IranJPP
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران

۲ (۱)، ۳۳- ۲٤ بهار ۱۳۹۷

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات ضدافسردگی عصاره شبدر قرمز (*Trifolium pratense* L) در موش سوری

زهرا ربیعی، عرفانه موحدی، محمود رفیعیان کوپایی*، زهرا لری گوئینی

مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد

دریافت: ۲۵ مرداد ۹۵ پذیرش: ۲۲ آبان ۹۵

چکیده

مقدمه: افسردگی یک بیماری رایج و ناتوان‌کننده است که عواقب فردی، اجتماعی و اقتصادی متعددی برای جامعه به همراه دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز بر علایم افسردگی القا شده توسط رزرپین در موش‌های سوری بود.

روش‌ها: ۶۰ موش سوری به صورت تصادفی به ۶ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. موش‌های گروه شاهد نرمال‌سالین (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، موش‌های گروه شاهد منفی رزرپین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و موش‌های گروه شاهد مثبت رزرپین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) + فلوکستین (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. موش‌های گروه مداخله نیز رزرپین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) + عصاره شبدر قرمز (۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) دریافت کردند. جهت سنجش افسردگی آزمون شنای اجباری و جهت سنجش تعادل حرکتی آزمون روتارود استفاده شد. علاوه بر این ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و میزان مالون دی‌آلدهید سرم و مغز تعیین شد.

یافته‌ها: تزریق رزرپین سبب افزایش معنی‌دار زمان بی‌حرکتی در آزمون شنای اجباری شد و تزریق عصاره شبدر قرمز در مقادیر ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور معنی‌داری مدت زمان بی‌حرکتی را کاهش داد. تعادل حرکتی موش‌های دریافت کننده رزرپین تفاوت معنی‌دار با موش‌های شاهد نداشت. تزریق رزرپین سبب افزایش معنی‌دار مالون دی آلدهید مغز و سرم و کاهش معنی‌دار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها شد. عصاره شبدر قرمز به طور معنی‌داری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مغز را افزایش و میزان مالون‌دی آلدهید آن را کاهش داد.

نتیجه‌گیری: عصاره شبدر قرمز قادر است علایم افسردگی در موش سوری را بهبود دهد که به دلیل ترکیبات فعال آن می‌باشد.

واژه های کلیدی: استرس اکسیداتیو، افسردگی، رزرپین، شبدر قرمز، موش سوری

مقدمه

افسردگی یکی از اختلالات روانی ناتوان‌کننده با شیوع بالا در جامعه جهانی می‌باشد. افسردگی حالتی است که بر کیفیت خلق شخص اثر عمیق گذاشته و نحوه ادراک او از خویش و محیط اطرافش را دگرگون می‌سازد. دوری گزیدن از خانواده و دوستان، نداشتن انگیزه، اختلالات میل جنسی، اختلالات خواب (در ۷۵ درصد موارد)، خلق افسرده و عدم احساس لذت از علایم کلیدی افسردگی می‌باشند. در مطالعات جامعه نگر شیوع افسردگی در کشور فرانسه بین ۲۵-۲۰ درصد در زنان و ۱۲-۲ درصد در مردان می‌باشد [۱]. حدود دو سوم افراد افسرده نیز به فکر خودکشی افتاده و ۱۰ الی ۱۵ درصد آن‌ها اقدام به خودکشی می‌کنند [۲]. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که عمده علایم افسردگی در اثر کاهش عملکرد ناقل‌هایی همچون نوراپی‌نفرین، سروتونین، دوپامین، گلوتامات و گابا ایجاد می‌شوند. بنابراین داروهایی هم که سبب

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: rafieian@yahoo.com
وبگاه مجله: http://ijpp.phypha.ir
پست الکترونیکی: ijpp@phypha.ir

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

افزایش این ناقل‌های عصبی شوند اثرات ضدافسردگی نشان می‌دهند. امروزه از نمک‌های لیتیوم، داروهای محرک، ضدافسردگی‌های سه حلقه‌ای، مهارکننده‌های انتخابی سروتونین، مهارکننده‌های مونوآمینواکسیداز جهت درمان افسردگی استفاده می‌شود [۳]. در قسمت های مختلف مغز موش از جمله استریاتوم و کورتکس پری فرونتال تزریق یک تک دوز رزرپین به طور چشمگیری سطح گلوتاتیون دی‌سولفید و نیتریک اکساید را افزایش می دهد و باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در مغز می شود [۴]. از آنجا که داروهای ضد افسردگی دارای اثربخشی نسبی بوده و در همه بیماران، بهبودی کامل حاصل نمی‌کنند و با توجه به عوارض متعدد داروهای ضد افسردگی، تلاش برای دستیابی به داروهای ضد افسردگی جدید با اثربخشی بهتر و عوارض کمتر همچنان ادامه دارد.

