Original Article

Anti-anxiety effect of Alpha-pinene in comparison with Diazepam in adult male rats

Saeedi S, Rafiei-Rad M*

Department of Biology, Izeh Branch, Islamic Azad University, Izeh, I.R. Iran.

Received: 2019/05/9 | Accepted: 2020/07/7

Abstract:

Background: Considering the side effects of anti- anxiety drugs, this study investigated the effect of alpha-pinene on anxiety behaviors compared with Diazepam in rats.

Materials and Methods In this study, 40 male Wistar rats were divided into 5 groups: control, sham (received alphapinene solvent), the groups received 2 and 4 mg/kg alphapinene, and the group that received diazepam 10 mg/kg. At the end of this period, anxiety was measured using elevated plus maze and concentrations of malondialdehyde, thiol and glutathione peroxidase, in hippocampal tissue. The results were analyzed using one-way ANOVA and Tukey tests.

Results: In the groups receiving 2 and 4 mg/kg doses of alpha-pinene significantly increased the percentage of open arm entry (P<0.001) and percentage of time spent in the open arm (P<0.05) (P<0.05). Compared to the control and diazepam groups, administration of alpha-pinene significantly decreased MDA concentration (P<0.001) and significant increase in thiol (P<0.01) (P<0.05) and glutathione peroxidase enzyme activity was evident (P<0.001).

Conclusion: Alpha-pinene showed a downward effect on anxiety responses in male rats, similar to anxiolytic effects of diazepam. Alpha-pinene may be potentiated by binding to the position of benzodiazepines in GABA A receptors and exerted its anti-anxiety effect with antioxidant properties.

Keywords: Anxiety, Alpha-pinene, Diazepam, Rat

***Corresponding Author:**
Email: Rafieirad.m@gmail.com
Tel: 0098 614 364 2625
Fax: 0098 614 364 2625

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, August, 2020; Vol. 24, No 3, Pages 245-253

Please cite this article as: Saeedi S, Rafiei-Rad M. Anti-anxiety effect of Alpha-pinene in comparison with Diazepam in adult male rats. ***Feyz*** 2020; 24(3): 245-53.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-16]

اثر ضداضطرابی آلفاپینن در مقایسه با دیازپام در موش صحرایی نر بالغ

صدری سعیدی [۱]، مریم رفیعی‌راد [۲*]

خلاصه:

سابقه و هدف: باتوجه به عوارض جانبی داروهای شیمیایی ضداضطراب، در این پژوهش تأثیر آلفاپینن بر رفتارهای اضطرابی در مقایسه با دیازپام در موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۴۰ سر موش صحرایی نر (نژاد ویستار) در ۵ گروه: کنترل، شاهد (دریافت‌کننده حلال آلفاپینن)، دریافت‌کننده دوز ۲ و ٤ میلی‌گرم / کیلوگرم آلفاپینن و گروه دریافت‌کننده دوز ۱۰ میلی‌گرم / کیلوگرم دیازپام تقسیم گردیدند. داروها به‌مدت دو هفته به‌صورت درون‌صفاقی تجویز شدند. در پایان این دوره، اضطراب با استفاده از مدل ماز بعلاوه‌ای‌شکل مرتفع مورد سنجش قرار گرفت و غلظت مالون دی‌آلدئید، تیول و گلوتاتیون پراکسیداز در بافت هیپوکامپ اندازه‌گیری شد. نتایج با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج: آلفاپینن در گروه‌های دریافت‌کننده دوزهای ۲ و ٤ میلی‌گرم بر کیلوگرم آلفاپینن به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش درصد ورود به بازوی باز ($P<۰/۰۰۱$) شد و درصد زمان سپری‌شده در بازوی باز از ($P<۰/۰۵$) به ($P<۰/۰۱$) در مقایسه با گروه کنترل و دیازپام تغییر کرد و تجویز آلفاپینن موجب کاهش معنی‌داری در غلظت MDA ($P<۰/۰۰۱$) و افزایش معنی‌داری در میزان تیول ($P<۰/۰۱$) ($P<۰/۰۵$) و فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز ($P<۰/۰۰۱$) شد.

نتیجه‌گیری: آلفاپینن اثر کاهشی بر واکنش‌های اضطرابی نشان داد که مشابه با اثرات ضداضطرابی دیازپام بود. آلفاپینن احتمالاً با اتصال به جایگاه بنزودیازپین‌های موجود در گیرنده‌های گابا A و نیز با اثر آنتی‌اکسیدانی اثر خود را اعمال می‌نماید.

واژگان کلیدی: اضطراب، آلفاپینن، دیازپام، موش صحرایی

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و چهارم، شماره ۳، مرداد - شهریور ۱۳۹۹، صفحات ۲۵۳-۲٤۵

مقدمه

رفتارهای اضطرابی، حاصل واکنش‌های پیچیده‌ای است که به‌دنبال ایجاد تغییرات در عملکرد مغز و فرآیندهای نوروآندوکرینی آغاز می‌گردد. در شرایط هیجانی و اضطراب، به‌دنبال تغییر در عملکرد سیستم لیمبیک و فعال شدن محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - قشر آدرنال، سطح پلاسمایی هورمون‌های گلوکوکورتیکوییدی تغییر می‌کند. این هورمون‌ها می‌توانند در اعمال مغز مداخله نمایند و واکنش‌های لازم در رابطه با اضطراب را ایجاد کنند [۱]. مطالعات نقش سیستم‌های نوروشیمیایی وسیعی را در پدیده اضطراب نشان داده‌اند، اما سیستم گاباارژیک و گیرنده گابا A از مهم‌ترین سیستم‌های درگیر در اضطراب به شمار می‌آید [۲].

