

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.

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

صدری سعیدی^۱، مریم رفیعی راد^{۲*}

خلاصه:

سابقه و هدف: باتوجه به عوارض جانبی داروهای شیمیایی ضداضطراب، در این پژوهش تأثیر آلفاپینن بر رفتارهای اضطرابی در مقایسه با ديازپام 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 ۴ میلی‌گرم / کیلوگرم آلفاپینن و گروه دریافت‌کننده دوز ۱۰ میلی‌گرم / کیلوگرم ديازپام تقسیم گردیدند. داروها به مدت دو هفته به صورت درون‌صفاقی تجویز شدند. در پایان این دوره، اضطراب با استفاده از مدل ماز بعلاوه‌ای شکل 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 ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم آلفاپینن به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش درصد ورود به بازوی باز ($P < 0/001$) شد و درصد زمان سپری‌شده در بازوی باز از ($P < 0/005$) به ($P < 0/01$) در مقایسه با گروه کنترل و ديازپام تغییر کرد و تجویز آلفاپینن موجب کاهش معنی‌داری در غلظت MDA ($P < 0/001$) و افزایش معنی‌داری در میزان تیول ($P < 0/01$) ($P < 0/05$) و فعالیت آنزیم گلو‌تاتیون پراکسیداز ($P < 0/001$) شد.

نتیجه‌گیری: آلفاپینن اثر کاهشی بر واکنش‌های اضطرابی نشان داد که مشابه با اثرات ضداضطرابی ديازپام 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، ديازپام، موش صحرایی

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و چهارم، شماره ۳، مرداد - شهریور ۱۳۹۹، صفحات ۲۵۳-۲۴۵

مقدمه

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 گابا آرژیک 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 [۴].

ديازپام، 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]. فلانوتی‌دها از طریق برهم‌کنش با گیرنده‌های گابا A می‌توانند اثر ضداضطراب خود را اعمال کنند [۶]. از جمله کارواکرو، آلفاپینن، بتاپینن و بتاکاریوفیلین 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

رفتارهای اضطرابی، حاصل واکنش‌های پیچیده‌ای است که به‌دنبال ایجاد تغییرات در عملکرد مغز و فرآیندهای نورواندوکرینی آغاز می‌گردد. در شرایط هیجانی و اضطراب، به‌دنبال تغییر در عملکرد سیستم لیمبیک و فعال شدن محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - قشر آدرنال، سطح پلاسمایی هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی 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 گابا آرژیک و گیرنده گابا A از مهم‌ترین سیستم‌های درگیر در اضطراب به‌شمار 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 مسئول:

ایذه، گروه زیست‌شناسی، واحد ایذه، دانشگاه آزاد اسلامی

تلفن: ۰۶۱۴۳۶۴۲۶۲۵ | دورنویس: ۰۶۱۴۳۶۴۲۶۲۵

پست الکترونیکی: Rafieirad.m@gmail.com

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

نگهداری برای تمام گروه‌ها یکسان و به‌صورت ۱۲ ساعت روشنایی / تاریکی و دمای محیط 21 ± 2 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 (۱۵۳۳۰۵۵۷۹۶۲۰۰۴). پس از یک هفته عادت به وضعیت جدید، مطالعه روی موش‌ها از ساعت ۹ صبح تا ۲ بعدازظهر انجام شد.

سنجش با مدل ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع

برای ارزیابی میزان اضطراب، از دستگاه ماز بعلاوه‌ای شکل 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 10×50 سانتی‌متر همراه با یک لبه پنج میلی‌متری) و دو بازوی بسته (هر یک $10 \times 50 \times 40$ سانتی‌متر) و یک کفه مرکزی (10×10 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 $100 \times$

۲. OAE (Open Arm Entries): نسبت ورودها به بازوی باز

به کل ورود به هر دو بازو $100 \times$

سنجش مالون دی‌آلدئید (MDA) Malondialdehyde

در این مرحله، از روش سنجش تیوباربیتریک 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 ۳٪ TCA 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 ۰/۷٪ TBA اضافه شد و ۴۵ دقیقه در آب جوش قرار گرفت. لوله‌ها در ظرف یخ خنک

[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 تجارتي بسیار مهم است، همچنین به‌عنوان آنانتیومر در طبیعت یافت می‌شود [۱۴]. آلفاپینن در عصاره بسیاری از گیاهان نظیر گیاه انیسون یا بادیان رومی [۱۵]، جاشیر [۱۶] 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]، ضدالتهاپی [۱۷] و خواب‌آور [۲۱] هستند. از این‌رو در این تحقیق اثر ضداضطرابی آلفاپینن در مقایسه با ديازپام با استفاده از آزمون ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع و نیز سنجش غلظت مالون دی‌آلدئید مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

