

بررسی اثر عصاره و فراکسیون‌های گیاه مهرخوش بر روی سندرم محرومیت از مرفین در موش

حسین حسین‌زاده^{۱*}، محمد رمضانی^۲، مریم قربانی^۳

- ۱- استاد، گروه فارماکودینامی و سمناسی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی پژوهشکده بουلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
- ۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و فارماکوگنوزی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم دارویی، دانشکده داروسازی مشهد
- ۳- داروساز

* آدرس مکاتبه: مشهد، دانشکده داروسازی، صندوق پستی: ۹۱۷۷۵ - ۱۳۶۵

تلفن: ۰۵۱۱ ۸۸۲۳۲۵۱ (۰۵۱۱ ۸۸۲۳۲۵۱)، نامبر: ۰۵۱۱ ۸۸۲۳۲۵۱

پست الکترونیک: hosseinzadehh@mums.ac.ir

تاریخ تصویب: ۸۵/۷/۲۱

تاریخ دریافت: ۸۴/۵/۱۰

چکیده

مقدمه: گیاه مهرخوش اثر ضدالتهاب آن به اثبات رسیده است. اثرات ضددردی این گیاه در روش صفحه داغ، توسط نالوکسان مهار شده است.

هدف: با توجه به اثرات گیاه مهرخوش بر سیستم اوپیوییدی، تاثیر عصاره تام و فراکسیون‌های این گیاه بر روی سندرم محرومیت از مرفین در موش بررسی شد.

روش بررسی: جهت ایجاد وابستگی، موش را به مدت سه روز تحت تزریق مرفین به صورت زیرجلدی سه بار در روز به ترتیب با دوزهای ۵۰ mg/kg، ۵۰ mg/kg و ۷۵ mg/kg قرار داده و در روز چهارم آخرین دوز مرفین (۵۰ mg/kg) تزریق شد. در مجموع به موش‌ها ۱۰ دوز تزریق شد. جهت القای سندرم محرومیت، تزریق نالوکسان، به میزان ۵ mg/kg به صورت زیرجلدی، دو ساعت پس از آخرین تزریق مرفین صورت گرفت. تزریق عصاره تام و فراکسیون‌ها نیم ساعت پس از آخرین تزریق مرفین صورت گرفت. تعداد پرش‌ها به عنوان نشانه‌ای از سندرم محرومیت به مدت نیم ساعت، یک دقیقه پس از تزریق نالوکسان شمارش گردید.

نتایج: عصاره متابولی تام با دوزهای ۰/۲۸ g/kg، ۱/۱۲ g/kg و ۱/۹۶ g/kg سبب کاهش تعداد پرش‌ها و بهبود علایم سندرم محرومیت (نسبت به کنترل) به صورت وابسته به دوز به ترتیب به میزان ۶۴/۵ درصد، ۸۵ درصد و ۹۹/۳ درصد شد. به منظور جداسازی اجزای گیاه، عصاره متابولی در محلول آب - متابول (۲ به ۳) سوسپانسیون شده و با کلروفرم استخراج انجام شد. فاز آبی - (الکلی) به میزان بیشتری سبب کاهش تعداد پرش‌ها به صورت وابسته به دوز گردید. برای جداسازی بیشتر از ستون کروماتوگرافی (MPLC) استفاده شد. با توجه به R_f فراکسیون‌ها، فراکسیون‌های مشابه محلوت شده و ۳ فراکسیون A، B و C حاصل شد. اثر فراکسیون‌ها روی کاهش تعداد پرش‌ها در دوز ۰/۲۸ g/kg بروزی شد. فراکسیون A و B به مراتب فعالیت بهتری از فراکسیون C نشان دادند (به ترتیب ۹۷ درصد، ۹۲ درصد، ۵۵ درصد). عصاره تام در آزمون حرکت، سبب کاهش حرکت در کل خانه‌ها شد. در حالی که فراکسیون‌های حاصل از ستون، تاثیری بارزی روی آزمون حرکت در موش کوچک نداشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره تام و فراکسیون‌های آبی - (الکلی) گیاه قادرند با مکانیسم‌های مختلفی علایم سندرم محرومیت از مرفین را کاهش دهند.

گل واژگان: سندرم محرومیت، مهرخوش، فراکسیون، وابستگی به مرفین



مقدمه

مهرخوش، مورخوش، مورخش و موخش^۱ در نواحی جنوبی ایران (حوالی بندرعباس) می‌روید و بوی قوی و دلپذیری دارد. این گیاه تنها گونه موجود در ایران، از جنس *Zhumeria* است [۱].