شبدر قرمز (*Trifolium pretense* L) به جنس Trifolium و خانواده Fabaceae تعلق داشته و در مناطق معتدل و نیمه گرمسیری هر دو نیمکره شمالی و جنوبی رشد می‌کند. این گیاه در طب سنتی ایران به عنوان عامل خلط‌آور، ضدعفونی کننده، ضد درد، ضد سرفه، تب‌بر، بهبود دهنده ذات الریه و مننژیت، درمان کننده مشکلات پوستی، بیماری‌های ریه و همچنین برخی از اختلالات سیستم عصبی و باروری استفاده می‌شود [۵]. اغلب مطالعات صورت گرفته در رابطه با اثرات درمانی شبدر قرمز بر خواص فیتواستروژنیک ایزوفلاون‌های آن تأکید دارند. ایزوفلاون‌های گیاه از طریق فعل و انفعال با گیرنده‌های استروژن علایم یائسگی را در زنان بهبود می‌دهند. ترکیبات استروژنیک با اتصال به رسپتورهای استروژنیک بتا و با تاثیر بر سیستم‌های دوپامینرژیک، سروتونرژیک و کولینرژیک عملکرد شناختی و خلق و خو را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهند [۶]. علاوه بر اثرات استروژنیک، اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدرگ‌زایی، ضدالتهابی و ضدسرطانی گیاه شبدر قرمز در محیط برون سلولی، سلولی و مدل‌های جانوری نشان داده شده است [۷]. مطالعات نشان داده است که عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز حاوی مقادیر بالایی از ۴ نوع ایزوفلاون استروژنیک شامل Genistein، Daidzein و انواع متیله آن Biochanin A و Formononetin می‌باشد. از جمله دیگر ترکیبات گیاه شامل ساپونین‌ها، فیتواسترول‌ها، الیگوساکارید و اسید فیتیک می‌باشد [۸]. با توجه به اینکه تا کنون مطالعه‌ای در رابطه با اثرات ضدافسردگی عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز صورت نگرفته در مطالعه حاضر به آن پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

جهت تهیه عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز گیاه خشک شده شبدر قرمز از عطاری تهیه شده و پس از آسیاب کردن در الکل ۷۰ درصد قرار داده شد. ارلن محتوی گیاه بر روی گرداننده مغناطیسی با مگنت قرار داده شده و به مدت ۱ هفته در دمای اتاق نگه داشته شد. سپس محتویات آن صاف شده و محلول صاف شده در دمای ۳۷ درجه نگه داشته شد تا آب و الکل آن بخار شود و عصاره هیدروالکلی خشک شود [۹].

تعیین قدرت آنتی اکسیدانی عصاره هیدروالکلی به روش DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

ابتدا هر یک از استوک‌های عصاره و Butylated hydroxytoluene (BHT) با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و DPPH با غلظت ۰/۱ میلی‌مول (در اتانول) تهیه شد. با استفاده از استوک‌های به دست آمده، شش غلظت بین ۱۰۰-۵ میکروگرم شامل ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ برای عصاره و همچنین BHT تهیه شد. مقدار ۲ میلی‌لیتر DPPH به ۲ میلی‌لیتر از هر یک از شش غلظت عصاره یا BHT اضافه و در تاریکی به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. لوله کنترل حاوی ۲ میلی‌لیتر اتانول و ۲ میلی‌لیتر DPPH کنار نمونه‌ها آماده شد. پس از ۱۵ دقیقه، اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر با بلانک اتانول صفر شد و جذب نمونه‌ها قرائت شد. با استفاده از فرمول زیر، درصد مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH محاسبه شد:

$$I = 100 \times \frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}}$$

با رسم نمودار، غلظتی که در آن ۵۰ درصد رادیکالهای

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

DPPH خنثی می‌شوند (IC_{50}) به دست آمد. در نمودار محور Y درصد مهار و X غلظت عصاره بود [۹].

تعیین ترکیبات فنلی: به طور خلاصه به ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره رقیق شده (۰/۰۱ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۶۰ درجه) مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول فولین سیوکالتیو اضافه شده و پس از ۳ تا ۵ دقیقه مقدار ۰/۴ میلی‌لیتر از کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق جذب نمونه‌ها در مقابل بلانک آب مقطر قرائت شد. همزمان با انجام آزمایش رقت‌های مختلف اسید گالیک تهیه و مانند روش فوق آزمایش و منحنی استاندارد تهیه شد. جذب نمونه‌ها با منحنی استاندارد مقایسه و مقدار فنل تام عصاره بر حسب میلی‌گرم در هر گرم عصاره خشک محاسبه شد [۹].

تعیین ترکیبات فلاونوئیدی

به طور خلاصه ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره (۰/۰۱ گرم در ۱۰ میلی لیتر متانول ۶۰ درجه) با ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۲ درصد مخلوط و مقدار ۳ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۵ درصد به آن‌ها اضافه شد. پس از ۴۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در مقابل آب مقطر در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت شد. همزمان با انجام آزمایش رقت‌های مختلف روتین تهیه و مانند روش فوق آزمایش و منحنی استاندارد تهیه شد. جذب نمونه‌ها با منحنی استاندارد مقایسه و مقدار فلاونوئید هر عصاره بر حسب میلی‌گرم در هر گرم عصاره خشک محاسبه شد [۹].

حیوانات آزمایشگاهی و گروه‌بندی

۶۰ موش سوری نر بالغ در محدوده وزنی ۲۵ تا ۳۵ گرم انتخاب شدند. حیوانات در شرایط دمایی مناسب (۲ ± ۲۱ درجه سانتی گراد) و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت خاموشی با دسترسی آزاد به آب و غذای یکسان نگهداری شدند. تمام آزمایشها بر اساس موازین کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد انجام شد. حیوانات به صورت تصادفی به ۶ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. موش‌های گروه شاهد نرمال‌سالین و یک قطره اسیداستیک (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به صورت تزریق داخل صفاقی و به صورت تک دوز دریافت کردند. موش‌های گروه شاهد منفی رزرپین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به صورت تزریق داخل صفاقی و به صورت تک دوز ۱۸ ساعت قبل از تست شنای اجباری دریافت کردند. موش‌های گروه شاهد مثبت رزرپین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و ۱۸ ساعت پس از آن فلوکستین (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به صورت تزریق داخل صفاقی و به صورت تک دوز دریافت کردند. موش‌های گروه مداخله نیز رزرپین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و ۱۸ ساعت پس از آن عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز (۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به صورت تزریق داخل صفاقی و به صورت تک دوز دریافت کردند. آزمون شنای اجباری و تست روتارود یک ساعت پس از ترزیقات عصاره هیدروالکلی و فلوکستین صورت گرفت. پودر رزرپین و فلوکستین از شرکت سیگما خریداری شدند و در نرمال سالین حل شدند و مورد استفاده قرار گرفتند.

