



## Effects of hydroalcoholic extract of *Melilotus officinalis* L. on chronic immobility stress-induced depression in adult male rats

Hamed Hoseinzadeh<sup>1</sup>, Mehran Arabi<sup>2</sup> and Saeid Valipour Chahardahcheric<sup>3\*</sup>

1- M.Sc. graduated, Department of Animal Sciences, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

2- Department of Animal Sciences, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

3\*- Corresponding author, Department of Biology, Izeh Branch, Islamic Azad University, Izeh, Iran, E-mail: saeidvch51@gmail.com

Received: August 2023

Revised: October 2023

Accepted: December 2023

### Abstract

**Background and objectives:** Stress affects the body's systems and can lead to many disorders, including depression. To deal with stress and depression, the use of medicinal plants that have fewer side effects than chemical drugs has attracted the attention of researchers. *Melilotus officinalis* L. contains compounds such as coumarin, flavonoids, triterpene, saponin, and volatile oils with anti-inflammatory and antioxidant effects. The present study investigated the effect of the hydroalcoholic extract of the *M. officinalis* plant on depression caused by chronic immobility stress in adult male rats.

**Methodology:** In this experimental study, 48 male Wistar rats weighing 250-300 grams were used. The rats were randomly divided into 6 groups of 8 (n=8) including control (intact), sham (under chronic immobility stress and receiving normal saline), experimental groups (under chronic immobility stress and subjected to doses 25, 50, and 100 mg.kg<sup>-1</sup> of *M. officinalis* extract), and the positive control group (under chronic immobility stress and receiving fluoxetine). To establish an animal model of chronic immobility stress, the rats were placed in the restraint device daily for 2 hours, for 3 weeks. Injections were made intraperitoneally (IP), 30 minutes before stress induction. The depression model was evaluated by the Forced Swimming Test (FST) and motor activity by the Open Field Test (OFT). Then with deep anesthesia in the animals, blood was taken from the heart. By separating the serum, the amount of corticosterone in the rats' blood was evaluated and measured using special kits and the ELISA method.

**Results:** The results of this research showed that in the sham group, the duration of immobility in the FST increased significantly in comparison to the control group (P<0.001). In the experimental groups, a high dose of *M. officinalis* extract led to a significant increase in the duration of immobility in the FST (P<0.01). However, the lower doses of the extract led to a significant decrease in immobility duration compared to the sham group (P<0.001) (P<0.01). The fluoxetine-receiving group also showed a significant reduction in immobility duration compared to the sham group (P<0.01). Lower doses of *M. officinalis* extract caused a significant increase in blood corticosterone relative to the sham group (P<0.001). Administration of fluoxetine also caused a significant increase in corticosterone levels in the blood in comparison to the sham group (P<0.001). In the OFT, the number of crossing lines in the sham group showed a significant increase relative to the control group (P<0.01) in the experimental groups, a high dose of *M. officinalis* extract resulted in a significant decrease in the number of times the



rats crossed the lines in comparison to the sham group ( $P < 0.01$ ).

**Conclusion:** Phytochemical studies have shown some active substances, such as quercetin and phenolic acids in *M. officinalis*, which have antioxidant and antidepressant activity by inhibiting monoamine oxidase and increasing dopamine and serotonin. Therefore, due to active biological molecules, *M. officinalis* can play a vital role in preventing depression. The results have also shown that *M. officinalis* extract, particularly in lower doses, has better antidepressant effects in rats under chronic stress.

**Keywords:** Chronic stress, depression, animal model, *Melilotus officinalis* L.

## مصرف عصاره هیدروالکلی یونجه زرد (*Melilotus officinalis* L.) بر بهبود بخشی افسردگی ناشی از استرس مزمن بی حرکتی در موش بزرگ آزمایشگاهی نر بالغ

حامد حسین زاده<sup>۱</sup>، مهران عربی<sup>۲</sup> و سعید ولی پور چهارده چریک<sup>۳\*</sup>

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد ایذه، دانشگاه آزاد اسلامی، ایذه، ایران، پست الکترونیک: saeidvch51@gmail.com

تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۲

تاریخ اصلاح نهایی: مهر ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۲

### چکیده

سابقه و هدف: استرس، دستگاه‌های بدن را تحت تأثیر قرار داده و موجب بروز اختلالات متعددی از جمله افسردگی می‌شود. برای مقابله با استرس و افسردگی ناشی از آن، استفاده از گیاهان دارویی که نسبت به داروهای شیمیایی عوارض جانبی کمتری دارند مورد توجه محققان قرار گرفته است. گیاه یونجه زرد (*Melilotus officinalis* L.) دارای ترکیباتی مانند کومارین، فلاونوئیدها، تری‌ترین، ساپونین و روغن‌های فرار با اثرهای ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. این مطالعه به منظور بررسی اثر عصاره هیدروالکلی گیاه یونجه زرد بر افسردگی ناشی از استرس مزمن بی‌حرکتی در موش بزرگ آزمایشگاهی نر بالغ، طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از ۴۸ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم استفاده گردید که به صورت تصادفی در ۶ گروه ۸ تایی ( $n=8$ ) شامل: کنترل (دست نخورده)، شاهد (تحت استرس مزمن بی‌حرکتی و دریافت‌کننده نرمال سالین)، گروه‌های تجربی (تحت استرس مزمن بی‌حرکتی و دریافت دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره یونجه زرد) و گروه کنترل مثبت (تحت استرس مزمن بی‌حرکتی و دریافت‌کننده فلوکستین) تقسیم‌بندی شدند. برای ایجاد مدل حیوانی استرس مزمن بی‌حرکتی، حیوانات روزانه در دستگاه محدودکننده به مدت ۲ ساعت، برای ۳ هفته قرار گرفتند. تزریقات به صورت درون صفاقی (IP) ۳۰ دقیقه قبل از القای استرس انجام شد. افسردگی با آزمون شنای اجباری و میزان فعالیت حرکتی توسط آزمون‌های میدان باز ارزیابی گردید و بعد با بیهوشی عمیق در حیوانات، خون‌گیری از قلب انجام و با جداسازی سرم، میزان کورتیکوسترون خون با استفاده از کیت‌های اختصاصی و به روش الیزا در گروه‌های مختلف اندازه‌گیری شد.