گونه‌های تیره نعناع معمولاً به خاطر آثار فارماکولوژیکی شان شناخته شده‌اند. از جمله این خواص می‌توان فعالیت ضددردی و فعالیت ضدالتهابی [۲,۳,۴]، تاثیر روی وابستگی به مورفین [۵]، خاصیت آنتی‌اکسیدانی [۶]، محافظت کبدی [۷]، و اثر کاهنده‌گی قند خون [۸] را نام برد.

این گیاه دارای اسانس مرکب از کامفر و لینالول است. از قسمت‌های مختلف گیاه نیز نوعی تریترپین به فرمول $C_{30}H_{40}O_3$ و دو فلاونوئید به نام‌های *Cirsimartine* و *Desmethoxycetauredine* تعیین فرمول مولکولی شده است [۹]. نتایج تحلیل‌های نقاط اوح کوچک و بزرگ منحنی‌های حاصله، در اسانس فاز خشی نشان می‌دهد که تقریباً به طور انحصاری، محتوی مونوتربن‌های اکسیژن‌دار (۸۸/۹ درصد) و مونوتربن‌های هیدروکربنی (۱۱/۲۸ درصد) است. دو ماده اصلی به نام‌های کامفر با ۳۹/۷ درصد و لینانول با ۱۵/۴ درصد شناسایی شدند. در میان مواد فرعی اسانس این گیاه، *Octan-3 one*, *Bacaryophllene* با ۰/۸۲ درصد، *0/۶۳* درصد و لیمونن با ۱/۴۹ درصد مشاهده شده‌اند [۱].

برگ‌های خشک شده گیاه مهرخوش به علت دارا بودن بوی مطبوع مورد استفاده بومیان منطقه جنوب ایران قرار می‌گیرد و از آن جهت رفع درد معده و به عنوان ضدعفونی‌کننده و درمان قاعدگی‌های دردناک استفاده می‌شود. به این منظور دم کرده‌ای از گیاه به صورت چای تهیه و مصرف می‌شود [۹]. علاوه بر این اثر ضددردی و ضد التهاب عصاره‌های آبی و الکلی این گیاه روی مosh و رت به اثبات رسیده است. اثرات ضددردی این گیاه در روش صفحه داغ، توسط نالوکسان مهار شد [۱۰]. در نتیجه با توجه به تداخل احتمالی گیاه مهرخوش با گیرنده‌های اوپیوئیدی، اثر آن بر

روی سندروم محرومیت به مورفین بررسی شد.

مواد و روش‌ها

حیوان

موس سفید کوچک نر با وزن ۳۰ - ۲۵ گرم از مرکز تحقیقات علوم دارویی تهیه شد. حیوانات در اتاق ۱۲ ساعت روشناختی و ۱۲ ساعت تاریکی در شرایط استاندارد نگهداری شدند.

جمع‌آوری و خشک کردن گیاه

گیاه مهرخوش توسط اداره امور دام و منابع طبیعی استان هرمزگان در اردیبهشت ماه ۱۳۸۱ از ۱۲۰ کیلومتری شمال بندرعباس جمع‌آوری گشت. پس از جمع‌آوری در سایه و به دور از نور خورشید خشک شد و توسط آقایان نجفی و سلطانی شناسایی شد (شماره هریاریومی دانشکده داروسازی مشهد: ۰۳۶۱۳-۳-۲۶۱۳).).

تهیه عصاره تام متابولی

مقدار ۱۵۰ گرم از پودر گیاه خشک را توزین کرده و به منظور تهیه عصاره تام متابولی، به مدت ۱۲ ساعت در دستگاه سوکسله داخل کارتوش ریخته و عصاره‌گیری انجام شد. پس از ۱۲ ساعت دستگاه سوکسله را خاموش کرده و پس از سرد شدن، عصاره حاصل صاف شد. عصاره جهت حذف حلال در دستگاه حذف حلال در خلا قرار داده شد (دما ۵۰ درجه سانتی‌گراد و خلا) پس از تغییط عصاره، عصاره تغییط شده را داخل پلیت‌های از قبل توزین شده ریخته و بقیه حلال در پلیت و روی بن ماری (دما ۳۰ درجه سانتی‌گراد) تبخیر شد.

جداسازی فرآکسیون‌های اتردوپترولی و آبی - متابولی

عصاره تام را پس از حذف حلال و قبل از تبخیر کامل حلال در مخلوط ۱۰۰ سی سی آب - متابول نسبت ۱ به ۹ حل کرده، سپس با اتردوپترول داخل قیف دکاتور (هر بار با ۵۰ سی سی اتردوپترول) تا زمان بی‌رنگ شدن فاز اتری استخراج انجام شد. فازهای اتردوپترولی و آبی - الکلی از هم جدا شد و در هر مورد حذف حلال و تبخیر حلال صورت گرفت.