برای انجام تحقیق، تعداد ۴۰ 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 ۸ تایی 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 ۴ میلی‌گرم / کیلوگرم آلفاپینن [۲۲] (تهیه‌شده از شرکت سیگما آمریکا) و گروه کنترل مثبت دریافت‌کننده ديازپام (10 mg/kg) (تهیه‌شده از شرکت کیمیدارو، تهران، ایران) (که داروها را به‌مدت دو هفته به‌صورت زیرجلدی (IP) دریافت نمودند. شرایط

شدند و به هر یک ۴ میلی‌لیتر بوتانول اضافه شد. بعد از ورتکس کردن، 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 اسپکتروفوتومتری و جذب در معادله خطی منحنی استاندارد میزان غلظت MDA براساس (nmol/g/ wet tissue) مورد ارزیابی قرار گرفت [۲۴].

منحنی استاندارد

در ابتدا باید منحنی استاندارد رسم شود که لازم است محلول استاندارد MDA تهیه گردد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر، طول موج‌ها اندازه‌گیری شود. ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول استاندارد با غلظت‌های ۱۰، ۸، ۶، ۴، 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=۶) را به ۵۰ میکرولیتر محلول هموژن بافت اضافه نمودیم و جذب نوری آن را در طول موج ۴۱۲ نانومتر اندازه‌گیری کردیم (A1). سپس به لوله‌ها ۲۰ میکرولیتر معرف DTNB را اضافه نمود، ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس جذب آن را در همان طول موج اندازه‌گیری کردیم (A2). میزان جذب شاهد (حاوی بافر تریس) نیز در ۴۱۲ نانومتر اندازه‌گیری گردید (B). مقادیر A1، A2 و B به‌دست‌آمده را در رابطه ۱ قرار دادیم و میزان گروه‌های تیولی را محاسبه کردیم [۲۴].

$$\text{میزان گروه تیول (mM)} = (A2 - A1 - B) \times \frac{1}{0.07} \times \frac{0.05}{13.7}$$

اندازه‌گیری سطح فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز تهیه نمونه و نحوه سنجش سطح فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز مطابق با دستورالعمل قیدشده در کیت تجاری پراکسیداز (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 ۲۵°C 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 HSD post hoc Tukey استفاده شد. $P < 0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌داری نتایج در نظر گرفته شد.

نتایج

اثرات آلفاپین 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 ۱۴ روزه دوزهای ۲ و ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم آلفاپین 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 ($P < 0.05$) ($P < 0.01$). درصد تعداد ورود به بازوی باز در گروه دیازپام در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌دار یافت ($P < 0.01$)، ولی بین دو گروه شاهد و کنترل اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. از طرف دیگر تجویز ۱۴ روزه دوزهای ۲ و ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم آلفاپین سبب افزایش معنی‌دار درصد تعداد ورود به بازوی باز نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0.01$).

تأثیر دوزهای مختلف آلفاپین و دیازپام بر مالون دی‌آلدئید هیپوکامپ:

باتوجه به نمودار شماره ۳ آلفاپین با دوزهای (۲ و ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) باعث کاهش معنی‌دار غلظت مالون دی‌آلدئید هیپوکامپ نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0.01$). 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 ($P < 0.01$) (نمودار شماره ۴).

تأثیر دوزهای مختلف آلفاپین و دیازپام بر غلظت تیول هیپوکامپ: مطابق نمودار شماره ۴، آلفاپین با دوزهای (۲ و ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) باعث افزایش معنی‌دار میزان تیول در بافت هیپوکامپ نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0.01$) ($P < 0.05$). 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 آلفاپین و دیازپام بر سطح فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز هیپوکامپ:

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

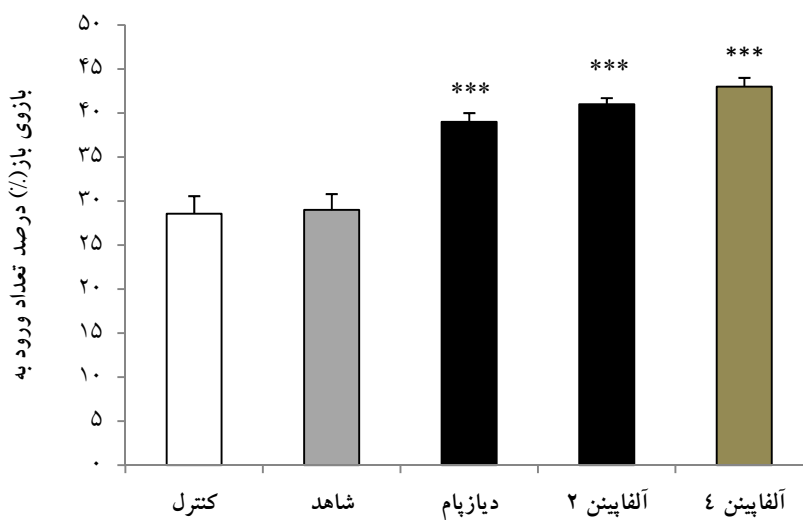
اثر ضداضطرابی آلفاپینن در مقایسه با دیازپام، ...

معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز در بافت هیپوکامپ نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0/001$).

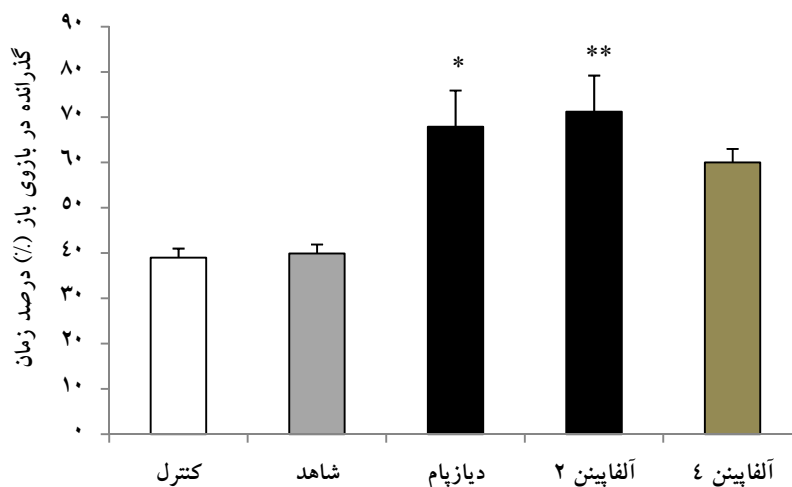
گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافت ($P < 0/05$)؛ ولی بین دو گروه شاهد و کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. همچنین تجویز دوزهای (۲ و ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) آلفاپینن باعث افزایش

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

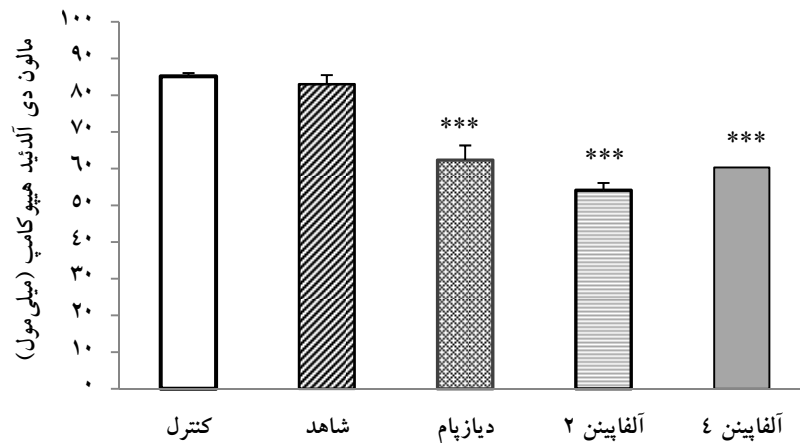
| گروه‌ها | کنترل | شاهد | دیازپام | آلفاپینن ۲ | آلفاپینن ۴ | F | معنی‌داری |
|------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------|-----------|
| مالون دی‌آلدئید | ۰/۹۸۰۴±۸۵/۱۶۷ | ۱/۰۸±۸۳/۶۶۶ | ۴/۵۶±۶۲/۳۳ | ۲/۱۳±۵۴/۱۹۹ | ۳/۲۹۳±۶۰/۳۳۳ | ۲۸/۶۱۴ | ۰/۰۰۹۳ |
| تیول | ۰/۰۰۴±۰/۱۸۸۶ | ۰/۰۰۲±۰/۲۰۷۱ | ۰/۰۰۷۸±۰/۱۸۴۳ | ۰/۰۱۹±۰/۲۶۵۷ | ۰/۰۱۵±۰/۲۴۴۳ | ۹/۱۰۴ | ۰/۰۰۰۱< |
| گلوکاتایون پراکسیداز | ۰/۰۹۹۱۶±۲/۷۵۰ | ۰/۰۵۶۲۷±۲/۵۵۰ | ۰/۳۷۸۶±۱/۹۰۰ | ۰/۰۷۳۰۳±۳/۷۰۰ | ۰/۰۴۹۴۴±۳/۹۳۳ | ۲۱/۵۶۰ | ۰/۰۰۰۱< |
| درصد زمان ورود به بازوی باز | ۲/۶۹۰±۳۹/۰۰۰ | ۲/۵۴۵±۳۹/۹۹۰ | ۲/۳۸۵±۶۰/۸۵۷ | ۸/۶۷۸±۶۷/۹۲۲ | ۸/۱۳۶±۷۱/۲۱۸ | ۷/۳۲۸ | ۰/۰۰۱۱ |
| درصد تعداد ورود به بازوی باز | ۲/۱۰۳±۲۸/۵۷۱ | ۸۳۵±۲۹/۷۱۴ | ۱/۳۹۵±۴۳/۵۷۱ | ۱/۰۵۶±۳۹/۸۵۷ | ۱/۷۱۹۰±۴۱/۴۲۹ | ۲۱/۳۷۶ | ۰/۱۲۲۸ |



