

Anti-inflammatory and Anti-nociceptive Activities of Hydroalcoholic Extract of *Rosa canina* L. Fruit in Male Mice

Parandin R*, Mohammadi L

Department of Biology, Faculty of Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran

* *Corresponding author*. Tel: +982123322238, Fax: +982122455429, E-mail: rahmatparandin@pnu.ac.ir

Received: Feb 19, 2019 Accepted: Jun 20, 2019

ABSTRACT

Background & objectives: In recent years, regarding the side effects of chemical drugs, the use of medicinal plants has increased due to their low side effects, low costs and effective compounds. The aim of this study was to investigate the anti-inflammatory, anti-nociceptive, and anti-pyretic effects of hydroalcoholic extract of *Rosa canina* L. fruit in male mice.

Methods: In this experimental study, 120 male BALB/c mice weighing 23-30 g were used. In each test, the mice were divided into 5 groups (in each group, n=6), including control group, positive control and three experimental groups treated intraperitoneally with hydroalcoholic extract of *Rosa canina* L. fruit at doses of 100, 200 and 400 mg/kg respectively. The anti-inflammatory and antipyretic activities were measured using xylene-induced ear edema and brewer's yeast-induced pyrexia tests, respectively. In addition, the antinociceptive activity was measured using the abdominal constrictions induced by acetic acid and formalin tests. The data were analyzed by SPSS statistical software and One Way ANOVA test. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Results: 200 ($p < 0.05$) and 400 mg/kg ($p < 0.001$) doses of extract reduced significantly inflammation. Doses of 100 ($p < 0.05$), 200 ($p < 0.01$) and 400 ($p < 0.001$) significantly reduced pain in the abdominal constriction test and dose of 400 mg/kg ($p < 0.05$) decreased the chronic pain in formalin test. Extract treatment did not reduce fever in any of the existing doses.

Conclusions: The findings of this study suggest that *Rosa canina* L. fruit has anti-inflammatory and visceral analgesic activity, which may be due to its antioxidant potential.

Keywords: *Rosa canina* L.; Pain; Inflammation; Mice; Fever

بررسی اثرات ضدالتهاب و ضد درد عصاره هیدروالکلی میوه نسترن وحشی (*Rosa canina* L.) در موش‌های آزمایشگاهی نر

رحمت اله پرندین*، لیلی محمدی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۱۲۳۳۲۲۲۳۸. فاکس: ۰۲۱۲۲۴۵۵۴۲۹. پست الکترونیک: rahmatparandin@pnu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: در سال‌های اخیر با توجه به اثرات جانبی داروهای شیمیایی، مصرف گیاهان دارویی به دلیل کم بودن عوارض جانبی، ارزان بودن و ترکیبات مؤثره افزایش یافته است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر ضد التهاب، ضد درد و ضد تب عصاره هیدروالکلی میوه نسترن وحشی در موش سوری نر بود.

روش کار: در این مطالعه تجربی از ۱۲۰ سر موش سوری نر نژاد BALB/c با وزن ۳۰-۲۳ گرم استفاده شد. در هر تست، موش‌ها به ۵ گروه ۶ تایی شامل گروه‌های شاهد، کنترل مثبت و سه گروه تحت درمان با عصاره هیدروالکلی میوه نسترن وحشی به ترتیب با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با روش داخل صفاقی تقسیم شدند. برای بررسی اثرات ضدالتهاب و ضدتب عصاره به ترتیب از تست گزیلن به عنوان القاکننده ادم گوش و تست مخمر آب‌جو به عنوان القاکننده تب استفاده شد. برای ارزیابی درد از تست‌های کشش شکمی با اسیداستیک و آزمون فرمالین استفاده شد. داده‌ها با نرم افزار SPSS و آنالیز واریانس یک طرفه در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ ($p < 0.05$) و ۴۰۰ ($p < 0.001$) عصاره به طور معنی‌داری التهاب را کاهش دادند. دوزهای ۱۰۰ ($p < 0.05$)، ۲۰۰ ($p < 0.01$) و ۴۰۰ ($p < 0.001$) عصاره، درد را در آزمون کشش شکمی و دوز ۴۰۰ ($p < 0.05$) مرحله درد مزمن در آزمون فرمالین را به طور معنی‌داری کاهش دادند. تزریق عصاره در هیچکدام از دوزهای موجود موجب کاهش تب نشد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که میوه نسترن کوهی دارای فعالیت‌های ضد التهاب و ضد درد احشایی است که احتمالاً این اثرات بواسطه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: نسترن کوهی، درد، التهاب، موش سوری، تب

دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۳۰ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۳۰

مقدمه

ادامه یابد، می‌تواند مخرب بوده و موجب آسیب بافتی شود [۱]. التهاب نوعی مکانیسم ایمنی بالقوه است که با فعالسازی مسیر آراشیدونیک اسید و سنتز پروستاگلاندین‌ها موجب تحریک اعصاب و افزایش نفوذپذیری شریانی می‌شود [۲]. پروستاگلاندین‌ها با کمک آنزیم‌های سیکلواکسیژناز (COX) ۱ و ۲ از

درد و التهاب بخشی از پاسخ‌های پیچیده بدن به محرک‌های مضر و آسیب‌رسان می‌باشد. التهاب یک مکانیسم دفاعی بدن است که می‌تواند به از بین بردن علل اولیه آسیب سلولی کمک کرده و شروع به تعمیر بافت‌های آسیب دیده نماید. با این حال، اگر التهاب

ترکیبات فعال زیستی شامل ویتامین‌های مختلف به‌ویژه ویتامین سی، ترکیبات فنولی، کاروتنوئیدها، ترین‌ها، اسیدهای چرب اشباع نشده و املاح معدنی می‌باشد [۹-۱۱]. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی میوه نسترن وحشی بر التهاب، درد و تب در موش‌های آزمایشگاهی بود.