^۱ *Zhumeria majdae* Rech. f. & Wendelbo



معرف لیبرمن بوشاردا روی آن اسپری شد. رنگ قهوه‌ای حاصله نشان دهنده وجود ترپنوبید است.
(معرف لیبرمن بوشاردا: ۲ g یدید پتابسیم + ۲ g آب به حجم ۱۰۰ ml رسانده می‌شود).

روش ایجاد وابستگی به مورفین در موش نر [۱۲،۱۳]
برای ایجاد وابستگی گروههایی شامل ۶ حیوان استفاده شد. ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش، موش‌ها را به اتاق آزمایش منتقل کرده و در روز بعد، پس از تزریق دقیق، تزریق مورفین به موش‌ها صورت گرفت. موش‌ها روزانه سه دوز مورفین (۵۰ mg/kg) به صورت زیرجلدی (۰/۳ ml) به ترتیب در ساعات ۸ و ۱۱ و ۱۴ دریافت کردند. (دوز بالاتر در دوز سوم جهت جلوگیری از ایجاد سندروم محرومیت در شب است). این کار به مدت ۳ روز انجام شد و در روز چهارم دوز انتهایی مورفین (۵۰ mg/kg) به صورت زیرجلدی تزریق شد.

روش ایجاد سندروم محرومیت در موش‌ها و شمارش پرش‌ها
سندروم محرومیت به وسیله تجویز آنتاگونیست گیرنده اوپیوئیدی (نالوکسان) ایجاد شد. نالوکسان به میزان ۵ mg/kg و به صورت زیر جلدی تجویز شد. ۲ ساعت پس از تزریق آخرین دوز مورفین، به حیوانات تزریق نالوکسان صورت گرفت. هر کدام از موش‌ها زیر یک بشر قرار گرفته و تعداد پرش‌ها پس از گذشت یک دقیقه از تزریق نالوکسان و به مدت ۳۰ دقیقه شمرده شد که نشانه سندروم محرومیت است. درصد کاهش پرش‌ها نسبت به کنترل سنجیده شد.

روش بررسی اثر عصاره گیاه روى سندروم محرومیت در موش‌ها
ابتدا جهت یافتن بهترین زمان تزریق عصاره، عصاره گیاه نیم ساعت قبل و بعد از آخرین دوز مورفین و یک ساعت قبل از آخرین دوز مورفین به میزان ۱/۱۲ g/kg تزریق شد که طبق نتایج به دست آمده بهترین زمان تزریق ۰/۵ ساعت پس از آخرین دوز مورفین بود.
عصاره در دوزهای ۰/۲۸ g/kg، ۱/۱۲ g/kg و ۱/۹۶ g/kg به صورت داخل صفاقی به میزان ۰/۳ ml نیم ساعت پس از

جداسازی فراکسیون‌های کلروفرمی آبی - متانولی
عصاره تمام پس از حذف حلال و قبل از تبخیر کامل حلال (در مرحله تغییظ) به نسبت ۲ به ۳ در ۱۰۰ سی سی مخلوط آب - متانول حل شده، به قیف دکانتور منتقل شده و سپس جdasازی با ۱۰۰ سی سی کلروفرم انجام شد. استخراج تا بی رنگ شدن فاز کلروفرمی ادامه یافت. رنگ فاز کلروفرمی سبز تیره در پایین و رنگ فاز آبی - متانولی قهوه‌ای در بالا بود. این دو فاز را از یکدیگر جدا کرده و حذف و تبخیر حلال در هر دو مورد صورت گرفت.

جداسازی به روش ¹MPLC

ابتدا ستون پرشده توسط سیلیکاژل (۴۰ μm - ۱۵) به مدت یک ساعت و با ۳۰۰ سی سی متانول ۹۹/۹ درصد شستشو شد. سپس ۲ گرم فراکسیون آبی متانولی در ۶ سی سی متانول حل شد و بر روی ستون حدود ۱ گرم ریخته شد. در سرعت جريان حلال ۵ سی سی در دقیقه انتخاب شد. در لوله‌های آزمایش ۵۸ فراکسیون با حجم ۱۰ سی سی جمع آوری گردید. سپس با روش کروماتوگرافی لایه نازک و با سیستم حلال کلروفرم - متانول با نسبت ۷۰ به ۳۰ جdasازی بیشتر صورت گرفت. با توجه به *R_f* فراکسیون‌ها، فراکسیون‌های مشابه مخلوط شده و ۳ فراکسیون A، B و C حاصل گشت.