آزمون شنای اجباری

این آزمون یکی از معتبرترین و رایج‌ترین آزمون‌های حیوانی برای بررسی افسردگی می‌باشد. بر اساس نظریهٔ درماندگی آقای مارتین سلیگمن در صورتی که حیوان در معرض استرس مداوم قرار گیرد و راه گریزی از آن نداشته باشد، رفته رفته امید به گریز از این شرایط را از دست داده و تحرک و فعالیت خود را متوقف می‌نماید و درمانده و بی‌حرکت می‌گردد. برای اندازه‌گیری زمان بی‌حرکتی مجموعهٔ زمان‌هایی که جانور بی‌حرکت می‌ماند را طی یک محدودهٔ زمانی مشخص ثبت می‌نمایند. افزایش زمان بی‌حرکتی را معادل افسردگی و کاهش آن را به مثابهٔ اثربخشی درمان ضدافسردگی در نظر می‌گیرند. روش آزمایش به این صورت است که ظرف شیشه‌ای به طول ۲۵ سانتیمتر و عرض ۱۲ سانتیمتر با ارتفاع ۱۵ سانتیمتر از آب ۲۵ درجه پر و حیوان از ارتفاع ۲۰ سانتیمتری و به ملایمت درون آب قرار داده می‌شود به طور قراردادی، توقف حرکات دست و پای موش به عنوان بی‌حرکت شدن محسوب می‌گردد. کل آزمایش شنای اجباری ده دقیقه است و دو دقیقه نخست که برای تطابق حیوان با شرایط موجود در نظر گرفته شده است و زمان بی‌حرکتی ثبت نمی‌گردد بلکه زمان بی‌حرکتی برای ۸ دقیقه بعدی اندازه گیری می‌شود. در مطالعه حاضر رزرپین با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ۱۸ ساعت قبل از آزمون شنای اجباری به حیوانات تزریق شد تا در این مدت پایانه‌های عصبی آمینرژیک را از آمین‌ها تخلیه کند. عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز ۱ ساعت قبل از آزمون شنای اجباری به حیوانات داده شد و در پایان آزمایش خون موش‌ها از قلبشان گرفته شده و کل بافت مغزی جدا شد و تست‌های بیوشیمیایی انجام شد [۱۱].

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

آزمون روتارود

قدرت حفظ تعادل و مقاومت حرکتی موش‌های سوری با استفاده از دستگاه روتارود مورد بررسی قرار گرفت. این دستگاه شامل یک گردونه است که سرعت چرخیدن آن ۴۰-۰ rpm می‌باشد. دستگاه روتارود تسمه‌ای دارد که با جا به جا کردن آن روی محل قرار گرفتن تسمه می‌توان سرعت چرخیدن گردونه را تنظیم کرد. در ابتدا جهت آشنایی، حیوانات بر روی میله غلتان روتارود قرار گرفتند و حرکت کردن بر روی آن بر اساس پروتکل اصلی (سرعت چرخیدن ۱۰ rpm با شتاب ۷ rpm^2) به آن‌ها آموزش داده شد و ۳۰ دقیقه بعد از آموزش تست تعادلی انجام شد. در هر یک از گروه‌های آزمایشی، ۱ ساعت بعد از تزریق عصاره، موش‌های صحرایی بر روی گردونه دستگاه روتارود قرار گرفتند. مدت زمانی را که حیوان می‌توانست تعادل خود را حفظ و در مقابل حرکت گردونه مقاومت کند، بعنوان زمان مقاومت حیوان ثبت شد. حداکثر زمان مورد بررسی برای هر حیوان در این آزمون ۳۰۰ ثانیه در نظر گرفته شد [۱۱].

اندازگیری ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم و بافت مغز

برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم و مغز از سه محلول استفاده شد که شامل بافر (۱/۵۵ میلی‌لیتر استات سدیم و ۸ میلی‌لیتر اسید استیک غلیظ که با آب مقطر به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر رسانده شدند)، محلول کلرید آهن (۲۷۰ میلی‌گرم $FeCl_3(6H_2O)$ که با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد) و محلول تری آذین (۴۷ میلی‌گرم تری‌آذین که در ۴۰ میلی‌لیتر HCl ۴۰ میلی‌مولار حل شد). محلول کار با افزودن ۱۰ میلی‌لیتر محلول شماره ۱، ۱ میلی‌لیتر محلول شماره ۲ و ۱ میلی‌لیتر محلول شماره ۳ تهیه شد. ۲۵ میکرولیتر از نمونه سرم یا نمونه هموژنه مغز به ۱/۵ میلی‌لیتر محلول کار اضافه شده و ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷درجه سانتی گراد قرار داده شد، سپس جذب نوری در طول موج ۵۹۳ ثبت شد [۱۰].

اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدئید سرم

به طور خلاصه ۰/۵ گرم تیوباربیتوریک اسید با ۸۰ میلی‌لیتر اسیداستیک ۲۰ درصد مخلوط شده، pH آن توسط NaOH روی ۳/۵ تنظیم شده و حجم آن توسط اسید استیک ۲۰ درصد روی ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه سرم با ۱۰۰ میکرولیتر محلول (Sodium dodecyl sulfate) SDS ۸/۱ درصد و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول کار مخلوط شد. نمونه‌ها و به مدت یک ساعت در بن‌ماری آب جوش قرار گرفته، سپس خنک شده و در دور ۴۰۰۰ rpm سانتریوفوژ شدند. جذب نوری محلول رویی در طول موج ۵۲۳ نانومتر ثبت شد [۱۰].

اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدئید مغز

۱ گرم از بافت مغز در ۲/۵ KCl درصد سرد شده با نسبت ۱۰٪ (وزنی-حجمی) هموژنیزه شد و در دمای ۱ ± ۳۷ درجه در یک شیکر متابولیک به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شد. بعد از یک ساعت انکوباسیون، ۱ میلی‌لیتر تتراکلرواستیک اسید ۵ درصد به همراه ۱ میلی‌لیتر از TBA (تیوباربیتوریک اسید) ۶۷ درصد به آن اضافه شد و بعد از هر مرحله به خوبی مخلوط شد. ترکیب از هر ویال به یک لوله سانتریفیوژ انتقال داده شده و در ۲۰۰۰ ×g برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از آن، محلول رویی به یک لوله دیگری انتقال داده شده و در حمام آب جوش قرار گرفت، بعد از ۱۰ دقیقه لوله‌های آزمایش خنک شده و جذب هر بخش در ۵۳۵ نانومتر اندازه‌گیری شد [۱۰].

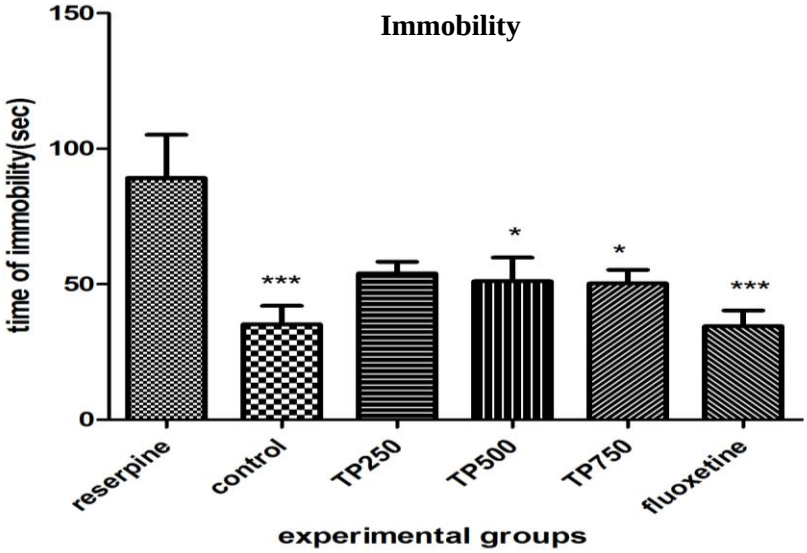
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار $SPSS_{16}$ انجام شد. ابتدا بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف و سپس همگنی واریانس‌ها با استفاده از آزمون Leven صورت پذیرفت. سپس جهت تعیین اختلاف معنی‌دار بین تیمارها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون Tukey استفاده گردید. داده‌ها به صورت میانگین انحراف معیار ثبت شدند و $p < ۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار فرض شد.

نتایج

محتوای ترکیبات فنلی کل عصاره شبدر قرمز ۰/۰۲ ± ۳۱/۸۶ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک و محتوای فلاونوئیدی کل عصاره ۰/۰۹ ± ۳۹/۴۹ میلی‌گرم روتین بر گرم ماده خشک عصاره بود. IC50 عصاره ۰/۰۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

تأثیر تزریق درون صفاقی دوزهای مختلف عصاره شبدر قرمز بر مدت زمان بی‌حرکتی در آزمون شنای

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

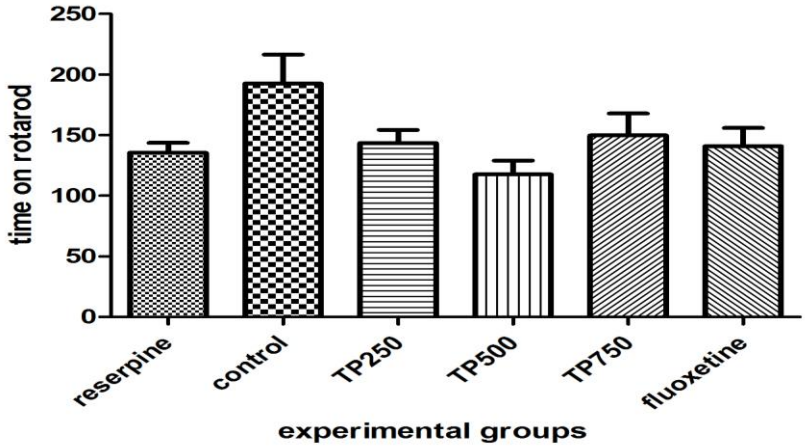


نمودار ۱– اثر دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز (TP) بر مدت زمان بی‌حرکتی در آزمون شنای اجباری. تمام گروهها با گروه رزرپین مقایسه شده اند. * نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p < ۰/۰۵$ و *** نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p < ۰/۰۰۱$ می باشد.

اجباری در نمودار ۱ نشان داده شده است. با توجه به شکل تزریق رزرپین به موش‌ها ۱۸ ساعت قبل از تست شنای اجباری مدت زمان بی‌حرکتی را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش داد ($p < ۰/۰۰۱$). تزریق درون صفاقی عصاره شبدر قرمز در غلظت‌های ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، ۱۸ ساعت پس از تزریق رزرپین و یک ساعت قبل از تست شنای اجباریمدت زمان بی‌حرکتی را به طور معنی‌داری نسبت به گروه دریافت کننده رزپین کاهش داد ($p < ۰/۰۵$). مدت زمان بی‌حرکتی در موش‌های دریافت کننده فلوکستین به طور معنی‌داری کمتر از موش‌های دریافت کننده رزرپین بود ($p < ۰/۰۰۱$).