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد ایذه، دانشگاه آزاد اسلامی، ایذه، ایران

۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد ایذه، دانشگاه آزاد اسلامی، ایذه، ایران

* **نشانی نویسنده مسؤول:**
ایذه، گروه زیست‌شناسی، واحد ایذه، دانشگاه آزاد اسلامی

تلفن: ۰۶۱۴۳۶۴۲۶۲۵ **دورنویس:** ۰۶۱۴۳۶۴۲۶۲۵

پست الکترونیک: Rafieirad.m@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۱۹ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۹/۴/۱۷

ارتباط زیادی بین سطوح گابا در مغز و اضطراب وجود دارد؛ به‌طوری‌که بنزودیازپین‌ها که در چند دهه گذشته به‌عنوان داروی آرام‌بخش کاربرد درمانی دارند، عمل گابا را تقلید می‌کنند.

این داروها با اتصال به گیرنده‌های گاباارژیک و همچنین با تغییر در فعالیت انتقال‌دهنده‌های عصبی دیگر در مغز، مانند نوراپی‌نفرین و سروتونین، موجب بروز آثار آرام‌بخشی و ضداضطرابی می‌گردند [۳]. اغلب مطالعات نورو - شیمیایی در مورد اضطراب بر روی سروتونین، نوراپی‌نفرین و گابا متمرکز است و داروها می‌توانند با تغییر سطوح این انتقال‌دهنده‌های عصبی در مغز یا با دخالت در عملکرد گیرنده‌های آن‌ها اثرات اضطراب‌زدایی را اعمال کنند [٤]. دیازپام، بنزودیازپینی است که از طریق تعامل با گیرنده‌های GABA موجود در مغز به‌ویژه در تشکیلات مشبک مغز میانی موجب بروز اثرات تسکینی، آرام‌بخشی و ضداضطرابی می‌شود [۵]. فلانوئیدها از طریق برهم‌کنش با گیرنده‌های گابا A می‌توانند اثر ضداضطراب خود را اعمال کنند [٦]. از جمله کارواکرول، آلفاپینن، بتاپینن و بتاکاریوفیلن باعث افزایش متوسط در پاسخ به گیرنده‌های گابا در زیرواحدهای $\alpha 1\beta 2$ می‌شوند [۷] از سوی دیگر نقص دفاع آنتی‌اکسیدانی از علل مهم پیدایش اضطراب و افسردگی است [۸]. به‌نظر می‌رسد که به‌کارگیری آنتی‌اکسیدان‌ها در رژیم غذایی بتواند تا حد زیادی از اضطراب [۹] و افسردگی

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-16]

[۱۰] جلوگیری نماید. بررسی‌ها نشان داده است که در ۵۷ درصد از افراد مبتلا به اضطراب و افسردگی، داروهای گیاهی نتایج بهتری نسبت به داروهای شیمیایی دارند [۱۱]. امروزه در اکثر جوامع، افراد بسیاری به‌علت مواجه شدن با مسائل و مشکلات متعدد، دچار اضطراب و افسردگی می‌شوند که در صورت تداوم می‌تواند سبب بروز اختلالاتی در زندگی طبیعی آن‌ها شود [۱۱]. استرس اکسیداتیو به‌عنوان یک ریسک فاکتور در افزایش اکسیداسیون لیپیدی و پروتئین‌های اکسیدشده در دستگاه عصبی مرکزی و دیگر ارگان‌ها مطرح است و در نهایت موجب آسیب بافتی می‌گردد [۱۲]. اگرچه مکانیسم‌های به‌وجود آورنده اضطراب هنوز به‌طور کامل مشخص نشده‌اند، ولی در سال‌های اخیر دخالت استرس اکسیداتیو در ایجاد اختلالات اضطرابی نشان داده شده است [۸]. اکثر ترکیبات شناسایی‌شده عصاره‌های گیاهی را مونوترپن‌ها تشکیل می‌دهند که از میان آن‌ها آلفاپینن قوی‌ترین فعالیت را دارا می‌باشد [۱۳]. آلفاپینن دارای فرمول بسته $C_{10}H_{16}$ است که از نظر تجارتی بسیار مهم است، همچنین به‌عنوان آنانتیومر در طبیعت یافت می‌شود [۱٤]. آلفاپینن در عصاره بسیاری از گیاهان نظیر گیاه انیسون یا بادیان رومی [۱۵]، جاشیر [۱٦] و سایر گیاهان با درصدهای متفاوت موجود است. مطالعات فارماکولوژیکی نشان داده‌اند که عصاره این گیاهان دارای محدوده‌ی وسیعی از فعالیت‌ها شامل اثرات ضددردی [۱۷]، ضدباکتری [۱۸]، ضداضطرابی [۱۹]، آنتی‌اکسیدانی [۲۰]، ضدالتهابی [۱۷] و خواب‌آور [۲۱] هستند. از این‌رو در این تحقیق اثر ضداضطرابی آلفاپینن در مقایسه با دیازپام با استفاده از آزمون ماز بعلاوه‌ای‌شکل مرتفع و نیز سنجش غلظت مالون دی‌آلدئید مورد مطالعه قرارگرفت.

مواد و روش‌ها

برای انجام تحقیق، تعداد ٤۰ سر موش نر بالغ نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۲۰-۲۰۰ گرم از مرکز تکثیر حیوانات دانشگاه جندی‌شاپور اهواز خریداری شدند و به‌طور تصادفی در ۵ گروه ۸تایی شامل گروه‌های زیر تقسیم گردیدند: گروه سالم یا کنترل (تحت هیچ‌گونه تزریق دارویی قرار نگرفت)، گروه شاهد یا (Vehicle) (توین ۸۰ درصد (حلال آلفاپینن) را به‌صورت درون صفاقی دریافت کردند)، گروه‌های دریافت‌کننده دوز ۲ و ٤ میلی‌گرم / کیلوگرم آلفاپینن [۲۲] (تهیه‌شده از شرکت سیگما آمریکا) و گروه کنترل مثبت دریافت‌کننده‌ی دیازپام (۱۰mg/kg) (تهیه‌شده از شرکت کیمیدارو، تهران، ایران) (که داروها را به‌مدت دو هفته به‌صورت زیرجلدی (IP) دریافت نمودند. شرایط نگهداری برای تمام گروه‌ها یکسان و به‌صورت ۱۲ ساعت روشنایی / تاریکی و دمای محیط ۲±۲۱ درجه سانتی‌گراد در قفس‌های مخصوص و در بستری از پوشال در نظر گرفته شد. جیره غذایی و آب نیز به‌طور آزاد در دسترس قرار گرفت. در طول مطالعه، نگهداری و انجام آزمایش‌ها و از بین بردن حیوانات، مطابق روش‌های استاندارد کار و اصول اخلاق با حیوانات بود (۱۵۳۳۰۵۵۷۹٦۲۰۰٤). پس از یک هفته عادت به وضعیت جدید، مطالعه روی موش‌ها از ساعت ۹ صبح تا ۲ بعدازظهر انجام شد.