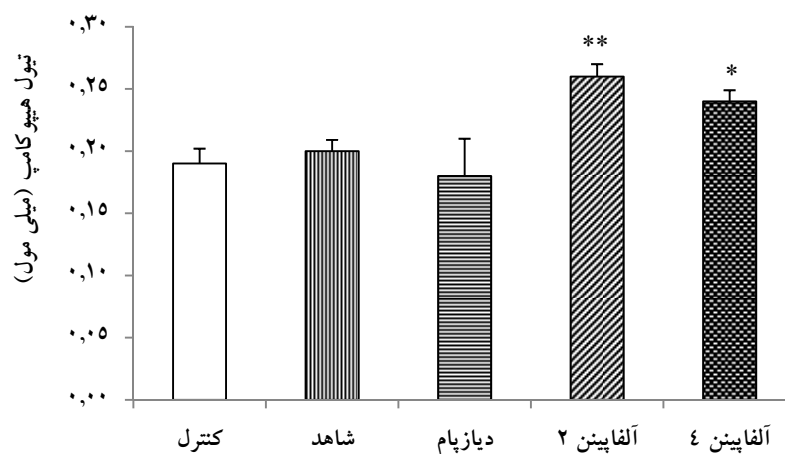
نمودار شماره ۱- مقایسه $\bar{X} \pm SD$ از میانگین درصد تعداد ورود به بازوی باز (OAE) در آزمون ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع بین گروه‌های کنترل، شاهد، گروه دریافت‌کننده دیازپام و گروه‌های دریافت‌کننده آلفاپینن (۲ و ۴ میلی‌گرم / کیلوگرم) $P < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل



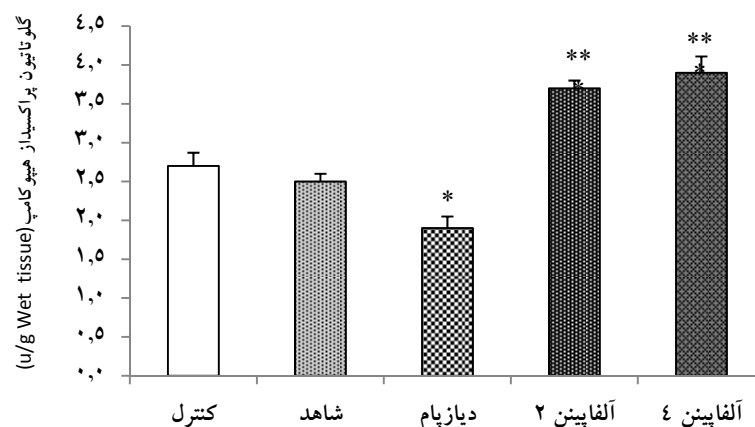
نمودار شماره ۲- مقایسه $\bar{X} \pm SD$ از میانگین درصد زمان گذرانده‌شده در بازوی باز (OAT) در آزمون ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع بین گروه‌های کنترل، شاهد، گروه دریافت‌کننده دیازپام و گروه‌های دریافت‌کننده آلفاپینن (۲ و ۴ میلی‌گرم / کیلوگرم). $P < 0/05$ ، $P < 0/01$ در مقایسه با گروه کنترل