روش کار

تهیه عصاره

در این مطالعه، ابتدا میوه نسترن وحشی در فصل بهار جمع‌آوری شد و در دمای ۲۷-۲۳ درجه سانتی‌گراد در سایه خشک گردید. سپس نمونه خشک شده با کمک آسیاب به پودر تبدیل شد. به ۶۰ گرم از پودر حاصل، ۳۰۰ سی‌سی اتانل ۸۰ درصد اضافه شد و برای ۷۲ ساعت نگهداری شد. عصاره حاصل پس از صاف‌شدن با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۱، خشک شده و از پودر حاصل با استفاده از نرمال سالین بعنوان حلال جهت تهیه دوزهای مورد نظر استفاده شد [۱۲].

حیوانات و گروه‌بندی

در این مطالعه تجربی- مداخله‌ای از تعداد ۱۲۰ سر موش سوری جنس نر از نژاد BALB/c با وزن تقریبی ۲۳ تا ۳۰ گرم استفاده شد. جهت سازگاری با محیط، یک هفته قبل از شروع آزمایش، موش‌ها در اتاق حیوانات نگهداری شدند. موش‌ها در دمای ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دسترسی آزادانه به آب شهری و غذای یکسان نگهداری شدند. کلیه مراحل پروتکل آزمایش مطابق دستورالعمل‌های اخلاقی انجمن بین‌المللی مطالعه درد [۱۳] و آیین نامه کمیته اخلاق زیستی دانشگاه پیام نور و با تایید کمیته اخلاق با کد IR.PNU.REC.1398.011 انجام گرفت.

آزمون بررسی التهاب: روش گزین

در این آزمون تعداد ۳۰ سر موش به‌طور تصادفی به ۵ گروه ۶ تایی زیر تقسیم شدند: ۱- گروه شاهد

آرآشیدونیک اسید تولید می‌شوند که نقش مهمی در ایجاد درد و التهاب دارند. در حال حاضر در مراکز درمانی جهت کاهش درد و التهاب، اغلب از داروهای متداول شیمیایی مانند استروئیدها و داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی (NSAIDs) استفاده می‌گردد [۱-۳]. با این حال، اغلب داروهای شیمیایی در درمان درد و التهاب دارای عوارض فیزیولوژیکی جانبی متعددی هستند. به عنوان مثال NSAIDs که با مهار COX کاربرد بسیار زیادی در کاهش درد، التهاب و تب دارند، دارای اثرات سوئی بر دستگاه‌های گوارش، کلیوی و قلبی عروقی هستند [۱،۴]. امروزه در تحقیقات زیادی به استفاده از داروهای گیاهی جهت درمان بسیاری از بیماری‌ها و اختلالات بدنی توصیه شده است که عوارض داروهای شیمیایی را ندارند. تعدادی از این گیاهان نتایج امیدوارکننده‌ای را در پیشگیری یا درمان بیماری‌های متخلف به‌ویژه در کاهش درد، التهاب و تب نشان داده‌اند [۵،۶].

نسترن وحشی (*Rosa canina* L.) یا کوهی با نام انگلیسی Dog rose درختچه‌ای چند ساله تا ارتفاع ۳ متر است که به جنس رز و خانواده رزاسه تعلق دارد. این درختچه در بخش‌هایی از اروپا، آسیا، خاورمیانه و شمال آمریکا رویش دارد. در ایران ۱۱ گونه از جنس رز وجود دارد که نسترن وحشی یکی از این گونه‌ها است و عمدتاً در کوه‌های زاگرس در غرب و شمال غرب ایران و همین‌طور در برخی کوه‌های البرز نیز یافت می‌شود. نسترن وحشی در طب سنتی ارزش بالایی داشته و در منابع مختلف به میوه یا حتی دانه میوه این گیاه به عنوان دارو اشاره شده است [۷-۱۰]. اثرات درمانی نسترن وحشی به‌طور سنتی به علت فعالیت‌های بیولوژیکی آن نظیر آنتی‌اکسیدان، ضدالتهابی، ضدآرتروز، ضد درد، ضد دیابتی، ضد سرطان، ضد میکروبی، ضد زخم و التیام‌دهندگی پوست در طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها گزارش شده است. آنالیزهای شیمیایی انجام شده نشان داده‌اند که میوه این درختچه حاوی مقادیر قابل توجهی از

(کنترل منفی، نرمال سالین)؛ ۲- گروه کنترل مثبت (دگزامتازون، ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم)؛ و گروه‌های ۳، ۴ و ۵ گروه‌های تجربی بودند که به صورت تک‌دوز و با روش داخل صفاقی به ترتیب با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از عصاره تیمار شدند. ۱۵ دقیقه بعد از تیمارهای فوق مقدار ۰/۰۳ میلی لیتر گزیلن (مرک آلمان) در سطح جلویی گوش راست حیوان تزریق شد. دو ساعت بعد حیوانات با استفاده از اتر آسان کشی شده و بلافاصله گوش‌های حیوان با قیچی جدا شدند. سپس با کمک چوب‌پنبه سوراخ کن، برش‌های ۷ میلی متری به صورت دایره‌ای از هر دو گوش موش در موقعیت مشابه جدا شده و وزن گردید. اختلاف وزن برش‌های دو گوش راست و چپ نشان دهنده میزان التهاب بود [۱۴، ۱۵].

آزمون‌های بررسی درد

آزمون کشش شکمی: روش اسپیداستیک

در این آزمون، تعداد ۳۰ سر موش به طور تصادفی به ۵ گروه زیر تقسیم شدند: ۱- گروه شاهد (کنترل منفی، نرمال سالین)؛ ۲- گروه کنترل مثبت (ایندومتاسین، ۵ میلی گرم بر کیلوگرم) و گروه‌های ۳، ۴ و ۵ گروه‌های تجربی بودند که به صورت تک‌دوز و با روش داخل صفاقی به ترتیب با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از عصاره تیمار شدند. ۳۰ دقیقه بعد از تیمارهای فوق مقدار ۰/۱ میلی لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن هر حیوان اسپیداستیک ۰/۱ با روش داخل صفاقی تزریق شد. پس از گذشت ۵ دقیقه، به مدت ۳۰ دقیقه، تعداد کشش‌های شکمی بدن موش (تعداد کشیدگی‌ها یا رایت‌هایی که با انقباضات شکمی و کشیدن حداقل یکی از اندام‌های خلفی مشخص می‌شد)، ناشی از درد مورد شمارش قرار گرفت [۱۵، ۱۶].