سنجش با مدل ماز بعلاوه‌ای‌شکل مرتفع

برای ارزیابی میزان اضطراب، از دستگاه ماز بعلاوه‌ای‌شکل مرتفع Elevated Plus Maze که مدل استاندارد برای ارزیابی سطح اضطراب در جوندگان است، استفاده شد. این دستگاه از چوب ساخته شده است و دارای بازوی باز (هر یک ۵۰×۱۰ سانتی‌متر همراه با یک لبه پنج میلی‌متری) و دو بازوی بسته (هر یک ٤۰×۵۰×۱۰ سانتی‌متر) و یک کفه مرکزی (۱۰×۱۰ سانتی‌متر) می‌باشد. ارتفاع دستگاه از زمین ۷۰ سانتی‌متر است. نحوه قرار گرفتن حیوان در دستگاه طوری بود که در محوطه مرکزی و رو به یک بازوی باز باشد. در مدت ۵ دقیقه‌ای که حیوان آزادانه در دستگاه حرکت می‌کند، تعداد ورود به بازوهای باز و بسته و کل زمان گذرانده‌شده در بازوهای باز و بسته مورد اندازه‌گیری قرار می‌گیرد. منظور از ورود به بازوی باز یا بسته هنگامی است که هر چهار پای حیوان در بازوی موردنظر قرار گیرد. درصد زمان گذرانده‌شده در بازوهای باز و درصد ورود به بازوهای باز به‌عنوان اندکس‌های اضطراب استاندارد هستند و به‌صورت زیر محاسبه می‌شوند [۲۳]:

۱. OAT (Open Arm Times)٪: نسبت زمان گذرانده‌شده در بازوهای باز به کل زمان گذرانده‌شده در هر یک از بازوها×۱۰۰

۲. OAE (Open Arm Entries)٪: نسبت ورودها به بازوی باز به کل ورود به هر دو بازو×۱۰۰

سنجش مالون دی‌آلدئید Malondialdehyde (MDA)

در این مرحله، از روش سنجش تیوباربیتوریک اسید استفاده گردید. به ازای هر ۱ گرم بافت، ۱۰ میلی‌لیتر محلول KCl ۱/۵ درصد اضافه شد و هموژن گردید. از محلول هموژن شده ۰/۵ میلی‌لیتر برداشته شد و ۲/۵ میلی‌لیتر TCA %3 اضافه شد و مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۳۷ درجه نگهداری شد. سپس ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی بعد از سانتریفیوژ برداشته شد و به هر یک ۳ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد اسید فسفریک و ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/٦۷ درصد TBA اضافه شد و ٤۵ دقیقه در آب جوش قرار گرفت. لوله‌ها در ظرف یخ خنک

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-16]

شدند و به هر یک ٤ میلی‌لیتر بوتانول اضافه شد. بعد از ورتکس‌کردن، در ۳۵۰۰ دور به‌طور لحظه‌ای سانتریفیوژ شد و در نهایت جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد و پس از قرار دادن اعداد حاصل از اسپکتروفتومتری و جذب در معادله خطی منحنی استاندارد میزان غلظت MDA براساس (nmol/g/ wet tissue) مورد ارزیابی قرار گرفت [٢٤].

منحنی استاندارد

در ابتدا باید منحنی استاندارد رسم شود که لازم است محلول استاندارد MDA تهیه گردد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، طول موج‌ها اندازه‌گیری شود. ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول استاندارد با غلظت‌های ۱۰، ۸، ٦، ٤، ۲، ۱ و ۰/۵ میکرومولار برداشته شد. سپس ۳ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد اسید فسفریک به آن اضافه شد و بقیه مراحل همچون مراحل قبل انجام گردید.

سنجش میزان تیول

برای ارزیابی گروه تیول از DTNB (معرف المن) استفاده گردید. در یک لوله آزمایش ۱ میلی‌لیتر از بافر تریس (PH=٦) را به ۵۰ میکرولیتر محلول هموژن بافت اضافه نمودیم و جذب نوری آن را در طول موج ٤١٢ نانومتر اندازه‌گیری کردیم (A1). سپس به لوله‌ها ۲۰ میکرولیتر معرف DTNB را اضافه نموده، ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس جذب آن را در همان طول موج اندازه‌گیری کردیم (A2). میزان جذب شاهد (حاوی بافرتریس) نیز در ٤١٢ نانومتر اندازه‌گیری گردید (B). مقادیر A1، A2 و B به‌دست‌آمده را در رابطه ۱ قرار دادیم و میزان گروه‌های تیولی را محاسبه کردیم [٢٤].

میزان گروه تیول (mM) = (A2-A1-B)× ۱/۰۷/۰/۰۵×۱۳/٦ (۱)

اندازه‌گیری سطح فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز

تهیه نمونه و نحوه سنجش سطح فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز مطابق با دستورالعمل قیدشده در کیت تجاری (BioVision Incorporated,Milpitas,CA,USA) انجام شد. یک واحد فعالیت به معنی مقداری از آنزیم است که موجب اکسیداسیون ۱ میکرومول از NADPH به +NADP در دقیقه تحت شرایط کیت و در دمای $^{\circ C}$۲۵ می‌شود.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

مطالعات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۸ انجام گرفت. نتایج حاصل به‌صورت میانگین انحراف معیار ارائه شد. برای تجزیه و تحلیل اطلاعات از One- way ANOVA و Tukey HSD post hoc استفاده شد. $P<$۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌داری نتایج در نظر گرفته شد.