نتایج: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد در گروه شاهد، مدت زمان عدم تحرک در آزمون شنای اجباری در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌دار داشته است ( $P<0/001$ ). در گروه‌های تجربی، دوز بالا از عصاره یونجه زرد نیز سبب افزایش معنی‌دار در مدت زمان عدم تحرک در آزمون شنای اجباری گردید ( $P<0/001$ ). اما دوزهای پایین‌تر عصاره سبب کاهش معنی‌دار در مدت زمان عدم تحرک نسبت به گروه شاهد شدند ( $P<0/001$ ) ( $P<0/001$ ). گروه دریافت‌کننده فلوکستین نیز کاهش معنی‌دار را در مدت زمان عدم تحرک نسبت به گروه شاهد نشان داد ( $P<0/001$ ). دوزهای پایین‌تر از عصاره یونجه زرد سبب افزایش معنی‌دار در میزان کورتیکوسترون خون نسبت به گروه شاهد شدند ( $P<0/001$ ). تجویز فلوکستین نیز سبب افزایش معنی‌دار در میزان کورتیکوسترون خون نسبت به گروه شاهد شد ( $P<0/001$ ). در آزمون میدان باز، تعداد دفعات عبور از خطوط در گروه شاهد نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار را نشان داد ( $P<0/001$ ). در گروه‌های تجربی، دوز بالا از عصاره یونجه زرد سبب کاهش معنی‌دار در تعداد دفعات عبور موش‌ها از خطوط نسبت به گروه شاهد شد ( $P<0/001$ ).

نتیجه‌گیری: مطالعات فیتوشیمیایی، برخی از مواد فعال مانند کوئرستین و اسیدهای فنلی را در یونجه زرد نشان داده‌اند که با مهار مونوآمین اکسیداز و افزایش دوپامین و سروتونین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدافسردگی دارند. بنابراین یونجه زرد بدلیل داشتن مولکول‌های زیستی فعال، می‌تواند نقش مهمی در پیشگیری از افسردگی داشته باشد و نتایج حاصل از این تحقیق نیز نشان داده است

که عصاره یونجه زرد، به‌ویژه در دوزهای پایین‌تر، اثرهای ضد افسردگی بهتری را در موش بزرگ آزمایشگاهی تحت استرس مزمن دارد.

واژه‌های کلیدی: استرس مزمن، افسردگی، مدل حیوانی، یونجه‌زرد (*Melilotus officinalis* L.).

## مقدمه

امروزه با وجود پیشرفت علم، صنعت و تکنولوژی، زندگی توأم با آرامش و اطمینان از انسان سلب شده و به‌جای آن بیماری‌های عصبی-روانی جایگزین شده است. استرس، بخش جداناپذیر زندگی شده است و زمانی که نیازهای شخصی و اجتماعی فراتر از توانایی فرد در رفع آن باشد، حالت استرس در وی ایجاد می‌شود (Nicknami *et al.*, 2015). عوامل استرس‌زا به‌ویژه آنهایی که مزمن هستند بر فیزیولوژی بدن تأثیر گذاشته و هومئوستازی یا سازوکارهای سازگاری بدن را مختل می‌کنند (Thakur *et al.*, 2015) که در این صورت بر رفتار و عملکرد شناختی فرد تأثیر می‌گذارند (Metz, 2007). مطالعات نشان داده‌اند که استرس حاد و یا مزمن می‌تواند تأثیرات طولانی‌مدت و برگشت‌ناپذیری بر رشد مغز، سیستم‌های متابولیکی و درون‌ریز، سیستم ایمنی، تولیدمثل، قلب و عروق و رفتار، به‌ویژه در طول دوره کودکی و نوجوانی بگذارد. افزایش سطوح کاتکولامین‌ها و کورتیزول منجر به تغییرات در رشد مغز از طریق افزایش تحلیل نورون‌ها و تأخیر در میلینه شدن آنها می‌شود (Pervanidou & Chrousos, 2012). بررسی‌ها نشان داده‌اند که در حدود ۱۷٪ از بزرگسالان و ۱۲٪ از نوجوانان آمریکا و نیز ۷۵٪ کل مردم دنیا حداقل یک‌بار در زندگی خود یک دوره افسردگی را تجربه کرده‌اند. از علائم افسردگی می‌توان به غم و ناامیدی، احساس بی‌ارزشی، عدم تمرکز کافی، احساس گناه، بی‌خوابی، احساس شکست و غیره اشاره کرد که گاه همراه با رفتارهای پیش‌بینی نشده نیز هستند (Merikangas *et al.*, 2010).

افسردگی یک بیماری بسیار ناتوان کننده است که اثرهای منفی بر کیفیت زندگی، عملکرد شناختی و سلامت

عمومی بدن دارد و می‌تواند سبب مرگ و میر شود (Baek *et al.*, 2016; Khormaei *et al.*, 2015). افسردگی دارای مجموعه‌ای از علائم و نشانه‌های مختلف روانشناختی است که از احساس خفیف ملال تا سکوت و دوری از فعالیت روزمره بروز می‌نماید و به‌عنوان مشکل بهداشتی جهانی در تمامی فرهنگ‌ها خودنمایی می‌کند. افراد افسرده هر رویدادی را بدبینانه تفسیر می‌کنند و بر ابعاد تیره زندگی‌شان تمرکز گزینشی دارند. این افراد روی کمبودها، رویدادهای استرس‌زا و شکست‌های زندگی خود تمرکز می‌کنند، هر رویدادی را به خودشان نسبت می‌دهند و دائماً از خود انتقاد می‌کنند (Haefel & Grigorenko, 2018). بسیاری از افراد به کمک داروهای ضدافسردگی و روان‌درمانی بهبود یافته‌اند. اما این نوع از داروهای شیمیایی عوارض جانبی مانند خستگی، خواب‌آلودگی، تپش قلب، قطع ادراک، اختلالات جنسی و غیره را نیز به‌دنبال دارند (O'Donnell & Shelton, 2011). مشخص شده است که یکی از سازوکارهای ایجاد افسردگی، کمبود و یا عدم تعادل در میزان نوروترنسمیترهای مونوآمین می‌باشد مانند سروتونین، دوپامین و نوراپی نفرین در مغز است. این مورد با این واقعیت که داروهای ضدافسردگی مانند مهارکننده‌های مونوآمین‌اکسیداز، باعث افزایش عملکرد مونوآمین‌ها می‌شوند، مطابقت کامل دارد (Lee *et al.*, 2010). همچنین محققان خطر بروز افسردگی را نتیجه تأثیرات توأم ژنتیک و محیط مانند فشارهای روان-تنی یا استرس می‌دانند (Tsuang *et al.*, 2004).