آزمون فرمالین

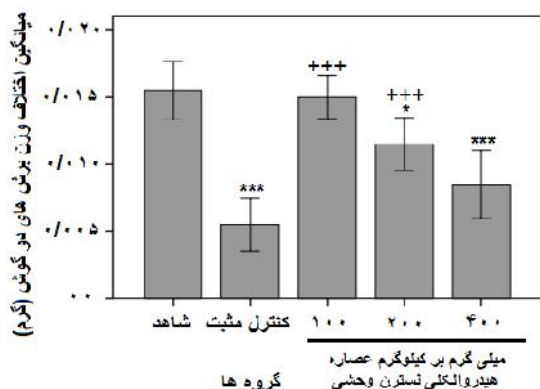
در این آزمون جهت سازگاری با شرایط آزمایش ابتدا یک ساعت قبل از انجام آزمایش موش‌ها به داخل جعبه مخصوص تست فرمالین منتقل شدند. این جعبه

در ابعاد ۳۰ سانتی متر ساخته شده بود و به منظور مشاهده بهتر حرکات موش‌ها، آینه‌ای با زاویه ۴۵ درجه زیر آن و روبروی فرد مشاهده‌کننده تعبیه شد. سپس تعداد ۳۰ موش به طور تصادفی به ۵ گروه زیر تقسیم شدند: ۱- گروه شاهد (کنترل منفی، نرمال سالین)؛ ۲- گروه کنترل مثبت (مورفین، ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و گروه‌های ۳، ۴ و ۵ گروه‌های تجربی بودند که به صورت تک‌دوز و با روش داخل صفاقی به ترتیب با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از عصاره تیمار شدند و مجدداً در داخل جعبه قرار گرفتند. نیم ساعت پس از تزریق داروهای فوق، ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵٪ به زیر پوست کف پای راست حیوان به صورت زیرجلدی تزریق و موش به داخل جعبه بازگردانده شد. حرکات موش در مدت ۶۰ دقیقه بررسی و به صورت زیر نمره دهی و ثبت گردید: عدد صفر، زمانی که موش هنگام راه رفتن تعادل کامل داشت و وزن بدن بر روی هر دو پا بود. عدد ۱ زمانی بود که موش وزن بدن خود را بر روی پای تزریق شده با فرمالین تحمل نمی‌کرد. عدد ۲ وقتی بود که موش پنجه تزریقی شده را بلند می‌کرد و هیچ تماسی با کف جعبه نداشت. عدد ۳ برای زمانی بود که موش پنجه تزریق شده را لیس می‌زد، می‌جوید یا به شدت تکان می‌داد. در طی ۶۰ دقیقه، میانگین نمرات در فاصله زمانی بین ۰ تا ۵ دقیقه ابتدایی به‌عنوان فاز اول درد (درد حاد) و میانگین دقایق ۱۵ تا ۶۰ به‌عنوان فاز دوم (درد مزمن) در نظر گرفته شد [۱۵، ۱۷].

آزمون بررسی تب

در این روش قبل از تزریق داروها دمای ناحیه رکتال حیوانات با کمک دماسنج دیجیتال اندازه‌گیری و ثبت گردید. در مرحله بعد از تزریق درون صفاقی ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن از سوسپانسیون مخمر آبجو ۱۰٪ (تاپ لور، فرانسه) جهت القای تب در موش‌ها استفاده شد. افزایش حداقل ۰/۵ درجه سانتی‌گراد دمای رکتال نشانه القای تب در موش‌ها

هیدروالکلی میوه نسترن وحشی مشابه با ایندومتاسین در گروه کنترل مثبت ($p < 0.001$) به طور معناداری در مقایسه با گروه شاهد موجب کاهش تعداد کشیدگی‌ها شدند. تعداد کشیدگی‌ها به طور معناداری در گروه‌های ۱۰۰ ($p < 0.001$)، ۲۰۰ ($p < 0.001$) و ۴۰۰ ($p < 0.01$) میلی گرم بر کیلوگرم از عصاره در مقایسه با گروه کنترل مثبت افزایش نشان داد (نمودار ۲).



نمودار ۱. اثر دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی نسترن وحشی و دگزاتازون بر میزان التهاب گوش موش‌های کوچک آزمایشگاهی در آزمون گزین

میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی نسترن وحشی

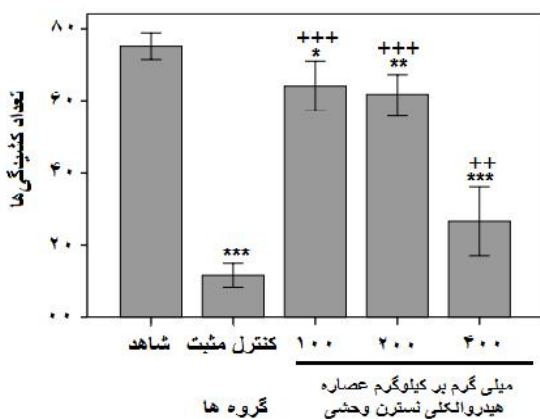
گروه‌ها

نمودار ۱. اثر دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی نسترن وحشی و دگزاتازون بر میزان التهاب گوش موش‌های کوچک آزمایشگاهی در آزمون گزین

میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی نسترن وحشی

گروه‌ها

نشان دهنده اختلاف معنادار بین گروه‌های مختلف با گروه شاهد. +++ ($p < 0.001$) نشان دهنده اختلاف معنادار بین گروه‌های مختلف عصاره با گروه کنترل مثبت



نمودار ۲. اثر دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی نسترن وحشی و ایندومتاسین بر تعداد کشیدگی‌های موش‌های کوچک آزمایشگاهی در آزمون کشش شکمی

میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی نسترن وحشی

گروه‌ها

نمودار ۲. اثر دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی نسترن وحشی و ایندومتاسین بر تعداد کشیدگی‌های موش‌های کوچک آزمایشگاهی در آزمون کشش شکمی

میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی نسترن وحشی

گروه‌ها

نشان دهنده اختلاف معنادار بین گروه‌های مختلف عصاره با گروه کنترل مثبت. ++ ($p < 0.01$) و +++ ($p < 0.001$) نشان دهنده اختلاف معنادار بین گروه‌های مختلف عصاره با گروه کنترل مثبت.