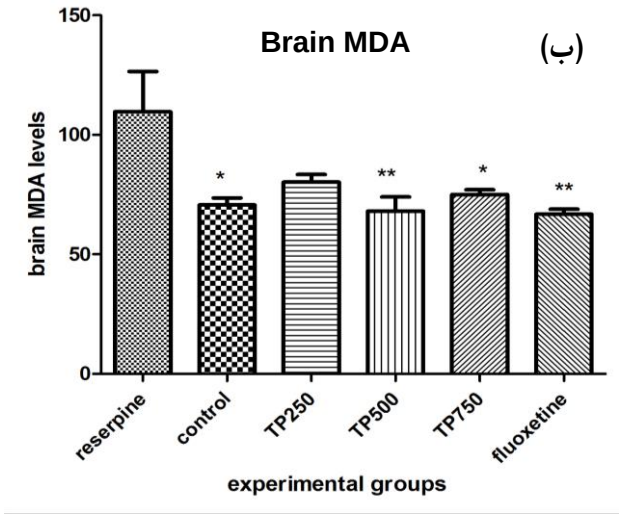
قدرت حفظ تعادل و مقاومت حرکتی موش‌ها با استفاده از دستگاه روتارود مورد بررسی قرار گرفت و نتایج مربوط به این آزمایش در نمودار ۲ نشان داده شده است. تفاوت معنی‌داری در مدت زمان حفظ تعادل و مقاومت در برابر چرخش گردونه بین گروه‌های آزمایشی وجود نداشت.

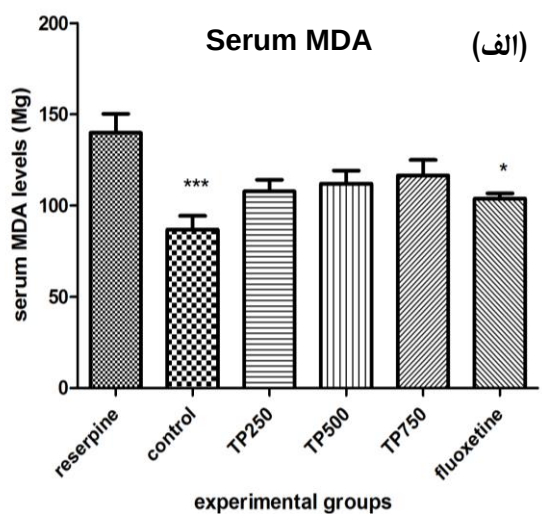
تأثیر عصاره شبدر قرمز در مقادیر مختلف بر سطح مالون‌دی آلدهید سرم و کل بافت مغز در موش‌های سوری در نمودار ۳ آورده شده است. سطح مالون‌دی آلدهید سرم در موش‌های دریافت کننده رزرپین به طور معنی‌داری بیشتر از موش‌های گروه کنترل بود ($p < ۰/۰۰۱$). تزریق درون صفاقی



نمودار ۲– اثر دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز بر قدرت حفظ تعادل و مقاومت حرکتی موش‌ها در آزمون روتارود. تمام گروهها با گروه رزرپین مقایسه شده اند.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

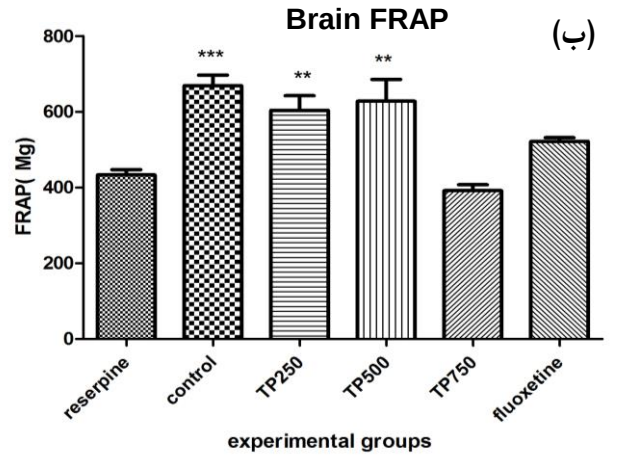


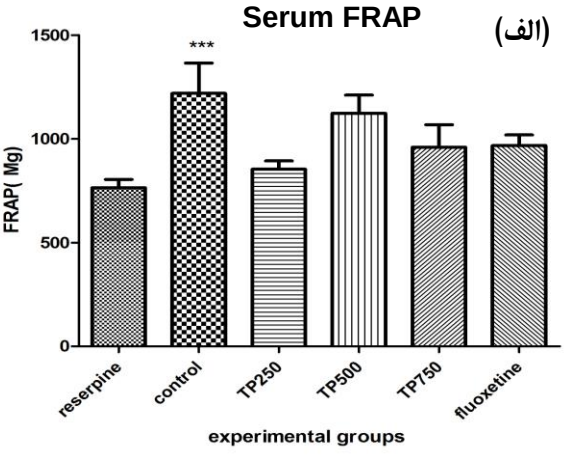


نمودار ۳- اثر دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز بر میزان مالون دی‌الدهید سرم و مالون دی‌آلدهید مغز در موش‌های سوری. تمام گروهها با گروه رزرپین مقایسه شده اند. * نشان دهنده اختلاف معنی‌داردر سطح $p < ۰/۰۵$، ** نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p < ۰/۰۱$ و *** نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p < ۰/۰۰۱$.