در هنگام تجربه رویدادهای استرس‌زا، اطلاعات استرس به هیپوتالاموس ارسال و پاسخ جنگ و گریز آغاز می‌گردد (ترشح کاتکولامین‌ها از بخش مرکزی فوق کلیه). نتیجه این روند افزایش فشار خون، تعریق، تپش قلب، انقباض

می‌شد (Borhani et al., 2018). برخی از ترکیبات فعال شامل کومارین، فلاونوئیدها (کامپفرول، گلیکوزیدهای کورستین)، تری‌ترین، ساپونین و روغن‌های فرار با اثرهای ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی در این گیاه وجود دارند (Pleşca-Manea et al., 2002). با توجه به اینکه اثر گیاه یونجه زرد بر افسردگی ناشی از استرس مزمن بی‌حرکتی گزارش نشده است، این مطالعه با هدف بررسی اثر عصاره هیدروالکلی گیاه یونجه زرد بر افسردگی ناشی از استرس مزمن بی‌حرکتی در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر ارزیابی شده است.

## مواد و روش‌ها

### تهیه عصاره

گیاه یونجه زرد (*Melilotus officinalis*) از منطقه سبزکوه استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری و از نظر گیاه‌شناسی پس از تطبیق با مشخصات اعلام شده در فلور رنگی ایران به شماره انتشار: ۵۷۲ و کد: ۰۷۳/۰۱۰/۰۰۵ در آزمایشگاه گیاه‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ایذه تأیید شد. نمونه‌ها در دمای اتاق و سایه، خشک و بودر گردیدند. به بودر گیاه، اتانول ۷۰٪ اضافه گردید و مخلوط برای ۷۲ ساعت با هم‌زدن روزانه، در دمای اتاق نگهداری شد. آنگاه ابتدا ذرات درشت توسط پارچه تنظیف جدا و پس از آن با استفاده از کاغذ صافی واتمن عصاره کاملاً صاف شد. در ادامه محلول صاف شده به کمک دستگاه روتاری تغلیظ گردید. عصاره حاصل به ظروف شیشه‌ای مسطح وارد و در بن ماری با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به‌طور کامل خشک گردید. عصاره خشک شده تا زمان استفاده برای تهیه غلظت‌های مورد نظر، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Nikbakht et al., 2018).

### حیوانات مورد آزمایش

در این تحقیق تجربی که براساس مجوز شماره IR.SKU.REC.1400.071 تاریخ ۱۴۰۰/۱۱/۱۹ کمیته

رگ‌های خونی و غیره است. همزمان محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال نیز با تحریک بخش قشری غده فوق کلیه موجب ترشح گلوکوکورتیکوئیدها (کورتیزول در انسان و کورتیکوسترون در موش) می‌شود که نتیجه آن کاهش التهاب و رسیدن بدن به حالت ثبات اولیه است (Taylor, 2012). افزایش میزان کورتیزول به‌عنوان هورمون استرس، موجب مهار نورونز در هیپوکامپ مغز شده که نتیجه آن بروز برخی رفتارهای غیرعادی در افراد افسرده است (Mah et al., 2016). بیش‌فعالی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال، عملکرد سیناپسی را کاهش داده و موجب آتروفی نورون‌ها و بروز رفتارهای افسردگی می‌شود (Horchar & Wohleb, 2019). مطالعات بالینی نیز نشان داده‌اند که استرس و افسردگی با تغییر در مورفولوژی و فعال‌سازی میکروگلیاها همراه بوده و منجر به التهاب عصبی و اختلال عملکرد عصبی می‌شود (Wang et al., 2022).

استفاده از گیاهان دارویی در مقابله با استرس و درمان افسردگی ناشی از آن که در مقایسه با داروهای شیمیایی از عوارض جانبی کمتری برخوردارند، از گذشته بسیار رایج بوده و توجه محققان زیادی را به خود جلب کرده است. در عصاره گیاهان دارویی، ترکیبات مؤثر و فعال زیادی وجود دارد که براساس غلظت و ماهیت بیوشیمیایی که دارند، در درمان بسیاری از اختلالات متابولیکی در انسان وارد عمل می‌شوند. ترکیبات گیاهی در فرمولاسیون بسیاری از محصولات پزشکی که به‌صورت تجاری در دسترس عموم هستند وارد شده است (Newman; Rasool Hassan, 2012; Newman & Cragg, 2020). یونجه زرد با نام علمی *Melilotus officinalis* متعلق به خانواده نخودیان (Leguminosae) می‌باشد. از سرشاخه گلدار این گیاه به‌عنوان آرام‌کننده، ادرارآور و رفع ناراحتی‌های سینه استفاده می‌شود. دم‌کرده آن برای رفع تحریکات عصبی، بی‌خوابی کودکان و میگرن بکار می‌رود. در طب سنتی برخی کشورها مانند مصر از دمنوش آن به عنوان ضدالتهاب یا ضدانگل یا به صورت ضماد در درمان مفاصل ملتهب و التیام زخم‌ها استفاده

مدت ۲۱ روز ادامه داشت (Liperoti et al., 2017).

### آزمون‌های رفتاری

#### آزمون شنای اجباری

در آزمون شنای اجباری، ابتدا در یک ظرف استوانه شیشه‌ای (به ابعاد ۷۹×۴۵) تا ارتفاع ۳۰ سانتی‌متری از آب ۲۵ درجه سانتی‌گراد ریخته شد. حیوانات به صورت جداگانه از ارتفاع ۵ سانتی‌متری مانده تا سطح آب رها و به ملایمت به درون آب وارد شدند. توقف حرکات دست و پای موش به عنوان بی‌حرکت شدن محسوب گردید. زمان آزمایش ۶ دقیقه بود که ۲ دقیقه ابتدایی برای تطابق حیوان با شرایط موجود در نظر گرفته شد و به عنوان زمان بی‌حرکتی ثبت نشد و زمان بی‌حرکتی برای ۴ دقیقه بعدی ثبت گردید. در این مدت فیلم برداری انجام و بعد فیلم‌ها بازبینی شد. حرکت صعودی شامل حرکت مستقیم رو به بالای حیوان در امتداد ارتفاع محفظه شنا و رفتار شنا به صورت حرکت معمولاً افقی در درون محفظه شنا تعریف شد. در مقابل، منظور از رفتار بی‌حرکتی وضعیتی بود که حیوان در آن به حالت سکون در سطح آب شناور می‌ماند و فقط حرکات مختصر و ضروری را برای بالاتر نگه داشتن سر از آب انجام می‌داد. در این حالت، حداقل سه پای حیوان بی‌تحرك باقی می‌ماند (Sumaya et al., 2005).