بود. سپس کلیه موش‌های تبار به‌طور تصادفی مطابق زیر به ۵ گروه زیر تقسیم شدند: ۱- گروه شاهد (کنترل منفی، نرمال سالین)؛ ۲- گروه کنترل مثبت (پاراستامول، ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و گروه‌های ۳، ۴ و ۵ گروه‌های تجربی بودند که به‌صورت تک‌دوز و با روش داخل صفاقی به ترتیب با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از عصاره تیمار شدند. سپس دمای رکتال در ۸، ۱۲ و ۱۶ ساعت پس از تزریقات فوق اندازه‌گیری و ثبت شد [۱۸].

روش‌های آماری

داده‌های حاصل در نرم‌افزار SPSS-20 و با کمک آنالیز واریانس یک‌طرفه تجزیه و تحلیل شدند. میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون تک‌میلی توکی با سطح احتمال $p < 0.05$ مقایسه شدند.

یافته‌ها

نتایج بررسی التهاب: آزمون گزین

مطابق نتایج حاصل از آزمون گزین استفاده از دوزهای ۲۰۰ ($p < 0.05$) و ۴۰۰ ($p < 0.001$) میلی گرم بر کیلوگرم از عصاره هیدروالکلی میوه نسترن وحشی مشابه با دگزاتازون در گروه کنترل مثبت ($p < 0.001$) به‌طور معناداری در مقایسه با گروه شاهد موجب کاهش التهاب شدند. استفاده از دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از عصاره تفاوت معناداری را با گروه شاهد نشان نداد. میزان التهاب به‌طور معناداری ($p < 0.001$) در گروه‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از عصاره در مقایسه با گروه کنترل مثبت افزایش نشان داد ولی تفاوت معناداری بین گروه ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره با گروه کنترل مثبت مشاهده نشد (نمودار ۱).

نتایج بررسی درد: آزمون کشش شکمی

مطابق نتایج حاصل از آزمون استیک اسید استفاده از دوزهای ۱۰۰ ($p < 0.05$)، ۲۰۰ ($p < 0.01$) و ۴۰۰ ($p < 0.001$) میلی گرم بر کیلوگرم از عصاره

نتایج بررسی درد: آزمون فرمالین

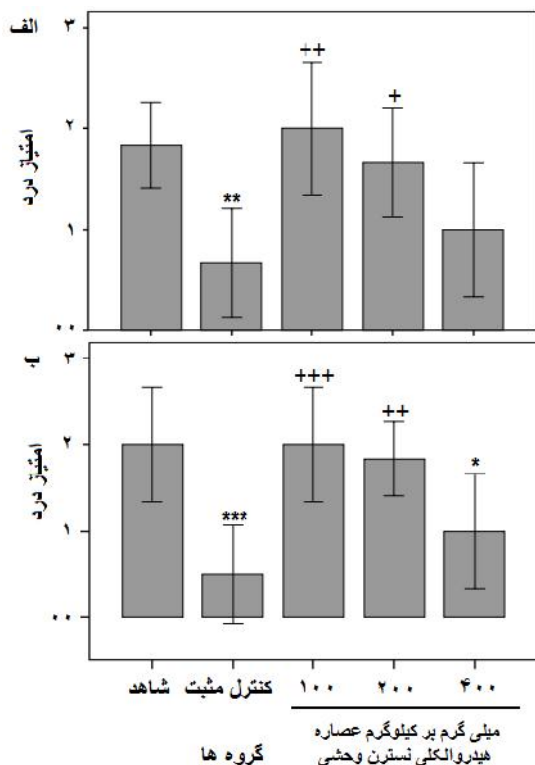
مطابق نتایج حاصل از آزمون فرمالین در مرحله اول (درد حاد) استفاده از دوز ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از عصاره هیدروالکلی میوه نسترن وحشی در مقایسه با گروه شاهد موجب کاهش درد شد اما این کاهش معنادار نبود. میزان درد در این مرحله به طور معناداری در گروه‌های ۱۰۰ ($p < 0.01$) و ۲۰۰ ($p < 0.05$) میلی گرم بر کیلوگرم از عصاره در مقایسه با گروه کنترل مثبت نشان داد ولی تفاوت معناداری بین گروه ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره با گروه کنترل مثبت مشاهده نشد (نمودار ۳-الف).

مطابق نتایج حاصل از آزمون فرمالین در مرحله دوم (درد مزمن) استفاده از دوز ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از عصاره هیدروالکلی میوه نسترن وحشی مشابه با مورفین در گروه کنترل مثبت ($p < 0.001$) در مقایسه با گروه شاهد موجب کاهش درد شدند. میزان درد در این مرحله به طور معناداری در گروه‌های ۱۰۰ ($p < 0.001$) و ۲۰۰ ($p < 0.01$) میلی گرم بر کیلوگرم از عصاره در مقایسه با گروه کنترل مثبت مشاهده نشد (نمودار ۳-ب).

نتایج بررسی تب: آزمون مخمر آب‌جو

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، پاراستامول در ساعات مختلف پس از القای تب موجب کاهش معنادار ($p < 0.001$) تب در مقایسه با گروه

شاهد شد. مقایسه گروه‌های مختلف عصاره هیدروالکلی میوه نسترن وحشی با گروه شاهد تغییرات معناداری را در دمای رکتال نشان نداد.



نمودار ۳. اثر دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی نسترن وحشی و مورفین بر نمره درد حاد (الف) و درد مزمن (ب) موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر در آزمون فرمالین
 ؛ ($p < 0.05$)، ($p < 0.01$) و ($p < 0.001$)؛ نشان‌دهنده اختلاف معنادار بین گروه‌های مختلف با گروه شاهد.
 + ($p < 0.05$)، ++ ($p < 0.01$) و +++ ($p < 0.001$) نشان‌دهنده اختلاف معنادار بین گروه‌های مختلف عصاره با گروه کنترل مثبت.