عصاره شبدر قرمز مالون دی‌آلدهید سرم را نسبت به گروه رزرپین کاهش داد هرچند این کاهش معنی‌دار نبود. فلوکستین سطح مالون دی‌آلدهید سرم را نسبت به گروه رزرپین به طور معنی‌داری کاهش داد ($p < ۰/۰۵$). با توجه به نمودار ۳ب سطح مالون‌دی آلدهید مغز در موش‌های دریافت کننده رزرپین به طور معنی‌داری بیشتر از موش‌های گروه کنترل بود ($p < ۰/۰۵$) و تزریق عصاره شبدر قرمز در غلظت‌های ۷۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور معنی‌دار سطح آن را کاهش داد ($p < ۰/۰۵$). تزریق فلوکستین نیز سبب کاهش معنی‌دار سطح مالون‌دی آلدهید مغز در مقایسه با گروه رزرپین شد ($p < ۰/۰۵$).

با توجه به نمودار ۴الف تزریق داخل صفاقی رزرپین سبب کاهش معنی‌دار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم در مقایسه با موش‌های گروه کنترل شد ($p < ۰/۰۰۱$). تزریق درون صفاقی عصاره شبدر قرمز در غلظت‌های ۷۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم ۲۵۰را نسبت به گروه رزرپین افزایش داد هر چند این افزایش معنی‌دار نبود. با توجه به نتایج تزریق داخل صفاقی رزرپین سبب کاهش معنی‌دار ظرفیت





نمودار ٤- اثر دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مغز در موش‌های سوری. تمام گروهها با گروه رزرپین مقایسه شده اند . * نشان دهنده اختلاف معنی‌داردر سطح $p < ۰/۰۵$، ** نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p < ۰/۰۱$ و *** نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p < ۰/۰۰۱$.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

آنتی‌اکسیدانی مغز در مقایسه با موش‌های گروه کنترل شد ($p < ۰/۰۰۱$). تزریق درون صفاقی عصاره شبدر قرمز در غلظت‌های و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مغز را نسبت به گروه رزرپین به طور معنی‌داری افزایش داد ($p < ۰/۰۵$). فلوکستین و عصاره شبدر قرمز در غلظت ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تأثیر معنی‌داری بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مغز نداشتند.

بحث

در مطالعه حاضر اثر عصاره شبدر قرمز بر علایم افسردگی القا شده توسط رزرپین در موش‌های سوری مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این اثر عصاره شبدر قرمز بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و میزان مالون‌دی آلدهید سرم و مغز بررسی شد. با توجه به نتایج، تزریق رزرپین به موش‌های سوری سبب القای رفتارهای افسردگی شده و به طور معنی‌داری مدت زمان بی‌حرکتی را در آزمون شنای اجباری افزایش داد که با مطالعات پیشین صورت گرفته در این باره همراستا می‌باشد [۵، ۱۱]. تزریق رزرپین تأثیر معنی‌داری بر قدرت حفظ تعادل و مقاومت حرکتی موش‌های سوری نداشت که نشان دهنده عدم اثرگذاری آن بر قدرت حفظ تعادل و حرکت می‌باشد. در مطالعه حاضر تزریق فلوکستین به موش‌های دریافت کننده رزرپین مدت زمان بی‌حرکتی را به طور معنی‌دار کاهش داد. فلوکستین یکی از داروهای رایج ضدافسردگی می‌باشد و همانطور که در مطالعات پیشین هم گزارش شده تزریق فلوکستین در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ۲۴ ساعت قبل از آزمون شنای اجباری سبب کاهش معنی‌دار علایم افسردگی و مدت زمان بی‌حرکتی می‌شود [۱۲]. با توجه به نتایج مطالعه پیش‌رو تزریق عصاره شبدر قرمز در غلظت‌های ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به موش‌های دریافت کننده رزرپین مدت زمان بی‌حرکتی را در آزمون شنای اجباری به طور معنی‌داری کاهش داد که تأیید کننده اثرات ضدافسردکی عصاره گیاه می‌باشد.

القای افسردگی در بررسی حاضر سبب کاهش معنی‌دار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بافت مغز و سرم و افزایش معنی‌دار مالون دی‌آلدهید آن‌ها شد. درجات مختلفی از آسیب اکسیداتیو و کاهش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به دنبال افسردگی گزارش شده است. در بافت مغزی در قسمت‌های مختلف از جمله استراتیوم و کورتکس پری فرونتال تزریق یک تک دوز رزرپین به طور چشمگیری سطح گلوتاتیون دی‌سولفید و نیتریک اکساید را در مقایسه با گروه کنترل افزایش می دهد و باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در مغز موش صحرایی می‌شود [۴]. در مطالعه صورت گرفته توسط Sarandol و همکاران گزارش شد که سطوح مالون دی‌آلدهید سرم در افراد مبتلا به افسردگی ماژور بیش از سایرین می‌باشد. بعلاوه آن‌ها گزارش کردند که ظرفیت آنتی اکسیدانی تام سرم افراد مبتلا به افسردگی ماژور در مقایسه با افراد سالم به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد [۱۳]. القای افسردگی در موش‌های صحرایی نیز سبب کاهش معنی‌دار فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-PX) مغز، کاهش سطوح گلوتاتیون و ویتامین C کورتکس و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها شد [۱۰]. عصاره شبدر قرمز در بررسی حاضر فعالیت آنتی‌اکسیدانی مغز را به طور معنی‌داری افزایش داده و سبب کاهش معنی‌دار پراکسیداسیون لیپیدها در آن شد، هرچند تأثیر معنی‌داری بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم و میزان مالون دی‌آلدهید آن نداشت. بنابراین می‌توان گفت عصاره شبدر قرمز قادر است با کاهش پارامترهای استرس اکسیداتیو در بافت مغز علایم مربوط به افسردگی را بهبود بخشد.