#### آزمون میدان باز

برای اجرای آزمون میدان باز از یک جعبه با طول و عرض ۷۲ سانتی‌متر و ارتفاع ۳۶ سانتی‌متر استفاده شد. کف جعبه با خطوط عمود بر هم به ۱۶ قسمت مساوی تقسیم گردید. از این وسیله برای ارزیابی مدت زمان صرف شده توسط حیوان در فضای مرکزی استفاده می‌شود. موش‌ها جداگانه برای ۵ دقیقه در جعبه قرار داده شده و از حرکات آنان فیلم برداری شد. پس از بازبینی فیلم‌ها، تعداد مربع‌های طی شده ثبت گردید. عبور حیوان با هر چهار دست و پا از هر یک از خطوط ذکر شده به عنوان یک حرکت واحد در

اخلاق در پژوهش دانشگاه شهرکرد انجام شد، از ۴۸ موش بزرگ آزمایشگاهی نر بالغ نژاد ویستار تهیه شده از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه شهید چمران اهواز در محدوده وزنی ۳۰۰-۲۵۰ گرم استفاده شد. به منظور سازگاری با شرایط محیطی جدید، حیوانات مورد آزمایش در شرایط استاندارد  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، در قفس‌های پلاستیکی با بستر پوشالی در اتاق نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ایزد به دسترسی آزادانه به آب و غذا به مدت ۲ هفته نگهداری شدند. سپس موش‌ها به طور تصادفی به ۶ گروه ۸ تایی ( $n=8$ ) به شرح زیر تقسیم‌بندی شدند.

گروه ۱ (کنترل): دست نخورده و بدون دریافت دارو و بدون القای استرس. گروه ۲ (شاهد یا شم): به مدت ۲۱ روز حلال عصاره (نرمال سالین) را نیم ساعت قبل از القای استرس، دریافت کردند. گروه‌های درمان ۳، ۴ و ۵ که دوزهای مختلف از عصاره یونجه زرد را براساس مطالعات دیگر محققان (Zhao et al., 2017) و برای تعیین دوز مؤثر، ابتدا دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و بعد براساس نتایج حاصل از این تجویز، به ترتیب دوزهای ۵۰ و ۲۵ (میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) را نیم ساعت قبل از القای استرس، به مدت ۲۱ روز دریافت کردند. گروه ۶ (فلوکستین یا شاهد مثبت): به مدت ۲۱ روز دوز ۷ mg/kg از فلوکستین (داروی ضدافسردگی / مهارکننده بازجذب سروتونین) را نیم ساعت قبل از القای استرس، دریافت کردند.

#### القای استرس

به منظور القای استرس بی‌حرکتی، از مقید کننده حرکت (Restrainer) تهیه شده از شرکت برج صنعت، با جنس ماکرولون شفاف استفاده شد که در آن موش‌های بزرگ آزمایشگاهی، قادر به حرکت نبودند. حیوانات مورد آزمایش روزانه به مدت ۲ ساعت و از ساعت ۱۰ صبح در درون مقید کننده قرار داده شدند. این روند بی‌حرکتی حیوانات به

(ایران) و به روش الایزا انجام گردید.

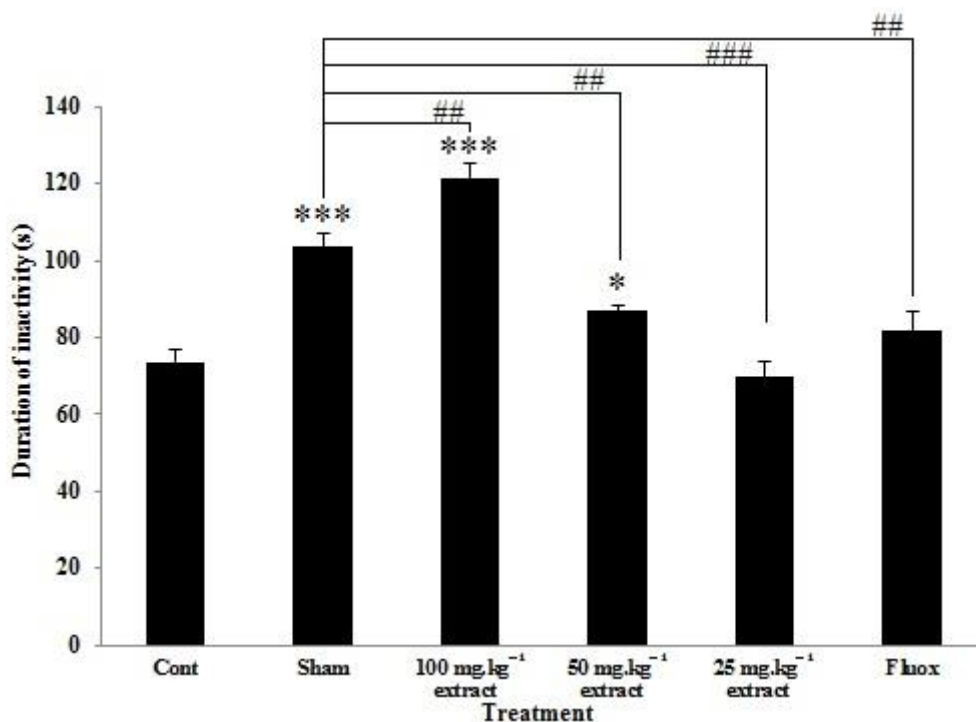
#### تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای تحلیل داده‌های حاصل از این تحقیق، از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۲۱) استفاده شد. با توجه به اینکه نتایج بدست آمده کمی بود، با آزمون ناپارامتری Kolmogorov-Smirnov فرض طبیعی بودن توزیع فراوانی داده‌ها تأیید گردید ( $P > 0.05$ ). داده‌ها توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی حداقل تفاوت معنی‌دار ( $LSD$ ) تحلیل شدند. درنهایت، نتایج بدست آمده به همراه محاسبات آماری، به صورت خطای معیار میانگین  $\pm$  میانگین ( $Mean \pm SEM$ ) گزارش گردیدند. در تمام موارد اختلاف بین گروه‌ها با  $P < 0.05$  معنی‌دار تلقی شد.

نظر گرفته شد. این حرکات قبل و پس از القای استرس مزمن بررسی شدند تا میزان پاسخ واکنشی حیوان به اثر عصاره و دارو بر استرس تعیین گردد (Rafieirad & Abbaszadeh, 2017).