جدول ۱. تاثیر دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی میوه نسترن وحشی و پاراستامول بر دمای بدن در ساعات مختلف

| گروه‌ها | دمای عادی | ۸ ساعت | ۱۲ ساعت | ۱۶ ساعت |
|------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| کنترل | ۳۷/۰۷±۰/۰۵ | ۳۹/۰۵±۰/۰۷ | ۳۸/۷۸±۰/۰۹ | ۳۸/۶۱±۰/۰۸ |
| پاراستامول | ۳۷/۰۳±۰/۰۲ | ۳۷/۸۵±۰/۰۶* | ۳۷/۴۵±۰/۰۸* | ۳۷/۳۲±۰/۰۵* |
| عصاره ۱۰۰ | ۳۷/۰۱±۰/۰۳ | ۳۸/۸۵±۰/۱۱ | ۳۸/۸۱±۰/۱۰ | ۳۸/۵۷±۰/۰۹ |
| عصاره ۲۰۰ | ۳۷/۰۱±۰/۰۳ | ۳۸/۷۶±۰/۱۵ | ۳۸/۷۰±۰/۰۹ | ۳۸/۵۸±۰/۱۰ |
| عصاره ۴۰۰ | ۳۷/۰۳±۰/۰۲ | ۳۸/۶۴±۰/۱۵ | ۳۸/۴۳±۰/۱۴ | ۳۸/۳۳±۰/۱۳ |

دمای عادی (دمای قبل از القای تب) و سایر دماها ساعات پس از تزریق داروها است. کلیه دماها برحسب درجه سانتی‌گراد نوشته شده‌اند.
 * ($p < 0.001$) نشان‌دهنده اختلاف معنادار بین گروه‌های مختلف با گروه شاهد

بحث

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که تزریق داخل صفاقی عصاره هیدروالکلی میوه نسترن وحشی دارای پتانسیل ضدالتهابی و ضد درد می باشد، با این حال این ترکیب اثر ضدتب از خود نشان نداد.

در این مطالعه جهت سنجش اثرات ضدالتهابی از آزمون گزین استفاده شد که یک روش پر کاربرد در بررسی التهاب در جوندگان آزمایشگاهی است. در این روش، تزریق گزین موجب گشاد شدن عروق و ایجاد ادم شدید در پوست می گردد [۱۹]. در آزمون گزین، دوزهای ۲۰۰ و به ویژه ۴۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم از عصاره واجد اثرات ضدالتهابی بودند که اثر دوز بالاتر با دگزامتازون قابل مقایسه بود. همینطور در این مطالعه جهت سنجش اثرات ضد درد از آزمون اسید استیک به عنوان مدل استاندارد ایجاد درد احشایی [۲۰] و آزمون فرمالین جهت سنجش درد حاد و مزمن استفاده شد. در اینجا عصاره نسترن وحشی تنها در دوز ۴۰۰ باعث کاهش درد مزمن شد و اثری بر کاهش درد حاد ناشی از فرمالین نداشت، ولی عصاره در تمامی دوزهای مورد استفاده موجب کاهش درد احشایی ناشی از اسیداستیک شد. این اثرات ممکن است به دلیل مهار مسیرهای آنزیمی از جمله سیکلواکسیژناز، لیبواکسیژناز، نیتریک اکساید و متابولیسم ماده واسطه التهاب یعنی آراشیدونیک اسید باشد [۲۱]. علت اثرات مشاهده شده در مطالعه حاضر را می توان در ترکیبات زیستی و فعال موجود در میوه نسترن وحشی جستجو نمود.

ترکیبات فعال در قسمت هایی از گیاه از جمله میوه، برگ ها، ساقه و ریشه وجود دارد ولی بیشترین تجمع این ترکیبات در میوه گیاه گزارش شده است. از مهم ترین این ترکیبات می توان به ویتامین سی، پلی فنول ها، کاروتنوئیدها، تری ترپن ها و اسیدهای چرب غیر اشباع اشاره کرد. از فراوان ترین این

ترکیبات ویتامین سی می باشد که اهمیت آن بدلیل خواص آنتی اکسیدانی، سنتز کلاژن و چند مسیر آنزیمی دیگر شناخته شده است. میوه نسترن وحشی به داشتن ویتامین سی فراوان و خواص آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی مشهور است. گزارش شده که میزان ویتامین سی میوه نسترن کوهی حدود ۱۰ برابر بیشتر از پرتقال می باشد [۲۲، ۲۳]. برخی مطالعات قبلی اثرات ضد درد و ضدالتهابی ویتامین سی را نشان داده اند [۲۴-۲۶]. در مطالعات اپیدمیولوژیکی یک ارتباط بین درد نخاعی و کمبود ویتامین سی نشان داده شده است [۲۷]. در مطالعات کلینیکی نیز به کمبود ویتامین سی بعنوان یک دلیل درد عضلانی اشاره شده است [۲۸]. همینطور در برخی مطالعات کلینیکی دیگر نیز ارتباط بین افزایش ویتامین سی در بدن با اثرات ضد درد نشان داده شده است [۲۹]. یکی از اعمال مهم ویتامین سی در بدن این است که بعنوان کوفاکتور برخی متالو آنزیم های تنظیمی و بیوسنتزی عمل می کند. این اعمال شامل سنتز نوروترانسمیترها از جمله کاتکول آمین ها و هورمون های پپتیدی و تنظیم کوفاکتورهای رونویسی و تنظیم ژن است [۲۵]. اخیراً نشان داده شده است که ویتامین سی در بیوسنتز پپتیدهای اپیوئیدی نقش دارد که احتمالاً این روش یکی از مکانیسم های ضد درد ویتامین سی می باشد [۲۵]. نقش ویتامین سی در بیوسنتز نوروترانسمیترها از جمله دوپامین و سروتونین نشان داده شده است و به دخالت هر دوی این نوروترانسمیترها در داشتن اثرات ضد درد نیز اشاره شده است [۲۶]. همینطور در برخی مطالعات کاهش فاکتورهای پیش التهابی از جمله IL-6، TNF- و پروتئین واکنشی سی (CRP) بدنبال استفاده از مخلوط آب میوه های غنی از ویتامین سی [۳۰] و همینطور در حیواناتی که با غذای غنی از ویتامین سی [۳۱] تغذیه شده اند نشان داده شده است. یکی از محدودیت های مطالعه فعلی عدم سنجش فاکتورهای التهابی و

میانجی‌های دخیل در فیزیولوژی درد می‌باشد که پیشنهاد می‌گردد در مطالعات بعدی مورد بررسی قرار گیرند.