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که عمده علایم افسردگی در اثر کاهش عملکرد ناقل‌های عصبی مونوآمین شامل سرتونین، نوراپی‌نفرین و دوپامین در مغز ایجاد می‌شود و داروهای ضدافسردگی رایج قادر می باشند با افزایش سطوح این ناقل‌ها علایم افسردگی را بهبود بخشند [۱۴]. چن و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که عصاره شبدر قرمز از آسیب نورون‌های دوپامینرژیک در اثر سمیت لیپوپلی‌ساکارید ممانعت نموده و سطوح ناقل عصبی دوپامین را در مغز افزایش می‌دهد [۱۵]. آن‌ها در مطالعه دیگر خود در سال ۲۰۰۷ بیان کردند که Biochanin A جداسازی شده از شبدر قرمز قادر است از آسیب نورون‌های دوپامینرژیک در اثر لیپوپلی‌ساکارید ممانعت کند و بازجذب دوپامین را در مغز کاهش دهد [۱۶] اثرات ضدافسردگی عصاره شبدر قرمز در مطالعه حاضر ممکن است از طریق عملکرد آن بر سطوح ناقل‌های عصبی مونوآمین باشد، هرچند نیاز است در مطالعات بعدی این اثر اثبات گردد.

اخیرا نقش گلوتامات (ناقل عصبی تحریکی) و گیرنده‌های آن در توسعه افسردگی تأیید شده است. مطالعات نشان می‌دهد که القای افسردگی سبب افزایش سطوح گلوتامات مغز

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

موش‌های صحرایی شده و تیمار موش‌ها توسط آنتاگونیست‌های رسپتورهای NMDA، mGluR1 (Metabotropic glutamate receptor 1) و mGluR5 (Metabotropic glutamate receptor 5) دارای اثرات ضدافسردگی می‌باشد [۱۷]. در مطالعه اوچیوتو و همکاران (۲۰۰۸) گزارش شد که ایزوفلاون‌های جداسازی شده از شبدر قرمز قادرند نورون‌های مغز را در برابر آسیب گلوتامات محافظت کنند [۱۸]. به نظر می‌رسد اثرات ضدافسردگی عصاره شبدر قرمز از طریق سیستم گلوتامینرژیک نیز باشد هرچند نیاز است در مطالعات بعدی این مکانیسم بررسی و تأیید گردد.

مهارکننده‌های مونوآمین اکسیداز (MAOIs) Monoamine Oxidase Inhibitors اولین دسته از داروهای ضدافسردگی هستند. این داروها سطوح نوراپی نفرین، سروتونین و دوپامین مغز را با مهار آنزیمی به نام منوآمین اکسیداز افزایش می‌دهند. امروزه مصرف این داروها به دلیل تداخلات دارویی و عوارض جانبی متعدد محدود شده است. مطالعات نشان داده که تعدادی از گیاهان دارویی از قبیل شبدر قرمز دارای فعالیت مهارکنندگی آنزیم مونوآمین اکسیداز هستند. در مطالعه زرمو و همکاران (۲۰۱۶) اثرات ایزوفلاون‌های شبدر قرمز (Genistein و Daidzein) در مهار آنزیم مونوآمین اکسیداز مورد مطالعه قرار گرفت. آن‌ها گزارش کردند که Daidzein فاقد اثرات مهارکنندگی و Genistein دارای اثرات مهارکنندگی بالقوه می‌باشد [۱۹].

در مطالعات گزارش شده که افراد افسرده دارای سطوح بالاتری از فاکتورهای التهابی همانند اینترکولین-۶ (IL-6) و فاکتور نکروزی توموری آلفا (TNF-α) در مقایسه با افراد سالم هستند و داروهای ضدافسردگی همانند فلوکستین و پاروکستین قادر هستند سیتوکین‌های التهابی در مغز و خون را کاهش دهند [۲۰]. اثرات ضدالتهابی عصاره شبدر قرمز در مطالعه پاکالاپاتی و همکاران (۲۰۰۹) نشان داده شده است [۸]. در مطالعه مولر و همکاران (۲۰۰۸) نیز گزارش شد که ایزوفلاون‌های شبدر قرمز ترشح سیتوکین‌های التهابی اینترکولین-۶ و فاکتور نکروزی توموری آلفا توسط ماکروفاژها را در پاسخ به لیپوپلی‌ساکارید کاهش می‌دهند و سبب افزایش ترشح فاکتور ضدالتهابی اینترکولین-۱۰ و کاهش سنتز نیتریک اکسید و لیپوکسی‌ژناز می‌شوند [۷]. با توجه به این مطالب به نظر می‌رسد بخشی از اثرات ضدافسردگی عصاره در مطالعه حاضر به واسطه کاهش فاکتورهای التهابی باشد. هرچند نیاز است با اندازه‌گیری سطوح فاکتورهای التهابی در موش‌های دریافت کننده عصاره شبدر قرمز در مطالعات بعدی این مکانیسم تأیید گردد.

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز در مدل ایجاد افسردگی توسط رزرپین در موش دارای اثر ضد افسردگی بوده و این اثرات را احتمالاً با واسطه اثرات آنتی‌اکسیدانی اعمال می کند.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

سهم نویسندگان

ز.ر: انجام مطالعه و نگارش مقاله; ع.م: ایده، طراحی، نظارت بر حسن اجرای مطالعه و نگارش مقاله; م.ر.ک: مشاوره; ز.ل.گ: اجرای بخشی از مطالعه.

فهرست منابع

[1] Brown GW, Harris T, Social origins of depression: A study of psychiatric disorder in women: Routledge; 2012.

[2] Pan Y, Kong L, Xia X, Zhang W, Xia Z, Jiang F, Antidepressant-like effect of icariin and its possible mechanism in mice. ***Pharmacol Biochem Behav*** 82 (2005) 686-694.

[3] Belmaker RH, Agam G, Major depressive disorder. ***N Engl J Med*** 358 (2008) 55-68.

[4] Bilska A, Dubiel M, Sokołowska-Jez M, Lorenc-Koci E, Włodek L, Alpha-lipoic acid differently affects the reserpine-induced oxidative stress in the striatum and prefrontal cortex of rat brain. ***Neuroscience*** 146 (2007) 1758-1771.