نتایج

اثرات آلفاپینن و دیازپام بر درصد ورود به بازوی باز (OAE٪) و درصد زمان گذرانده شده در بازوی باز (OAT٪):

با مراجعه به نمودار شماره ۱ و ۲ مشاهده می‌شود که درصد زمان اقامت در بازوی باز در گروه دیازپام در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت، ولی این اختلاف معنی‌دار نبود و نیز بین دو گروه شاهد و کنترل هم اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. از طرف دیگر تجویز ١٤ روزه دوزهای ۲ و ٤ میلی‌گرم بر کیلوگرم آلفاپینن سبب افزایش درصد زمان اقامت در بازوی باز شد و در دوزهای فوق از نظر آماری افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داده شد ($P<$۰/۰۵) ($P<$۰/۰۱). درصد تعداد ورود به بازوی باز در گروه دیازپام در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌دار یافت ($P<$۰/۰۰۱)، ولی بین دو گروه شاهد و کنترل اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. از طرف دیگر تجویز ١٤ روزه دوزهای ۲ و ٤ میلی‌گرم بر کیلوگرم آلفاپینن سبب افزایش معنی‌دار درصد تعداد ورود به بازوی باز نسبت به گروه کنترل شد ($P<$۰/۰۰۱).

تأثیر دوزهای مختلف آلفاپینن و دیازپام بر مالون دی‌آلدئید هیپوکامپ:

باتوجه به نمودار شماره ۳ آلفاپینن با دوزهای (۲ و ٤ میلی‌گرم بر کیلوگرم) باعث کاهش معنی‌دار غلظت مالون دی‌آلدئید هیپوکامپ نسبت به گروه کنترل شد ($P<$۰/۰۰۱). همچنین میزان مالون دی‌آلدئید هیپوکامپ در گروه شاهد نسبت به گروه کنترل از نظر آماری تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. نتایج این مطالعه نشان داد در گروه دریافت‌کننده دیازپام در مقایسه با گروه کنترل به‌صورت معنی‌داری میزان مالون دی‌آلدئید هیپوکامپ کاهش یافت ($P<$۰/۰۰۱) (نمودار شماره ٤).

تأثیر دوزهای مختلف آلفاپینن و دیازپام بر غلظت تیول هیپوکامپ:

مطابق نمودار شماره ٤، آلفاپینن با دوزهای (۲ و ٤ میلی‌گرم بر کیلوگرم) باعث افزایش معنی‌دار میزان تیول در بافت هیپوکامپ نسبت به گروه کنترل شد ($P<$۰/۰۱) ($P<$۰/۰۵)؛ همچنین میزان تیول در بافت هیپوکامپ در گروه شاهد نسبت به گروه کنترل از نظر آماری تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. علاوه بر این میزان تیول در بافت هیپوکامپ در گروه دریافت‌کننده دیازپام در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت، ولی این اختلاف معنی‌دار نبود.

تأثیر دوزهای مختلف آلفاپینن و دیازپام بر سطح فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز هیپوکامپ:

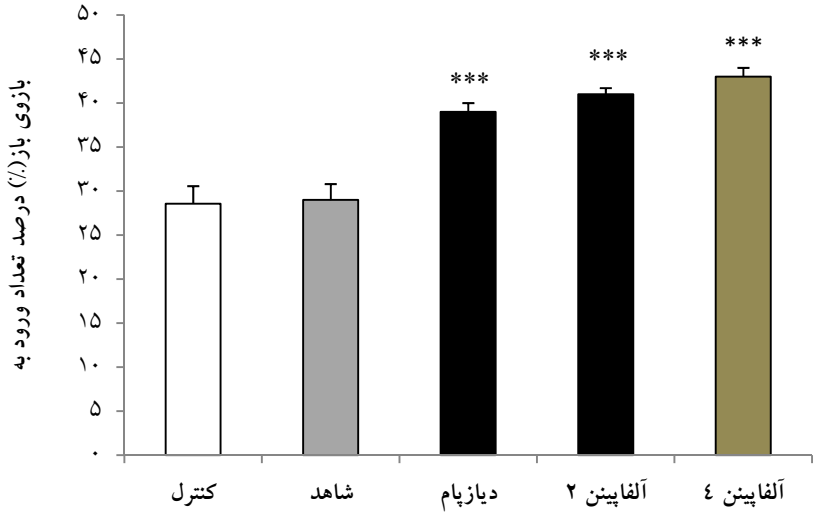
مطابق نمودار شماره ۵، میزان سطح فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در بافت هیپوکامپ در گروه دیازپام نسبت به

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-16]

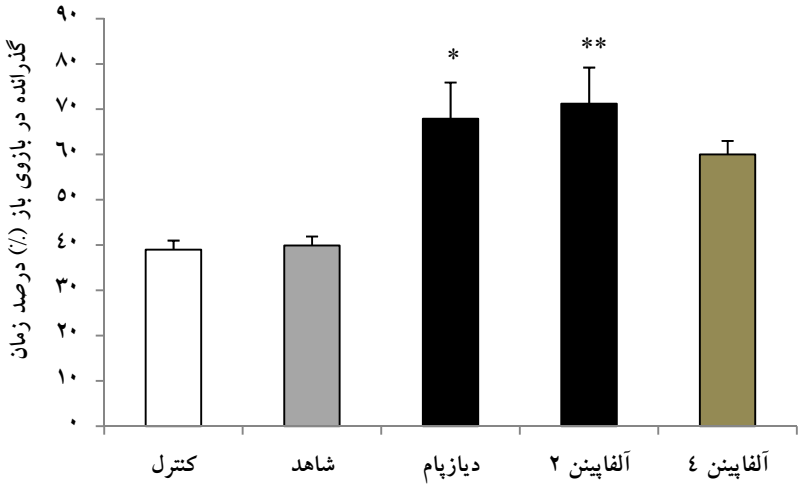
گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافت ($P<۰/۰۵$)؛ ولی بین دو گروه شاهد و کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. همچنین تجویز دوزهای (۲ و ٤ میلی‌گرم بر کیلوگرم) آلفاپینن باعث افزایش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در بافت هیپوکامپ نسبت به گروه کنترل شد ($P<۰/۰۰۱$).