نمودار شماره ۳- مقایسه $\bar{X} \pm SD$ از میانگین غلظت مالون دی‌آلدئید هیپوکامپ بین گروه‌های کنترل، شاهد، گروه دریافت‌کننده دیازپام و گروه‌های دریافت‌کننده آلفاپین (۲ و ۴ میلی‌گرم / کیلوگرم). $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل



نمودار شماره ۴- مقایسه $\bar{X} \pm SD$ از میانگین غلظت تیول هیپوکامپ بین گروه‌های کنترل، شاهد، گروه دریافت‌کننده دیازپام و گروه‌های دریافت‌کننده آلفاپین (۲ و ۴ میلی‌گرم / کیلوگرم). $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل



نمودار شماره ۵- مقایسه $\bar{X} \pm SD$ از میانگین غلظت گلوکوتاتیون پراکسیداز هیپوکامپ بین گروه‌های کنترل، شاهد، گروه دریافت‌کننده دیازپام و گروه‌های دریافت‌کننده آلفاپین (۲ و ۴ میلی‌گرم / کیلوگرم). $P < 0.05$ ، $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل

اضطراب مرتبط می‌باشند و میزان بالای فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتیون 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 بعلاوه‌ای شکل 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 سمی دیازپام را بر روی بافت گونه‌ای از ماهیان مورد بررسی قرار دادند که ایجاد تغییرات در فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گلوکاتیون پراکسیداز نشان داد که دیازپام باعث آسیب اکسیداتیو در بافت‌ها می‌شود. تشکیل رادیکال‌های اکسیژن می‌تواند عامل سمیت 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 ضد افسردگی 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 نوروترانسمیتری دیگر از قبیل گابا، سروتونین و آدنوزین میانجی‌گری شود [۳۲]. از سوی دیگر در این تحقیق آلفاپینن با دوزهای (۲ و ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) باعث کاهش معنی‌دار مالون دی‌آلدئید هیپوکامپ نسبت به گروه کنترل شد. آنتی‌اکسیدان‌ها اثرات ضد اضطرابی 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 ضد اضطرابی دارد که این اثر مشابه دیازپام می‌باشد. همچنین آلفاپینن با فعالیت آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در رفع پاتوزن اضطراب ایفا می‌کند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه صدری سعیدی دانش‌آموخته

هدف از انجام این پژوهش بررسی اثرات ضد اضطرابی 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 ۴ 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 بعلاوه‌ای شکل 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 حالی که 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 [۶]. 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 حالی که 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 در واقع این ماده مؤثره دارای اثرات ضد اضطرابی 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 ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم آلفاپینن موجب کاهش سطح مالون دی‌آلدئید شد. همچنین میزان تیول و فعالیت آنزیم گلوکاتیون پراکسیداز نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. Kuloglu و همکاران فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (مثلاً سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتیون پراکسیداز) را در اریتروسیت‌ها و سطح مالون دی‌آلدئید را در پلاسما به‌عنوان نشانگرهای وضعیت اکسیداتیو (در بیماران مبتلا به اختلال هراس و سواس فکری) در نمونه‌های انسانی مورد مطالعه قرار دادند و ثابت کردند که موارد مذکور با سن انسان مرتبط هستند [۲۶]. در سال ۲۰۰۵ Hovatta و همکاران ارتباط نزدیک بین مکانیسم دفاع آنتی‌اکسیدانی و فنوتیپ مرتبط با اضطراب را در ۶ موش گونه خالط مشخص کردند. آن‌ها پی‌بردند که در مغز، بیان ژن‌های گلوکاتیون ردوکتاز ۱ و گلیوکسلاز ۱ که ژن‌های درگیر در متابولیسم آنتی‌اکسیداتیو هستند، خیلی زیاد با فنوتیپ‌های مربوط با

محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ایذه که در اجرای این مطالعه ما را همراهی کردند، نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد ایذه با کد ۱۵۳۳۰۵۵۷۹۶۲۰۰۴ می باشد و هزینه آن از محل اعتبار هزینه های شخصی ایشان پرداخت شده است. بدین وسیله از حوزه معاونت

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 acetoxyl 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. α -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 α -Pinene and the

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, Tuncok H, Ustundag B. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels in patients with obsessive compulsive 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, Mirtadjadani 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 (α_2 agonist) and idazoxan (α_2 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.