#### بررسی بیوشیمیایی

در پایان، با انجام آزمون‌های رفتاری شنای اجباری برای سنجش میزان افسردگی و آزمون میدان باز برای ارزیابی میزان فعالیت حرکتی، در حیوانات پس از بیهوشی عمیق، از قلب خون‌گیری شد و به کمک سانتریفیوژ، سرم از نمونه‌های خون جدا شده و اندازه‌گیری میزان کورتیکوسترون با استفاده از کیت الایزا (ELISA Kit) IDEAL TASHKHIS از شرکت Cortisol Cartridge



شکل ۱- مقایسه مدت زمان عدم تحرک در آزمون شنای اجباری در موش‌های صحرائی تحت استرس بی‌حرکتی تیمار شده

با عصاره یونجه زرد و فلوکستین در مقایسه با گروه کنترل و شاهد

**Figure 1. Comparison of immobility duration in forced swimming test of rats under immobility stress treated with *Melilotus officinalis* extract and fluoxetine**

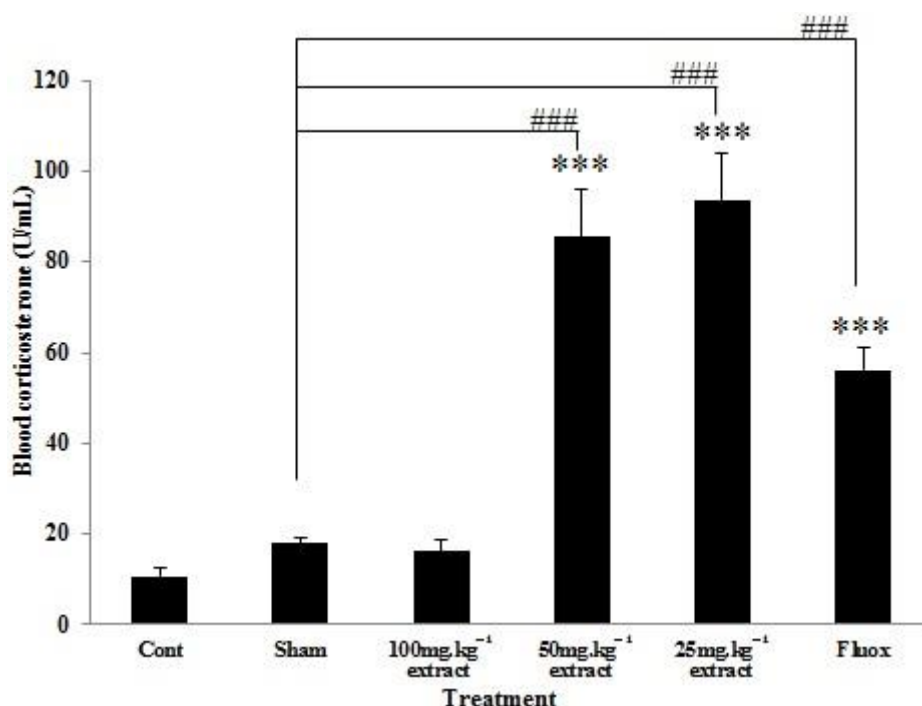
**Cont:** control; intact, without receiving drugs and without stress induction, **Sham:** control; receiving the extract solvent (normal saline) half an hour before stress induction for 21 days, **100, 50, and 25 mg.kg<sup>-1</sup> extract:** received different doses of *M. officinalis* extract, and **Fluox:** fluoxetine, positive control; received fluoxetine 7 mg.kg<sup>-1</sup> half an hour before stress induction for 21 days.

LSD was used to compare the means (\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ , ### $p < 0.001$ , and ## $p < 0.01$ ).

## نتایج

در شکل ۱ نتایج مربوط به مدت زمان (بر حسب ثانیه) عدم تحرک در آزمون شنای اجباری در گروه‌های مختلف از موش‌های تحت استرس مزمن بی‌حرکتی نشان داده شده است. گروه شاهد و گروه‌های دریافت‌کننده دوز ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره یونجه زرد، افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل برای مدت زمان عدم تحرک نشان دادند ( $P < 0.05$  و  $P < 0.001$ ). گروه دریافت‌کننده دوز ۱۰۰ افزایش معنی‌دار ( $P < 0.001$ ) و گروه‌های دریافت‌کننده دوزهای ۵۰ ( $P < 0.001$ ) و ۲۵ ( $P < 0.001$ ) کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان

دادند. همچنین، گروه دریافت‌کننده فلوکستین نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داده است ( $P < 0.001$ ). در شکل ۲ تغییرات سطح کورتیکوسترون خون در گروه‌های مختلف موش‌های تحت استرس مزمن بی‌حرکتی نشان داده شده است. افزایش کورتیکوسترون در گروه شاهد نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نیست. البته، غلظت کورتیکوسترون خون در گروه‌های دریافت‌کننده دوزهای ۵۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره یونجه زرد و گروه دریافت‌کننده فلوکستین نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد ( $P < 0.001$ ).



شکل ۲- مقایسه سطح کورتیکوسترون خون در آزمون شنای اجباری در موش‌های صحرایی تحت استرس بی‌حرکتی تیمار شده با عصاره یونجه زرد و فلوکستین در مقایسه با گروه کنترل و شاهد

**Figure 2. Comparison of blood corticosterone level in forced swimming test of rats under immobility stress treated with *Melilotus officinalis* extract and fluoxetine**

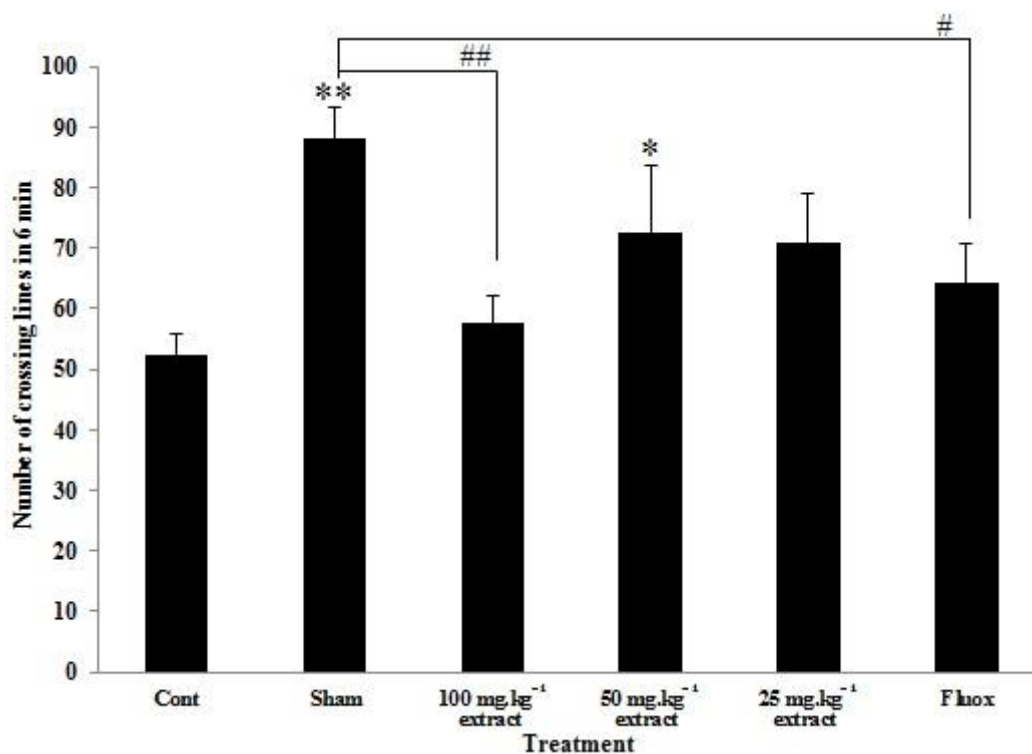
**Cont:** control; intact, without receiving drugs and without stress induction, **Sham:** control; receiving the extract solvent (normal saline) half an hour before stress induction for 21 days, **100, 50, and 25 mg.kg<sup>-1</sup> extract:** received different doses of *M. officinalis* extract, and **Fluox:** fluoxetine, positive control; received fluoxetine 7 mg.kg<sup>-1</sup> half an hour before stress induction for 21 days.