جدول شماره ۱- تحلیل واریانس مقایسه $\overline{X} \pm SEM$ در گروه‌های مختلف آزمایش

معنی‌داری	F	آلفاپینن ٤	آلفاپینن ۲	دیازپام	شاهد	کنترل	گروه‌ها
۰/۰۰۹۳	۲۸/٦۱٤	۳/۲۹۳±٦۰/۳۳۳	۲/۱۳±٥٤/۱۹۹	٤/٥٦±٦۲/۳۳	۱/۰۸±۸۳/٦٦٦	۰/۹۸۰٤±۸٥/۱٦۷	مالون دی‌آلدئید
<۰/۰۰۰۱	۹/۱۰٤	۰/۰۱٥±۰/۲٤٤۳	۰/۰۱۹±۰/۲٦٥۷	۰/۰۰۷۸±۰/۱۸٤۳	۰/۰۰۲±۰/۲۰۷۱	۰/۰۰٤±۰/۱۸۸٦	تیول
<۰/۰۰۰۱	۲۱/٥٦۰	۰/۰٤۹٤٤±۳/۹۳۳	۰/۰۷۳۰۳±۳/۷۰۰	۰/۳۷۸٦±۱/۹۰۰	۰/۰٥٦۲۷±۲/٥٥۰	۰/۰۹۹۱٦±۲/۷٥۰	گلوتاتیون پراکسیداز
۰/۰۰۱۱	۷/۳۲۸	۸/۱۲٦±۷۱/۲۱۸	۸/٦۷۸±٦۷/۹۲۲	۲/۳۸٥±٦۰/۸٥۷	۲/٥٤٥±۳۹/۹۹۰	۲/٦۹۰±۳۹/۰۰۰	درصد زمان ورود به بازوی باز
۰/۱۲۲۸	۲۱/۳۷٦	۱/۷۱۹۰±٤۱/٤۲۹	۱/۰٥٦±۳۹/۸٥۷	۱/۳۹٥±٤۳/٥۷۱	۸۳٥±۲۹/۷۱٤	۲/۱۰۳±۲۸/٥۷۱	درصد تعداد ورود به بازوی باز

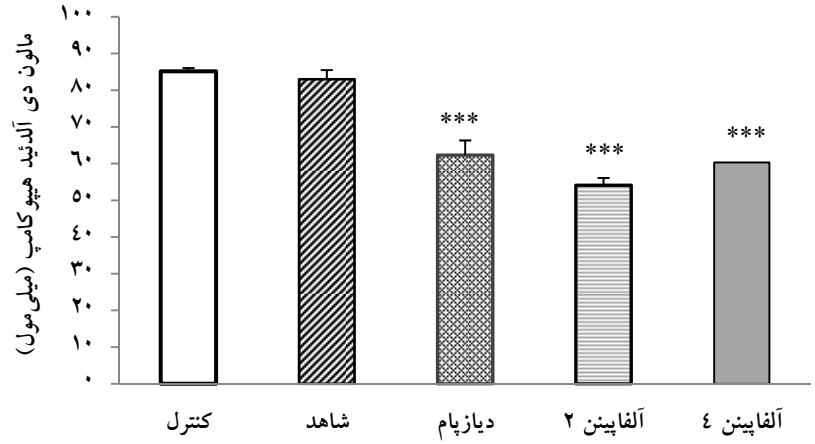


نمودار شماره ۱- مقایسه $\overline{X} \pm SD$ از میانگین درصد تعداد ورود به بازوی باز (OAE٪) در آزمون ماز بعلاوه‌ای‌شکل مرتفع بین گروه‌های کنترل، شاهد، گروه دریافت‌کننده دیازپام و گروه‌های دریافت‌کننده آلفاپینن (۲ و ٤ میلی‌گرم / کیلوگرم) $P<۰/۰۰۱^{***}$ در مقایسه با گروه کنترل

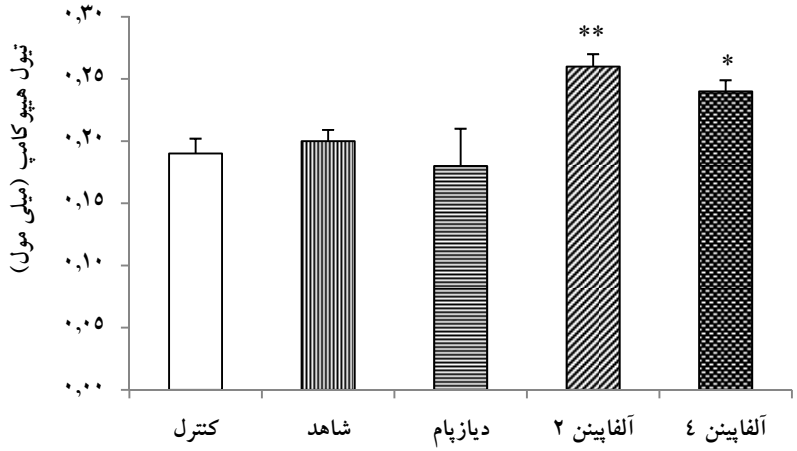


نمودار شماره ۲- مقایسه $\overline{X} \pm SD$ از میانگین درصد زمان گذرانده‌شده در بازوی باز (OAT٪) در آزمون ماز بعلاوه‌ای‌شکل مرتفع بین گروه‌های کنترل، شاهد، گروه دریافت‌کننده دیازپام و گروه‌های دریافت‌کننده آلفاپینن (۲ و ٤ میلی‌گرم / کیلوگرم). $P<۰/۰۱^{**}$، $P<۰/۰٥^{*}$ در مقایسه با گروه کنترل