نسترن کوهی یک منبع غنی از پلی‌فنول‌های مختلف از جمله تانن‌ها، فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک و آنتوسیانین می‌باشد [۹]. پلی‌فنول‌ها متابولیت‌های ثانویه تولید شده در گیاهان هستند که ترکیبات آنتی‌اکسیدانت بسیار قوی بوده و خواص ضددردی و ضدالتهابی آنها به وفور نشان داده شده است [۳۲]. مطالعات نشان داده‌اند که فلاونوئیدها با بلوکه کردن آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز موجب کاهش سنتز NO می‌شوند. مطالعات حیوانی نشان داده‌اند که به دنبال تزریق فرمالین سنتز NO افزایش می‌یابد، در نتیجه با کاهش NO فعالیت ضددردی زیاد می‌شود [۳۳]. برخی مطالعات دیگر نشان داده‌اند که فلاونوئیدها قادر به مهار فعالیت گیرنده‌های NMDA و در نتیجه کاهش کلسیم درون سلولی شده که به موجب آن فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز و فسفولیپاز A2 کاهش یافته و در نهایت موجب کاهش NO و پروستاگلندین‌ها (ترکیبات لیپیدی و از مهم‌ترین واسطه‌های التهاب) می‌شوند [۳۴،۳۵]. همین‌طور فلاونوئیدها قادر به مهار آنزیم COX می‌باشند [۳۶]. آنزیم COX از مهم‌ترین آنزیم‌های ساختاری در تولید میانجی‌های التهابی بدن یا پروستونوئیدها شامل پروستاگلندین، پروستاگلین و ترومبوکسان بوده و مهار فارماکولوژیک COX می‌تواند نشانه‌های التهاب و درد را از بین ببرد. عملکرد مهم داروهای ضدالتهاب غیر استروئیدی مهار این آنزیم است. بنابراین با توجه به اینکه التهاب به‌عنوان یک پدیده محیطی مولد درد در آزمون فرمالین می‌باشد، احتمالاً بخشی از اثر ضددردی این عصاره ممکن است ناشی از اثرات ضدالتهابی آن نیز باشد [۳۷-۳۴]. مطالعات نشان داده‌اند که مهم‌ترین فلاونوئیدهای نسترن وحشی که همگی خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند، شامل کوئرستین، الاژیک اسید، ۴-هیدروکسی بنزوئیک اسید، کفتاریک

اسید، کلوروژنیک اسید، کافئیک اسید، کوماریک اسید، فرولیک اسید، کاتچین، روتین و... هستند [۹]. خاصیت ضددردی و ضدالتهابی اغلب این فلاونوئیدها در مطالعات قبلی نشان داده شده است. به عنوان مثال در مطالعات قبلی اثرات کوئرستین [۳۸]، الاژیک اسید [۳۸]، بنزوئیک اسید [۳۹]، کلوروژنیک اسید [۴۰، ۴۱] و روتین [۴۲] در این رابطه نشان داده شده است.

از دیگر ترکیبات مهم موجود در نسترن وحشی کاروتنوئیدها می‌باشد که رنگدانه‌های طبیعی نارنجی و قرمز موجود در گیاهان هستند و به عنوان پیش ساز ویتامین آ محسوب می‌شوند و نقش زیادی در سلامتی انسان دارند. کاروتنوئیدها ترکیباتی هستند که علاوه بر ارزش تغذیه‌ای و سلامتی به علت پیوندهای دوگانه کونژوگه در ساختارشان نقش آنتی‌اکسیداسیون قابل توجهی دارند و همین‌طور از فوتواکسیداسیون لیپیدها جلوگیری می‌کنند [۲۳]. پژوهش‌های انجام شده وجود مقادیر قابل توجهی از حضور کاروتنوئیدها از جمله لیکوپن و بتاکاروتن را در نسترن کوهی گزارش کرده‌اند [۹] که اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضددردی و ضدالتهابی آنها گزارش شده است [۴۳]. همین‌طور دانه‌های میوه نسترن کوهی غنی از اسیدهای چرب اشباع نشده هستند که از مهم‌ترین آنها می‌توان به لینولئیک اسید و آلفا لینولیک اسید اشاره کرد [۲۲]. مطالعات قبلی نشان داده است که این اسیدهای چرب اشباع نشده دارای اثرات ضددردی و ضدالتهابی می‌باشند [۴۴، ۴۵].

در این مطالعه عصاره موجود اثرات کاهش تب را از خود نشان نداد. در اینجا جهت القای تب از مخمر آبجو استفاده شد که منجر به افزایش فعالیت متابولیسم آراشیدونیک اسید شده و با افزایش تولید پروستاگلندین E₂ منجر به افزایش دمای بدن می‌شود. دیوید و همکاران نشان دادند که مهار آبشار متابولیسم آراشیدونیک اسید به‌ویژه از راه مهار لیپواکسیژناز و در نتیجه کاهش پروستاگلندین E₂ در هیپوتالاموس موجب کاهش دمای بدن بدنال تب

می‌شود [۴۶]. اغلب داروهای آنتی پیرتیک (ضدتب) شیمیایی از راه مهار بیان COX-2 بوسیله مهار سنتز پروستاگلاندین E2 در جهت کاهش دمای بدن عمل می‌کنند. سیتوکین‌های تب‌زا (پیروژنیک) از قبیل اینترلوکین ۶ و TNF آنهایی هستند که بطور مستقیم بر هیپوتالاموس اثر گذاشته و موجب بروز تب می‌شوند، اما سیتوکین اینترلوکین ۱۰ دارای خواص ضدالتهابی از جمله سرکوب درد می‌باشد [۴۷، ۴۸]. به نظر می‌رسد که این عصاره با دوزهای مورد استفاده اثری بر مرکز تنظیم دمای بدن در هیپوتالاموس و تغییر دمای بدن و تب ندارد که نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

نتیجه گیری

در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی میوه نسترن وحشی در مدل ایجاد درد و التهاب در موش‌های کوچک آزمایشگاهی دارای اثرات