LSD was used to compare the means (\*\*\*) $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ , ### $p < 0.001$ , and ## $p < 0.01$ ).



کنترل ( $P < 0.01$ )، افزایش معنی داری را نشان می دهد. گروه دریافت کننده دوز ۱۰۰ ( $P < 0.01$ ) از عصاره و گروه دریافت کننده فلوکستین ( $P < 0.05$ ) نیز کاهش معنی داری را نسبت به گروه شاهد در تعداد دفعات عبور از خطوط در آزمون میدان باز نشان می دهند.

در شکل ۳ نتایج مربوط به آزمون جعبه باز در گروه های مختلف موش های بزرگ آزمایشگاهی تحت استرس بی حرکتی نشان داده شده است. تعداد دفعات عبور از خطوط در گروه شاهد و گروه دریافت کننده دوز ۵۰ ( $P < 0.05$ ) میلی گرم بر کیلوگرم از عصاره یونجه زرد نسبت به گروه



شکل ۳- مقایسه تعداد دفعات عبور از خطوط در آزمون جعبه باز در موش های صحرایی تحت استرس بی حرکتی تیمار شده با عصاره یونجه زرد و فلوکستین در مقایسه با گروه کنترل و شاهد

**Figure 3. Comparison of number of crossing lines in open box test of rats under immobility stress treated with *Melilotus officinalis* extract and fluoxetine**

**Cont:** control; intact, without receiving drugs and without stress induction, **Sham:** control; receiving the extract solvent (normal saline) half an hour before stress induction for 21 days, **100, 50, and 25 mg.kg<sup>-1</sup> extract:** received different doses of *M. officinalis* extract, and **Fluox:** fluoxetine, positive control; received fluoxetine 7 mg.kg<sup>-1</sup> half an hour before stress induction for 21 days.

LSD was used to compare the means (\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ , ## $p < 0.001$ , and # $p < 0.01$ ).

میلی گرم) در مهار عدم تحرک بهتر از دوز ۱۰۰ بود. دوز ۲۵ حتی مؤثرتر از فلوکستین بوده و باعث تداوم حرکات صعودی حیوان و عدم تظاهر افسردگی در آب شده است. بنابراین دوزهای پایین تر از عصاره یونجه زرد در جلوگیری از بروز علائم شبه افسردگی مؤثر بوده اند. بهرحال، اثرهای ضد اضطرابی و ضد افسردگی عصاره یونجه زرد در بهبود

## بحث

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می دهد که موش های بدون تیمار با عصاره گیاهی (شاهد)، افزایش معنی داری را در مدت زمان عدم تحرک در آزمون شنای اجباری (شاخص علائم شبه افسردگی)، نسبت به گروه کنترل داشته اند. نتایج اثر دوزهای پایین از عصاره (۲۵ و ۵۰

مانند: اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها و اسید اسکوربیک و غیره در عصاره آنان است که سلول‌ها را در برابر اثرهای مخرب رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند (Sumazian *et al.*, 2010). همچنین سایونین‌های تری‌ترپنوییدی در عصاره گیاهان دارویی با کاهش سطح سیتوکین‌های پیش‌التهابی، از خود فعالیت ضدافسردگی را در مدل‌های جانوری نشان می‌دهند (Toenders *et al.*, 2022).

داروهای سروتونرژیک مانند فلوکستین باعث افزایش مدت زمان شنای حیوان می‌شوند (Kharamin *et al.*, 2019). در تحقیقات گذشته نیز نشان داده شده است که بیشتر گیاهان دارویی سبب افزایش مدت زمان شنای موش‌ها و اتمام روند عدم تحرک در آنان می‌شوند (Jung *et al.*, 2004). بررسی‌های فیتوشیمیایی نشان داده‌اند که انواعی از مواد فعال و مؤثر در عصاره یونجه زرد وجود دارد که از این میان می‌توان به کوئرستین (نوعی از فلاونوئیدها) اشاره کرد که دارای فعالیت ضداضطرابی، آنتی‌اکسیدانی و ضدافسردگی است (Chen *et al.*, 2022). کوئرستین نیز سبب مهار مونوآمین اکسیداز و افزایش میزان دوپامین و سروتونین و اثرهای آرام بخشی می‌شود (Saaby *et al.*, 2009). اسیدهای فنلی اساس خاصیت آنتی‌اکسیدانی در یونجه زرد هستند. این اسیدها با مهار فعالیت نیتریک اکساید، TNF- $\alpha$  و IL-6 اثرهای ضدالتهابی خود را آشکار می‌کنند (Liu *et al.*, 2018). با توجه به موارد مذکور، یونجه زرد با دارا بودن مولکول‌های زیستی ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی مانند فلاونوئیدها و سایونین‌ها، می‌تواند نقش مهمی در مهار واکنش‌های التهابی و کنترل عواملی که در القای استرس اکسیداتیو دخیل بوده و نقش مهمی در پیدایش افسردگی دارند، داشته باشد.

علاوه بر این، در این پژوهش برای ارزیابی میزان فعالیت حرکتی در موش‌های تحت استرس مزمن بی‌حرکتی، از آزمون میدان باز استفاده گردید و نتایج آن نشان داد که در گروه شاهد، میزان فعالیت حرکتی افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل داشته است. در گروه‌های تحت استرس

این شرایط مهم بوده و باعث بروز حرکات صعودی و شنا توسط حیوانات تیمار شده با عصاره گیاهی نسبت به گروه شاهد شده است.