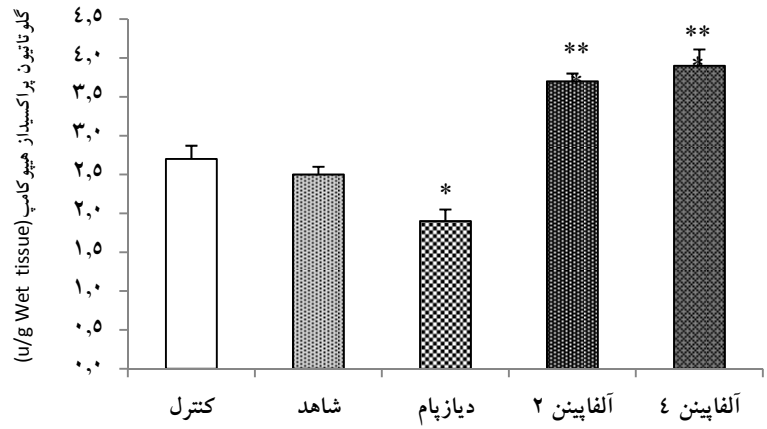
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-16]



نمودار شماره ۳- مقایسه $\overline{X} \pm SD$ از میانگین غلظت مالون دی‌آلدئید هیپوکامپ بین گروه‌های کنترل، شاهد، گروه دریافت‌کننده دیازپام و گروه‌های دریافت‌کننده آلفاپینن (۲ و ٤ میلی‌گرم / کیلوگرم). $P<$۰/۰۰۱***در مقایسه با گروه کنترل



نمودار شماره ٤- مقایسه $\overline{X} \pm SD$ از میانگین غلظت تیول هیپوکامپ بین گروه‌های کنترل، شاهد، گروه دریافت‌کننده دیازپام و گروه‌های دریافت‌کننده آلفاپینن (۲ و ٤ میلی‌گرم / کیلوگرم). $P<$۰/۰۱**، $P<$۰/۰۵*در مقایسه با گروه کنترل



نمودار شماره ۵- مقایسه $\overline{X} \pm SD$ از میانگین غلظت گلوتاتیون پراکسیداز هیپوکامپ بین گروه‌های کنترل، شاهد، گروه دریافت‌کننده دیازپام و گروه‌های دریافت‌کننده آلفاپینن (۲ و ٤ میلی‌گرم / کیلوگرم). $P<$۰/۰۰۱***، $P<$۰/۰۵* در مقایسه با گروه کنترل

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-16]

بحث

هدف از انجام این پژوهش بررسی اثرات ضداضطرابی آلفاپینن بر روی موش‌های صحرایی نر بالغ در مقایسه با دیازپام می‌باشد. نتایج به‌دست‌آمده در تست سنجش میزان اضطراب در موش صحرایی مورد آزمایش نشان داد که ماده آلفاپینن با دوزهای ۲ و ٤ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث افزایش درصد تعداد ورود به بازوی باز و درصد زمان گذرانده‌شده در بازوی باز و به‌عبارتی دیگر سبب کاهش اضطراب گردیده است. در مدل ماز بعلاوه‌ای‌شکل مرتفع، امنیت حیوانات به‌وسیله بازوهای بسته تأمین می‌شود، ولی بازوهای باز برای کاوش بسیار ارزشمند هستند. رفتار جستجوگرانه سبب می‌شود که موش صحرایی نر بالغ در بازوهای باز حرکت کند؛ در حالی‌که احساس پرهیز از مکان‌های باز، روشن و مرتفع که به‌دلیل اضطراب اتفاق می‌افتد، حیوان را وادار می‌سازد تا بیشتر زمانش را در بازوهای بسته بگذراند، به همین دلیل حیوان تمایل بیشتری به بازوهای بسته دارد [٦]. در این پژوهش دیازپام که داروی معمول و شناخته‌شده برای درمان اختلالات اضطرابی است، درصد ورود به بازوی باز و درصد زمان گذرانده‌شده در بازوی باز را به‌طور معناداری افزایش داد، در حالی‌که اثرات آلفاپینن نسبت به این ماده در کاهش اضطراب چشمگیرتر بود. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق حاضر می‌توان بیان داشت که آلفاپینن شاخص‌ها و علائم اضطراب را در موش صحرایی کاهش می‌دهد و درواقع این ماده مؤثره دارای اثرات ضداضطرابی می‌باشد و باعث تعدیل واکنش‌های اضطرابی می‌شود. به‌نظر می‌رسد که وجود اضطراب مربوط به محیط جدید، تغییر در انباشت α-پینن در اندام‌های داخلی از جمله مغز را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۲۵]. در این پژوهش تجویز دوزهای ۲ و ٤ میلی‌گرم بر کیلوگرم آلفاپینن موجب کاهش سطح مالون دی‌آلدئید شد. همچنین میزان تیول و فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. Kuloglu و همکاران فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (مثلاً سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز) را در اریتروسیت‌ها و سطح مالون دی‌آلدئید را در پلاسما به‌عنوان نشانگرهای وضعیت اکسیداتیو (در بیماران مبتلا به اختلال هراس و وسواس فکری) در نمونه‌های انسانی مورد مطالعه قرار دادند و ثابت کردند که موارد مذکور با سن انسان مرتبط هستند [٢٦]. در سال ۲۰۰۵ Hovatta و همکاران ارتباط نزدیک بین مکانیسم دفاع آنتی‌اکسیدانی و فنوتیپ مرتبط با اضطراب را در ٦ موش گونه خالط مشخص کردند. آن‌ها پی‌بردند که در مغز، بیان ژن‌های گلوتاتیون ردوکتاز ۱ و گلیوکسلاز ۱ که ژن‌های درگیر در متابولیسم آنتی‌اکسیداتیو هستند، خیلی زیاد با فنوتیپ‌های مربوط با اضطراب مرتبط می‌باشند و میزان بالای فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون می‌تواند بر تنظیم اضطراب تأثیر بگذارد [۲۷]. روغن هسته انگور از طریق مهار استرس اکسیداتیو باعث کاهش میزان اضطراب در موش‌های صحرایی نر در مدل ماز بعلاوه‌ای‌شکل مرتفع شد [۲۸]. همچنین مشخص شده است که مصرف داروی دیازپام مزمن ممکن است منجر به کاهش میزان استرس اکسیداتیو شود [۲۹]. Ogueji و همکاران اثرات سمّی دیازپام را بر روی بافت گونه‌ای از ماهیان مورد بررسی قرار دادند که ایجاد تغییرات در فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز نشان داد که دیازپام باعث آسیب اکسیداتیو در بافت‌ها می‌شود. تشکیل رادیکال‌های اکسیژن می‌تواند عامل سمّیت باشد [۳۰]. بررسی‌ها نشان داده است که بنزودیازپین‌ها به‌عنوان داروی مؤثری در درمان اضطراب به‌کار می‌روند. این مواد به کانال کلری گابا A متصل شده، با افزایش تمایل گیرنده به گابا A، جریان کلر به داخل سلول را افزایش می‌دهند که به هیپرپلاریزاسیون سلول منجر می‌شود [۳۱]. آلفا پینن توان اتصال به گیرنده‌های گابا همچون داروهای ضدافسردگی مانند دیازپام را داراست [۲۱]. تداخل عمل برخی مواد مؤثره گیاهان با سیستم آدرنرژیک نیز اثبات شده است که ممکن است به‌طور مستقیم و یا غیرمستقیم باشد و با واسطه سیستم‌های نورو ترانسمیتری دیگر از قبیل گابا، سروتونین و آدنوزین میانجی‌گری شود [۳۲]. از سوی دیگر در این تحقیق آلفاپینن با دوزهای (۲ و ٤ میلی‌گرم بر کیلوگرم) باعث کاهش معنی‌دار مالون دی‌آلدئید هیپوکامپ نسبت به گروه کنترل شد. آنتی‌اکسیدان‌ها اثرات ضداضطرابی دارند. بخشی از این اثر به‌علت کاهش استرس اکسیداتیو و التهاب در مغز و بخشی نیز در نتیجه اثرات آگونیستی برخی آنتی‌اکسیدان‌ها بر گیرنده گابا A است. به‌عنوان مثال فلاونوئیدهای طبیعی و سنتتیک اثرات آگونیستی بر گیرنده‌های گابا A دارند و همانند بنزودیازپین‌ها بر گیرنده‌های گابا A اثر می‌گذارند [۳۳]. مطالعات پیشین انجام‌شده بر آلفاپینن و اثر کاهندگی آن بر سطح مالون دی‌آلدئید بیان‌کننده اثرات ممانعت‌کنندگی آن در برابر استرس‌های اکسیداتیو می‌باشد [۲۰].