ضددردی و ضدالتهاب می‌باشد که این اثرات را احتمالاً بواسطه ترکیبات غنی آنتی‌اکسیدانی موجود در آن از جمله ویتامین سی، ترکیبات پلی فنولی، کاروتنوئیدها و اسیدهای چرب اشباع نشده از خود نشان می‌دهد که نیاز به تحقیقات بیشتر دارند. مطالعه حاضر ارزش زیادی در مطالعات ضددردی و ضدالتهابی دارد و ممکن است با مطالعات آینده از میوه نسترن کوهی به عنوان یک مکمل غذایی و دارویی در جهت درمان نشانه‌های درد و التهاب و اختلالات مشابه استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی می‌باشد که با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه پیام نور (شماره ۱۶/۷/۱۳۹۵) انجام شده است، بدینوسیله از تمام افرادی که در انجام این تحقیق همکاری نموده‌اند کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

- 1- Rafieian-Kopaei M, Shakiba A, Sedighi M, Bahmani M. The analgesic and anti-inflammatory activity of *Linum usitatissimum* in Balb/c mice. J Evid Based Complement Altern Med. 2017 Oct; 22(4):892-96.
- 2- Patton HD, Fuchs AF, Hills AF, Scher AM, Steiner R. Textbook of Physiology. 21nd ed. Philadelphia: PA: W. B. Saunders, 2003.
- 3- Koo KL, Ammit AJ, Tran VH, Duke CC, Roufogalis BD. Gingerols and related analogues inhibit arachidonic acid induced human platelet serotonin release and aggregation. Thromb Res. 2001 Sep; 103(5): 387-97.
- 4- Harirforoosh S, Asghar W, Jamali F. Adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. J Pharm Pharm Sci. 2013; 16(5): 821-47.
- 5- Adebayo SA, Dzoyem JP, Shai LJ, Eloff JN. The anti-inflammatory and antioxidant activity of 25 plant species used traditionally to treat pain in southern African. BMC Complement. Altern Med. 2015 May; 15: 159.
- 6- Azab A, Nassar A, Azab AN. Anti-Inflammatory Activity of Natural Products. Molecules. 2016 Oct; 21(10): E1321.
- 7- Ognyanov M, Remoroza C, Schols HA, Georgiev Y, Kratchanova M, Kratchanov C. Isolation and structure elucidation of pectic polysaccharide from rose hip fruits (*Rosa canina* L). Carbohydr Polym. 2016 Oct; 151: 803-11.
- 8- Koobaz P, Jafarkhani Kermani M, Hosseini ZS, Khatamsaz M. Inter-and intraspecific morphological variation of four Iranian rose species. Floriculture Ornamental Biotech. 2009; 3: 45-50.
- 9- Koczka N, Stefanovits-Bányai É, Ombódi A. Total polyphenol content and antioxidant capacity of rosehips of some *Rosa* species. Medicines (Basel). 2018 Sep; 5(3): 84.

- 10- Fallahi E, Farhadi J, Abdollahpour F, ghasemi M, Kakaie Z, Karimi Z. Antioxidant and cytotoxic effects of aqueous and alcoholic extracts of *Rose Canina* fruit on the cell line U937. *yafte* 2015, 17(3): 15-25. [Full text in Persian]
- 11- Roman I, St nil A, St nil S. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Rosa canina* L. biotypes from spontaneous flora of Transylvania. *Chem Cent J*. 2013 Apr; 7(1):73.
- 12- Ilchizadeh Kavgani A, Eidi M, Ghahramani R, Sasaninejad Z, Ahmarinezhad Z. Antidiabetic effect of *Rosa canina* L. fruit in alloxan induced diabetic male rats. *Qom Univ Med Sci J* 2015; 9(5):23-34. [Full text in Persian]
- 13- Goldberg DS, McGee SJ. Pain as a global public health priority. *BMC public health*. 2011 Oct; 11: 770.
- 14- Asadi Balsin Sharif Abadi S, Nasri S, Amin Gh, Bidaran S. Anti-inflammatory and Antinociceptive effects of hydroalcoholic extract of *Nepeta menthoides* on pain in aerial parts in male mice. *J Jahrom Univ Med Sci*. 2013; 11(3): 1-9. [Full text in Persian]
- 15- Asgari Neamatian M, Yaghmaei P, Mohammadi S. Assessment of the antinociceptive, antiinflammatory and acute toxicity effects of *Ducrosia anethifolia* essential oil in mice. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences (SJKU)*. 2017; 22 (3):74-84. [Full text in Persian]
- 16- Mohammadi S, Zarei M, Mahmoodi M, Zarei MM, Nematian MA. In vivo antinociceptive effects of Persian Shallot (*Allium hirtifolium*) in male rat. *Avicenna J Neuro Psych Physiology*. 2015 Feb; 2(1): 25-29.
- 17- Zarei M, Mohammadi S, Abolhassani N, Nematian MA. The antinociceptive effects of hydroalcoholic extract of *Bryonia dioica* in male rats. *Avicenna Journal of Neuro Psych Physiology*. 2015; 2: e25761.
- 18- Muhammad N, Saeed M, Khan H. Antipyretic, analgesic and anti-inflammatory activity of *Viola betonicifolia* whole plant. *BMC Complement Altern Med*. 2012 May; 12: 59.
- 19- Karimi H, Monajemi R, Amjad L. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Artemisia Deserti Krasch* (Extract in Rats). *IJSBAR*. 2014; 3(1):1-6.
- 20- Ghasemi M, Golmakani E, Ahmadzadeh sani T, Kamali H, Akaberi A, Bibak B. Study of methanol extract of *Cyprus Longus* on visceral pain by writhing test in mice. *J North Khorasan Univ Med Sci*. 2014; 6 (1): 133-138. [Full text in Persian]
- 21- Rotelli EA, Guardia T, Juarez OA, Rocha NE, Pelzer LE. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacol Res*. 2003 Dec; 48(6): 601-6.
- 22- Mohammadi K, Zeinalzadeh N, Safaralizadeh R. An overview on the molecular basis of anticancer effects of *Rosa canina* bioactive ingredients. *Clin Exc*. 2017; 6(2): 49-62. [Full text in Persian]
- 23- Zaringhalami S, Khataei M. Determination of some chemical composition of Dog rose fruit and seed. *JFST*; 2017. 64(14): 1-8.
- 24- Ellulu MS, Rahmat A, Patimah I, Khaza'ai H, Abed Y. Effect of vitamin C on inflammation and metabolic markers in hypertensive and/or diabetic obese adults: a randomized controlled trial. *Drug Des Devel Ther*. 2015 Jul; 9: 3405-12.
- 25- Carr AC, McCall C. The role of vitamin C in the treatment of pain: new insights. *J Transl Med*. 2017 Apr; 15(1): 77.
- 26- Zeraati F, Araghchian M, Esna-ashari F, Fazlian MM, Torabian S, Fallah N, et al. Antinociceptive properties of ascorbic acid: evidence for the mechanism of action. *Avicenna J Med Biochem*. 2014 Sep; 2(1): e18572.
- 27- Dionne CE, Laurin D, Desrosiers T, Abdous B, Le Sage N, Frenette J, et al. Serum vitamin C and spinal pain: a nationwide study. *Pain*. 2016 Nov; 157(11):2527-35.
- 28- Fain O. Musculoskeletal manifestations of scurvy. *Joint Bone Spine*. 2005 Mar; 72(2): 124-8.
- 29- Cohen SP, Mao J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ*. 2014 Feb; 348: f7656.
- 30- Peluso I, Villano DV, Roberts SA, Cesqui E, Raguzzini A, Borges G, et al. Consumption of mixed fruit-juice drink and vitamin C reduces postprandial stress induced by a high fat meal in healthy overweight subjects. *Curr Pharm Des*. 2014; 20(6): 1020-24.