در دهه‌های اخیر، بسیاری از سیستم‌های زیستی دخیل در پاتوژنز افسردگی شناسایی و بررسی شده‌اند. مطالعات نشان داده که تحریک پاسخ‌های عصبی-التهابی سیستم ایمنی (و ارتباط آن با سیستم غدد درون‌ریز) و بیش‌فعالی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال دو عامل مهم در بروز و ادامه‌یابی افسردگی هستند (Jiang & Ignacio *et al.*, 2019; Jiang *et al.*, 2019).

در این مطالعه غلظت کورتیکوسترون سرم خون در گروه‌های تحت استرس مزمن درمان شده با دوزهای پایین (۲۵ و ۵۰) عصاره یونجه زرد و گروه درمان شده با فلوکستین، افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد نشان دادند. بررسی‌ها نشان داده که عصاره برخی گیاهان مانند مویز (*Vitis vinifera*) به‌عنوان محرک ترشح کورتیکوسترون بوده و به نظر می‌رسد که این اثر بیشتر محیطی بوده و به‌طور مستقیم آدرنال را تحریک نماید (Goymann & Wingfield, 2004) که با نتایج حاصل از تجویز عصاره یونجه زرد در دوزهای پایین در این پژوهش همسو است. از سوی دیگر، در دوز ۱۰۰ از عصاره گیاه غلظت کورتیکوسترون کاهش مشخصی را نشان داد. در این رابطه، نتایج بررسی‌ها نشان داده‌اند وقتی استرس از مرحله حاد به مرحله مزمن وارد شود، بعضی پارامترهای شاخص اثرهای خود را به خوبی نشان نمی‌دهند (Soulimani *et al.*, 2001). همچنین، نتایج گزارش‌های دیگر نیز نشان داده‌اند که وقتی حیوانات به‌طور مکرر در معرض عامل استرس‌زا قرار گیرند، برخی پیامدهای رفتاری و فیزیولوژیکی ناشی از این قرارگیری در معرض استرس، کاهش یافته و حیوانات به عامل استرس‌زا عادت کرده و سازگار می‌شوند (Heidari oranjaghi *et al.*, 2012).

نتایج مطالعات مختلف نشان داده‌اند که عمده خواص آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی مربوط به وجود ترکیباتی

- Ecophytochemistry Journal of Medicinal Plants, 6(1): 55-64.
- Chen, S., Tang, Y., Gao, Y., Nie, K., Wang, H., Su, H., Wang, Z., Lu, F., Huang, W. and Dong, H., 2022. Antidepressant Potential of Quercetin and its Glycoside Derivatives: A Comprehensive Review and Update. *Frontiers in Pharmacology*, 13: 865376: 1-18.
  - Goymann, W. and Wingfield, J.C., 2004. Allostatic load, social status, and stress hormones- the costs of social status matter. *Animal Behaviour*, 67: 591-602.
  - Haefel, G.J. and Grigorenko, E.L., 2018. Cognitive vulnerability to depression: Exploring risk and resilience. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America*, 16(2): 435-48.
  - Heidari oranjaghi, N., Ghasemi, E., Mahdipour, H., Salehi, B., Solfiabadi, M., Erami, E. and Azhdari zarmehri, H., 2012. Effects of acute and chronic immobilization stress on formalin test in the male rat. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, 11(4): 391-402.
  - Horchar, M.J. and Wohleb, E.S., 2019. Glucocorticoid receptor antagonism prevents microglia-mediated neuronal remodeling and behavioral despair following chronic unpredictable stress. *Brain, Behavior, Immunity*, 81: 329-340.
  - Ignacio, Z.M., a Silva, R.S., Plissari, M.E., Quevedo, J. and Reus, G.Z., 2019. Physical Exercise and Neuroinflammation in Major Depressive Disorder. *Molecular Neurobiology*, 56: 8323-8335.
  - Jiang, Y.Z., Peng, T.M., Gaur, U., Silva, M., Little, P., Chen, Z., Qiu, W., Zhang, Y. and Zheng, W., 2019. Role of Corticotropin Releasing Factor in the Neuroimmune Mechanisms of Depression: Examination of Current Pharmaceutical and Herbal Therapies. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(290): 1-12.
  - Jung, K., Kim, I.H. and Han, D., 2004. Effect of medicinal plant extracts on forced swimming capacity in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 93: 75-81.
  - Kharamin, S., Razmeh, S., Nabovvati, M., Moradian, K., Rahimi, S., Orooji, M., Taghavian, L. and Kheradmand Maher, M., 2019. Evaluation of antidepressant-like effect *Lavandulifolia stachys* in the forced swimming test in comparison with imipramine and fluoxetine. *International Journal of Plant Biology*, 10: 7458.
  - Khormaei, F., Kalantari, S. and Farmani, A., 2015. The Comparison of the Facets of Mindfulness among Patients with Major Depression, Generalized anxiety Disorder and Normal Individuals. *Iranian South Medical Journal*, 18(4): 773-85.
  - Lee, S., Jeong, J., Kwak, Y. and Park, S.K., 2010. Depression research: where are we now? *Molecular Brain*, 3(8): 1-10.

مزمین درمان شده با دوزهای مختلف از عصاره یونجه زرد، در میزان فعالیت حرکتی کاهش را نشان می‌دهند که البته این کاهش فقط در دوز ۱۰۰ از عصاره معنی‌دار بود. براساس این نتایج، می‌توان بیان کرد که عصاره یونجه زرد بر میزان فعالیت حرکتی در حیوانات تحت استرس مزمن اثر مهاری داشته و به‌ویژه در دوز زیاد این اثر قابل توجه بوده و میزان فعالیت حرکتی را تا نزدیک به گروه شاهد کاهش داده است. این اثر در گروه دریافت‌کننده فلوکستین نیز مشاهده می‌شود. یادآوری می‌شود این آزمون برای بررسی میزان فعالیت حرکتی در حیوانات تحت استرس انجام شد و نتایج حاصل نشان می‌دهد اگرچه در اثر افسردگی فعالیت حرکتی کاهش می‌یابد (Zavvari & Karimzadeh, 2015) اما در این پژوهش میزان فعالیت در گروه شاهد افزایش داشته است و نشان دهنده آن است که افزایش مدت زمان بی‌حرکتی در آزمایش‌های اجباری، ناشی از اختلال حرکتی در حیوان نبوده است.