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که آلفاپینن اثر ضداضطرابی دارد که این اثر مشابه دیازپام می‌باشد. همچنین آلفاپینن با فعالیت آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در رفع پاتوژنز اضطراب ایفا می‌کند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه صدری سعیدی دانش‌آموخته

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-16]

کارشناسی‌ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد ایذه با کد ۱۵۳۳۰۵۵۷۹۶۲۰۰٤ می‌باشد و هزینه آن از محل اعتبار هزینه‌های شخصی ایشان پرداخت شده است. بدین‌وسیله از حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ایذه که در اجرای این مطالعه ما را همراهی کردند، نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

References:

[1] Vafaei A, Taherian AA, Sadegh Sobhaninejad M. Evaluation of interaction of Corticosterone and verapamil on anxiety related behavior in mice. ***Pharm Sci*** 2009; 15: 219-26. [in Persian]

[2] Modaresi M, Basravi M, Sajadia I. Comparative effects of balm hydro alcoholic extract and diazepam on reducing anxiety of in mice. ***Armaghane Danesh*** 2016; 20(10): 848-57. [in Persian]

[3] Felgentreff F, Becker A, Meier B, Brattström A. Valerian extract characterized by high valerenic acid and low acetoxy valerenic acid contents demonstrates anxiolytic activity. ***Phymed*** 2012; 19(13): 1216-22.

[4] Sandford J, Argyropoulos S, Nutt D. The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1 Basic Neurobiology. ***Pharmacol Ther*** 2000; 88(3): 197-212.

[5] Rezaie A , Mosavi Gh, Ahmadizadeh Ch, Jafari B. Study of sedative, preanaesthetic and anti-anxiety effects of *Rosa damascene* herbal extract in comparison with diazepam in rat. ***TUMS*** 2011; 69(3): 179-84. [in Persian]

[6] Johnston GA. Flavonoid nutraceuticals and ionotropic receptors for the inhibitory neurotransmitter GABA. ***Neurochem Int*** 2015; 89: 120-5.

[7] Kessler A, Villmann C, Sahin-Nadeem H, Pischetsrieder M, Buettner A. GABAA receptor modulation by the volatile fractions of Sideritis species used as 'Greek' or 'Turkish' mountain tea, ***Flavour Frag J*** 2012; 27: 297–303.

[8] Bouayed J, Rammal H, Soulimani R. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. ***Oxid Med Cell Longev*** 2009; 2(2): 63-7.

[9] Ng F, Berk M, Dean O, Bush AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. ***IJNP*** 2008; 11(6): 851-76.

[10] Khanzode S, Dakhale G, Khanzode S, Saoji A, Palasodkar R. Oxidative damage and major depression: The potential antioxidant action of selective serotonin-re-uptake inhibitors. ***Redox Rep*** 2003; 8(6): 365-70.