[5] Sabudak T, Guler N, Trifolium L.–a review on its phytochemical and pharmacological profile. ***Phytother Res*** 23 (2009) 439-446.

[6] Lipovac M, Chedraui P, Gruenhut C, Gocan A, Stammler M, Imhof M, Improvement of postmenopausal depressive and anxiety symptoms after treatment with isoflavones derived from red clover extracts. ***Maturitas*** 65 (2010) 258-261.

[7] Mueller M, Hobiger S, Jungbauer A, Red clover

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

extract: a source for substances that activate peroxisome proliferator-activated receptor α and ameliorate the cytokine secretion profile of lipopolysaccharide-stimulated macrophages. ***Menopause*** 172 (2010) 379-387.

[8] Pakalapati G, Li L, Gretz N, Koch E, Wink M, Influence of red clover (Trifolium pratense) isoflavones on gene and protein expression profiles in liver of ovariectomized rats. ***Phytomedicine*** 16 (2009) 845-855.

[9] Pourmorad F, Hosseinimehr S, Shahabimajd N, Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. ***African J Biotechnol*** 5 (2006) 1142-1145.

[10] Eren İ, Nazıroğlu M, Demirdaş A, Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. ***Neurochem Res*** 32 (2007) 1188-1195.

[11] Herrera-Ruiz M, García-Beltrán Y, Mora S, Díaz-Véliz G, Viana GS, Tortoriello J, et al., Antidepressant and anxiolytic effects of hydroalcoholic extract from Salvia elegans. ***J Ethnopharmacol*** 107 (2006) 53-58.

[12] Page ME, Detke MJ, Dalvi A, Kirby LG, Lucki I, Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. ***Psychopharmacology*** 147 (1999) 162-167.

[13] Sarandol A, Sarandol E, Eker SS, Erdinc S, Vatansever E, Kirli S, Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative–antioxidative systems. ***Human Psychopharmacol*** 22 (2007) 67-73.

[14] Nutt DJ, Relationship of neurotransmitters to the symptoms of major depressive disorder. ***J Clin Psychiatry*** 69 (2008) 4-7.

[15] Chen H-Q, Wang X-J, Jin Z-Y, Xu X-M, Zhao J-W, Xie Z-J, Protective effect of isoflavones from Trifolium pratense on dopaminergic neurons. ***Neurosci Res*** 62 (2008) 123-130.

[16] Chen H-Q, Jin Z-Y, Li G-H, Biochanin A protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced damage through inhibition of microglia activation and proinflammatory factors generation. ***Neurosci Lett*** 417 (2007) 112-117.

[17] Paul IA, Skolnick P, Glutamate and depression. ***Ann New York Acad Sci*** 1003 (2003) 250-272.

[18] Occhiuto F, Zangla G, Samperi S, Palumbo DR, Pino A, De Pasquale R, et al., The phytoestrogenic isoflavones from Trifolium pratense L. (Red clover) protects human cortical neurons from glutamate toxicity. ***Phytomedicine*** 15 (2008) 676-682.

[19] Zarmouh NO, Messeha SS, Elshami FM, Soliman KF, Evaluation of the isoflavone genistein as reversible human monoamine oxidase-A and-B inhibitor. ***Evid Based Complement Alternat Med*** 2 (2016) 1-11.

[20] Hwang J, Zheng LT, Ock J, Lee MG, Kim S-H, Lee H-W, et al., Inhibition of glial inflammatory activation and neurotoxicity by tricyclic antidepressants. ***Neuropharmacology*** 55 (2008) 826-834.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

Research paper

Antidepressant effects of *Trifolium pratense* hydroalcholic extract in mice

Zahra Rabiei, Erfaneh Movahedi, Mahmoud Rafieian-Kopaei*, Zahra Lorigooini

Medical Plants Research Center, Shahrekord university of Medical Science, Shahrekord, Iran

Received: 25 August 2015 2016 Accepted: 12 November 2016

Abstract

Introduction: Depression is a common and debilitating disease that has many economic, social, and personal consequences for the society. The aim of this study was to evaluate the effect of red clover extract on depression induced by reserpine in mice.

Methods: Sixty male mice were randomly divided into 6 groups of 10 mice in each. Control mice received normal saline (1 mg/kg, i.p.), negative control received reserpine (5 mg/kg, i.p.) and positive control received reserpine (5mg/kg, i.p.) + fluoxetine (20 mg/kg, i.p.). Intervention groups received reserpine (5 mg/kg, i.p.) and red clover extract at doses of 250, 500, 750 mg/kg. Depression was tested using forced swimming test and motor coordination was evaluated using Rotarod. Serum and brain antioxidant capacity and MDA level were also determined.

Results: Reserpine significantly increased immobility time in the forced swimming test. Red clover extract at doses of 500 and 750 mg/kg significantly reduced the duration of immobilization. There was no significant difference in motor coordination between control and reserpine-treated mice. Reserpine injection significantly decreased brain and serum antioxidant capacity and increased their malondialdehyde level. Red clover extract significantly increased brain antioxidant capacity and reduced the malondialdehyde level.

Conclusion: Red clover extract has antidepressant effects due to its components.

Keywords: Depression, Mice, Oxidative stress, Red clover, Reserpine,

Please cite this article as follows:
Rabiei Z, Movahedi E, Rafieian-Kopaei M, Lorigooini Z, Antidepressant effects of *Trifolium pratense* hydroalcholic extract in mice. ***Iran J Physiol Pharmacol*** 1 (2018) 24-33.

*Corresponding author e-mail: rafieian@yahoo.com
Available online at: http://ijpp.phypha.ir
E-mail: ijpp@phypha.ir

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]