نتیجه اینکه عصاره یونجه زرد به‌ویژه در دوزهای پایین‌تر می‌تواند علائم شبه افسردگی را در حیوانات بهبود بخشد. اگرچه با توجه به ترکیبات فعال زیستی متنوع که در این عصاره وجود دارد بر میزان فعالیت حرکتی و سطح کورتیکوسترون خون اثرهای متفاوتی را نشان می‌دهد.

## سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاری معاون محترم پژوهش و فناوری دانشگاه‌های شهرکرد و آزاد اسلامی واحد ایذه اعلام می‌دارند.

## References

- Baek, S.E., Lee, G.J., Rhee, C.K., Rho, D.Y., Kim, D.H., Huh, S. and Lee, S.K., 2016. Decreased Total Antioxidant Activity in Major Depressive Disorder Patients Non-Responsive to Antidepressant Treatment. *Psychiatry Investig*, 13(2): 222-226.
- Borhani, G., Mazandarani, M. and Abbaspour, H., 2018. Eco phytochemical ethnopharmacology, antioxidant and antibacterial activity in different extracts of *melilotus officinalis* l. From chaharbagh mountainous region- semnan province.

- Rasool Hassan, B.A., 2012. Medicinal plants (importance and uses). *Pharmaceutica Analytica Acta*, 3: 139.
- Saaby, L., Rasmussen, H.B. and Jager, A.K., 2009. MAOA inhibitory activity of quercetin from *Calluna vulgaris* (L.) Hull. *Journal of Ethnopharmacology*, 121: 178-181.
- Soulimani, R., Younos, C., Jarmouni-Idrissi, S., Boustia, D., Khalouki, F. and Laila, A., 2001. Behavioral and phaco-toxicological study of *Papaver Rhoeas* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 74: 265-274.
- Sumaya, I.C., Masana, M.I. and Dubocovich, M.L., 2005. The antidepressant-like effect of the melatonin receptor ligand luzindole in mice during forced swimming requires expression of MT2 but not MT1 melatonin receptors. *Journal of Pineal Research*, 39(2): 170-177.
- Sumazian, Y., Syahida, A., Hakiman, M. and Maziah, M., 2010. Antioxidant activities, flavonoids, ascorbic acid and phenolic contents of Malaysian vegetables. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(10): 881-890.
- Taylor, S.E., 2012. *Healthy Psychology*. 8<sup>th</sup> Edition. McGraw Hill, NY: 139-180.
- Thakur, T., Anand, R., Ray, A. and Gulati, K., 2015. Differential effects of chronic predictable and unpredictable stress on neurobehavioral and biochemical responses in rats. *Therapeutic Targets for Neurological Diseases*, 2: 603: 1-5.
- Toenders, Y.J., Laskaris, L., Davey, C.G., Berk, M., Milaneschi, Y., Lamers, F., Penninx, B.W.J.H. and Schmaal, L., 2022. Inflammation and depression in young people: a systematic review and proposed inflammatory pathways. *Molecular Psychiatry*, 27: 315-327.
- Tsuang, M.T., Bar, J.L., Stone, W.S. and Faraone, S.V., 2004. Gene-environment interactions in mental disorders. *World Psychiatry*, 3(2): 73-83.
- Wang, H., He, Y., Sun, Z., Ren, S., Liu, M., Wang, G. and Yang, J., 2022. Microglia in depression: an overview of microglia in the pathogenesis and treatment of depression. *Journal of Neuroinflammation*, 19: 132.
- Zavvari, F. and Karimzadeh, F.A., 2015. Methodological Review of Development and Assessment of Behavioral Models of Depression in Rats. *Shefaye Khatam*, 3(4): 151-160.
- Zhao, G.C., Yuan, Y.L., Chai, F.R. and Ji, F.J., 2017. Effect of *melilotus officinalis* extract on the apoptosis of brain tissues by altering cerebral thrombosis and inflammatory mediators in acute cerebral ischemia. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 89: 1346-1352.
- Liperoti, R., Vetrano, D.L., Bernabei, R. and Onder, G., 2017. Herbal medications in cardiovascular medicine. *Journal of the American College of Cardiology*, 69(9): 1188-1199.
- Liu, Y.T., Gong, P.H., Xiao, F.Q., Shao, S., Zhao, D.Q., Yan, M.M. and Yang, X.W., 2018. Chemical constituents and antioxidant, anti-inflammatory and anti-tumor activities of *Melilotus officinalis* (Linn.) Pall. *Molecules*, 23(2): 271-282.
- Mah, L., Szabuniewicz, C. and Fiocco, A.J., 2016. Can anxiety damage the brain? *Current Opinion in Psychiatry*, 29(1): 56-63.
- Merikangas, K.M., He, J., Burstein, M., Swanson, S.A., Avenevoli, S., Cui, L., Benjet, C., Georgiades, K. and Swendsen, J., 2010. Lifetime prevalence of mental disorders in U.S. adolescents: Results from the National Comorbidity Survey Replication-Adolescent Supplement (NCS-A). *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 49(10): 980-989.
- Metz, G.A., 2007. Stress as a modulator of motor system function and pathology. *Reviews in the Neurosciences*, 18: 209-222.
- Newman, D.J. and Cragg, G.M., 2020. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades. *Journal of Natural Products*, 83(3): 770-803.
- Nicknami, M., Dehghani, F., Bouraki, S.H., Kazemnezhad, E. and Soleymani, R., 2015. Stress coping styles in Guilan University of Medical Sciences Students. *Comprehensive Nursing and Midwifery*, 24(74):62-68.
- Nikbakht, Z., Valipour chahardahcharic, S. and Sazegar, H., 2018. Efficacy of Eggplant Hydroalcoholic Extract on Blood Lipid Indices in Streptozotocin-Induced Diabetic Male Rats. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 26(2): 180-188.
- O'Donnell, J.M. and Shelton, R.C., 2011. *Drug therapy of depression and anxiety disorders*. McGraw Hill, 397-415.
- Pervanidou, P. and Chrousos, G., 2012. Metabolic consequences of stress during childhood and adolescence. *Metabolism Clinical and Experimental*, 61: 611-619.
- Pleșca-Manea, L., Pârva, A.E., Parva, M., Taămaș, M., Buia, R. and Puia, M., 2002. Effects of *Melilotus officinalis* on acute inflammation. *Phytotherapy Research*, 16(4): 316-319.
- Rafieirad, M. and Abbaszadeh, H., 2017. Pomegranate seed extract reduces ischemia induced anxiety in male rats. *JHerbmed Pharmacol*. 6(2): 85-89.