- 31- Jang IS, Ko YH, Moon YS, Sohn SH. Effects of vitamin C or E on the pro-inflammatory cytokines, Heat Shock protein 70 and antioxidant status in broiler chicks under summer conditions. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2014 May; 27(5): 749–56.
- 32- Balasubramanian S, Zhu L, Eckert R. Apigenine inhibition of involucrin gene expression is associated with a specific reduction in phosphorylation of protein kinas C Tyr 311. *J Biol Chem.* 2006 Nov; 281(47): 36162-72.
- 33- Ozek M, Uresin Y, Gungor M. Comparison of the effects of specific and nonspecific inhibition of nitric oxide synthase on morphine analgesia, tolerance and dependence in mice. *Life Sci.* 2003 mar; 72(17): 1943-51.
- 34- Rang HO, Date MM, Ritter JM. Text book of pharmacology, 3rd ed. New York: Churchill & Livingstone, 1999: 148-76, 609-33.
- 35- Davidson EM, Coggeshal RE, Carlton SM. Peripheral NMDA and non-NMDA glutamate receptors contribute to nociceptive behaviors in the rat formalin test. *Neuroreport.* 1997 Mar; 8(4): 641-6.
- 36- Kupeli E, Tatli LL, Akdemir ZS, Yesilada E. Estimation of antinociceptive and antiinflammatory activity *Geranium pretense* subsp. finitimum and its phenolic compounds. *J Ethno pharmacology.* 2007; 114(2): 234-40.
- 37- Elisabetsky E, Amador TA, Albuquerque RR, Nunes DS, Carvalho Ado C. Analgesic activity of psychotria colorata (Wild ex R.&S.) Muell, Argalkaloids. *J Ethnopharmacol.* 1995 Oct; 48(2): 77-83.
- 38- Moharram FA, Al-Gendy AA, El-Shenawy SM, Ibrahim BM, Zarka MA. Phenolic profile, anti-inflammatory, antinociceptive, anti-ulcerogenic and hepatoprotective activities of *Pimenta racemosa* leaves. *BMC Complement Altern Med.* 2018 Jul; 18(1): 208.
- 39- Gamaniel K, Samuel BB, Kapu DS, Samson A, Wagner H, Okogun JI, Wambebe C. Anti-sickling, analgesic and anti-inflammatory properties of 3,5-dimethoxy-4-hydroxy benzoic acid and 2,3,4-trihydroxyacetophenone. *Phytomedicine.* 2000 Apr; 7(2):105-10.
- 40- Bagdas D, Ozboluk HY, Cinkilic N, Gurun MS. Antinociceptive effect of chlorogenic acid in rats with painful diabetic neuropathy. *J Med Food.* 2014 Jun; 17(6): 730-2.
- 41- Azza EM, Yildez B, Mahmoud K, Abdullatif M. Chlorogenic acid as potential anti-inflammatory analgesic agent: an investigation of the possible role of nitrogen-based radicals in rats. *IJPTS.* 2011 Dec; 1: 24–33.
- 42- Ganeshpurkar A, Saluja AK. The pharmacological potential of Rutin. *Saudi Pharm J.* 2017 Feb; 25(2):149–64.
- 43- Hernández-Ortega M, Ortiz-Moreno A, Hernández-Navarro MD, Chamorro-Cevallos G, Dorantes-Alvarez L, Necochea-Mondragón H. Antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory effects of carotenoids extracted from dried pepper (*Capsicum annum L.*). *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012: 524019.
- 44- Mota AS, de Lima AB, Albuquerque TL, Silveira TS, do Nascimento JL, da Silva JK, et al. Antinociceptive activity and toxicity evaluation of the fatty oil from *Plukenetia polyadenia Mull.* Arg. (Euphorbiaceae). *Molecules.* 2015 Apr; 20(5): 7925-39.
- 45- Wagner K, Vito S, Inceoglu B, Hammock BD. The role of long chain fatty acids and their epoxide metabolites in nociceptive signaling. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2014 Oct; 113-115: 2–12.
- 46- David M, Aronoff MD, Eric G, Neilson MD. Antipyretics: Mechanisms of Action and Clinical Use in Fever Suppression. *AJM.* 2001 Oct; 111(4): 304- 15.
- 47- Cheng L, Ming-liang H, Lars B. Is COX-2 a perpetrator or a protector? Selective COX-2 inhibitors remain controversial. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2005 Aug; 26 (8): 926-33.
- 48- Luheshi GN. Cytokines and fever: mechanisms and sites of action. *Ann NY Acad Sci.* 1998 Sep; 856: 83–89.