choi HS, Rutin inhibits osteoclast formation by decreasing reactive oxygen species and TNF- α by inhibiting activation of NF- κ B. *Exp Mol Med* 40 (2008) 52-58.
- [27] Lachman A, Pronek D, Hejtmankova A, Dudjak J, Pivek V, Faitova K, Total polyphenol and main flavonoid antioxidants in different onion (*Allium cepa* L.) varieties. *Horticult Sci* 30 (2003) 142-147.
- [28] Lee Y, Howard L, Villalon B, Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annum*) cultivars. *J Food Sci* 60 (1995) 473-476.
- [29] Li Y, Frenz CM, Li Z, Chen M, Wang Y, Li F, Luo C, Sun J, Bohlin L, Li Z, Yang H, Wang C, Virtual and In vitro bioassay screening of phytochemical inhibitors from flavonoids and isoflavones against Xanthine oxidase and Cyclooxygenase-2 for gout treatment. *Chem Biol Drug Design* 81 (2013) 537-544.
- [30] Lin J, Della-Fera MA, Baile CA, Green Tea Polyphenol Epigallocatechin Gallate Inhibits Adipogenesis and Induces Apoptosis in 3T3-L1 Adipocytes. *Obes Res* 13 (2005) 982-990.
- [31] Park S, Kim MY, Lee DH, Lee SH, Baik EJ, Moon CH, Park SW, Ko EY, Oh SR, Jung YS, Methanolic extract of onion (*Allium cepa*) attenuates ischemia/hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes via antioxidant effect. *Eur J Nutr* 48 (2009) 235-242.
- [32] Prakash D, Singh BD, Upadhyay G, Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*). *Food Chem Toxicol* 102 (2007) 1389-1393.
- [33] Pietta PG, Flavonoids as antioxidants. *J Natur Prod* 63 (2000) 1035-1042.
- [34] Shaath NA, Egyptian onion oil. *Dev Food Sci* 40 (1998) 443-543.
- [35] Sharma S, Chopra K, Kulkarni SK, Effect of insulin and its combination with resveratrol or curcumin in attenuation of diabetic neuropathic pain: participation of nitric oxide and TNF- α . *Phytother Res* 21 (2007) 278-283.
- [36] Son YO, Lee KY, Lee JC, Jang HS, Kim JG, Jeon YM, Jang YS, Selective antiproliferative and apoptotic effects of flavonoids purified from *Rhus verniciflua* Stokes on normal versus transformed hepatic cell lines. *Toxicol Lett* 155 (2005) 115-125.

- [37] Valsecchi AE, Franchi S, Panerai AE, Rossi A, Sacerdote P, Colleoni M, The soy isoflavone genistein reverses oxidative and inflammatory state, neuropathic pain, neurotrophic and vasculature deficits in diabetes mouse model. *Eur J Pharmacol* 650 (2011) 694-702.
- [38] Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL, Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev* 25 (2004) 612-628.
- [39] Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK, Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer* 35 (1999) 1517-1525.
- [40] Wohaieb SA, Godin DV, Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozocin-induced diabetes in rat: effects of insulin treatment. *Diabetes* 36 (1987) 1014-1018.
- [41] Yoon C, Young Wook Y, Heung Sik N, Sun Ho K, Jin Mo C. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 59 (1994) 369-7.