[11] Jia Y, Zhu H, Leung SW. Comparative efficacy of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) in treating major depressive disorder: a protocol for network meta-analysis of randomised controlled trials. ***BMJ Open*** 2016, 6(6): e010142.

[12] Rajabi S, Noori S, Zal F, Jahanbazi Jahan-Abad A. Oxidative Stress and its Different Roles in Neurodegenerative Diseases. ***Neurosci J Shefaye Khatam*** 2017; 5(1): 73-86. [in Persian]

[13] Morshedloo M, Ebadi A, Fatahi Moghaddam M, Yazdani D. Essential Oil Composition, Total Phenol Compounds and Antioxidant Activity of *Hypericum perforatum* L. Extract Collected from North of Iran. ***J Med Plants*** 2012; 1(41): 218-26. [in Persian]

[14] Yang Z, Wu N, Zu Y, Fu Y. Comparative anti-infectious bronchitis virus (IBV) activity of (-)-pinene: effect on nucleocapsid (N) protein. ***Molecules*** 2011; 16(2): 1044-54.

[15] Samojlik I, Mijatović V, Petković S, Škrbić B, Božin B: The influence of essential oil of aniseed (*Pimpinella anisum* L.) on drug effects on the central nervous system. ***Fitoterapia*** 2012; 83(8): 1466-73.

[16] Szabadics J, Erdélyi L. Pre- and postsynaptic effects of eugenol and related compounds on *Helix pomatia* L. ***Acta Biol Hung*** 2000; 51(2-4): 265-73.

[17] Li XJ, Yang YJ, Li YS, Zhang W, Tang HB. α-Pinene, linalool, and 1-octanol contribute to the topical anti-inflammatory and analgesic activities of frankincense by inhibiting COX-2. ***J Ethnopharmacol*** 2015; 19: 22-6.

[18] Fit N, Gheorghe R, Rapuntean S, Flore C, Cosmin Nadas G: Antibacterial Effect of Essential Vegetal Extracts on *Staphylococcus aureus* Compared to Antibiotics. ***Not Bot Horti Agrobo*** 2009; 37(2): 117-23.

[19] Satou T, Kasuya H, Maeda K, Koike K. Daily Inhalation of α-Pinene in Mice: Effects on Behavior and Organ Accumulation. ***Phytother Res*** 2014 Sep; 28(9): 1284-7.

[20] Goudarzi S, Rafieirad M. Evaluating the effect of α-pinene on motor activity, avoidance memory and lipid peroxidation in animal model of Parkinson disease in adult male rats. ***RJP*** 2017; 4(2): 53-63. [in Persian]

[21] Yang H, Woo J, Pae AN, Um MY, Cho NC, Park KD, et al. alpha-Pinene, a Major Constituent of Pine Tree Oils, Enhances Non-Rapid Eye Movement Sleep in Mice through GABAA-benzodiazepine Receptors. ***Mol Pharmacol*** 2016; 90(5): 530-9.

[22] Nozari K, Rafieirad M. Comparison of Alphapinene and Donpezil Effects on Passive Avoidance Memory in Adult Male Rats. ***Qom Univ Med Sci J*** 2019; 13(4): 1-10. [in Persian]

[23] Rafieirad M, Abbaszadeh H. Pomegranate seed extract reduces ischemia induced anxiety in male rats. ***J Herbmed Pharmacol*** 2017; 6(2): 85-9.

[24] Sharifi F, Rafieirad M, Sazegar H. Effects of *Ferulago angulata* Extract Against Oxidative Stress Induced by 6-hydroxydopamine in Rats. ***J Med Plants*** 2015; 1(53): 34-44.

[25] Kasuya H, Iida S, Ono K, Satou T, Koike K. Intracerebral Distribution of a-Pinene and the

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-16]

Anxiolytic-like Effect in Mice Following Inhaled Administration of Essential Oil from *Chamaecyparis obtuse*. ***Nat Prod Commun*** 2015; 10(8): 1479-82.
[26] Kuloglu M, Atmaca M, Tezcan E, Gecici O, Tunckol H, Ustundag B. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels in patients with obsessivecompulsive disorder. ***Neuropsychobiol*** 2002; 46(1): 27-32.
[27] Hovatta I, Tennant RS, Helton R, Marr RA, Singer O, Redwine JM, et al. Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. ***Nature*** 2005; 438(7068): 662-6.
[28] Rabiee Z, Davoodizadeh Z, Bijad E, Rafieian-kopaei M. Evaluation of the Effects of Grape Seed Oil on the Anxiety Level and Motor Coordination of Male Wistar Rats. ***JBUMS*** 2016; 18(6): 52-8. [in Persian]
[29] Gungor Ö, Özdemir N. Analysis of Oxidative Stress Parameters Depend on Diazepam Application in Rat Serum and Tissue Samples. ***Chem Sci Trans*** 2014; 3(1): 389-95.
[30] Ogueji E, Iheanacho S, Nwani Ch, Mbah Ch, Okeke O, Usman I. Toxicity of diazepam on lipid peroxidation, biochemical and oxidative stress indicators on liver and gill tissues of African catfish *Clarias gariepinus*. ***RJIF*** 2017; 5(3): 114-23.
[31] Mohamadi-Pour V, Motaghi S, Jonaidi H, Mirtadjadini SM: Investigation of anxiolytic and hypnotic effects of hydroalcoholic extracts of *Lemon Verbena* in mice. ***Ijpp Phypha*** 2018; 2(3): 184-77. [in Persian]
[32] Banitaba S M, Alaei H. Surveying the effect of clonidine (α2 agonist) and idazoxan (α2 antagonist) on morphine dependency in rat. ***Feyz*** 2004; 8(1): 26-32. [in Persian]
[33] Feng J, Cai X, Zhao JH, Yan Z. Serotonin Receptors Modulate GABA A Receptor Channels through Activation of Anchored Protein Kinase C in Prefrontal Cortical Neurons. ***Neurosci*** 2001; 21(17): 6502-11.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-16]