روش انجام آزمایش‌های فیتوشیمیایی فراکسیون آبی - الكلی [۱۱]
(الف) آزمون فلاونوئیدها: مقدار ۱ تا ۲ میلی لیتر از فراکسیون آبی الكلی را در دو لوله آزمایش ریخته و سپس به آن مقدار ۰/۵ ml کلریدریک غلیظ اضافه شد. به یکی از دو لوله ۲۰ mg براده منیزیم اضافه کرده، رنگ حاصله در قسمت کف لوله پس از ده دقیقه ملاحظه شد. سپس لوله حاوی براده منیزیم سرد شده و با حجم مساوی آب و ۱ ml الكل آمیلیک مخلوط شده و به شدت تکان داده شد. سپس لوله را کنار گذاشته و رنگ حاصل پس از جدا شدن فازها مشاهده گردید.
(ب) آزمون ترپنوبیدها: روی صفحه TLC آماده یک تا دو قطره از فراکسیون آبی متانولی گذاشته، پس از خشک شدن،

¹ Medium Pressure Liquid Chromatography



- متابولی (۱ به ۹) به رنگ سبز به دست آمد. در مرحله سوم عصاره‌گیری ۲۴ گرم عصاره خشک کلروفرمی به رنگ سبز تیره و ۱۱ گرم عصاره آبی - متابولی (۲ به ۳) به رنگ قهوه‌ای روشن به دست آمد. در مرحله جداسازی فراکسیون‌ها از ۲ گرم عصاره خشک آبی - متابولی حاصل از مرحله سوم، سه فراکسیون A، B و C به وزنهای $\frac{1}{3}$ و $\frac{1}{3}$ و $\frac{1}{3}$ گرم به دست آمد. رنگ فراکسیون‌های حاصل از ستون زرد روشن بود.

بررسی اثر زمان تجویز عصاره تام متابولی گیاه مهرخوش روی کاهش تعداد پرش‌ها در سندرم محرومیت بهترین زمان تجویز، نیم ساعت پس از تجویز آخرین دوز مورفین بود (شکل شماره ۱).

بررسی اثر عصاره‌ها و فراکسیون‌های گیاه مهرخوش بر سندرم محرومیت از مورفین در موش
- عصاره تام متابولی

تجویز داخل صفاقی عصاره تام نشان داد که تمامی گروه‌ها به صورت وابسته به دوز (در دوزهای g/kg) $\frac{1}{12}$ ($1/12 \text{ g/kg}$) و همچنین گروه دیازپام (5 mg/kg) ($1/12 \text{ g/kg}$) و همچنین گروه دیازپام (5 mg/kg) (به ترتیب $64/5$ درصد، 85 درصد و $98/9$ درصد) نسبت به گروه کنترل منفی باعث کاهش شدت سندروم محرومیت می‌شوند ($p < 0.001$) (شکل شماره ۲).

- فراکسیون اتردوپترولی

عصاره اتردوپترولی نیز مانند عصاره تام سبب کاهش تعداد پرش‌ها در سندرم محرومیت از مورفین در موش‌ها شد. این کاهش تعداد پرش‌ها به صورت وابسته به دوز بود ($p < 0.001$). درصد کاهش پرش‌ها توسط فراکسیون اتردوپترولی در دوزهای $1/12 \text{ g/kg}$, $0/28 \text{ g/kg}$ و $1/96 \text{ g/kg}$ به ترتیب 61 درصد، $82/8$ درصد، 93 درصد به دست آمد (شکل شماره ۳).

- فراکسیون آبی - متابولی (۱ به ۹)

تجویز عصاره آبی - متابولی سبب کاهش تعداد پرش‌ها در موش و تمامی گروه‌ها به صورت وابسته به دوز اختلاف

تجویز آخرین دوز مورفین تجویز شد. اثر عصاره روی تعداد پرش‌های ایجاد شده در موش‌های وابسته در مدت ۳۰ دقیقه به صورت Mean \pm SEM بیان شدند.

در گروه شاهد منفی، نرمال سالین حاوی توئین 80 (۵ درصد) و در گروه شاهد مثبت دیازپام با دوز 5 mg/kg استفاده شد.

تعیین فعالیت حرکتی [۱۴, ۱۵]

آزمون جعبه باز

پس از تزریق ماده مورد بررسی این آزمون در اتفاقی که شرایط اتاق نگهداری حیوانات را داشت در محفظه‌ای چوبی به طول‌های 100×100 سانتی‌متر و ارتفاع 30 سانتی‌متر که با رنگ سفید پوشیده شده بود انجام شد. داخل محفظه چوبی با خط‌های قرمز رنگ به 25 خانه تقسیم شده بود که هر خانه 20×20 سانتی‌متری بود. حیوانات در زمان مقرر در خانه مرکزی قرار داده شدند و اعمال آنها به مدت ۱۰ دقیقه پس از ۱ ساعت از تزریق مواد بررسی شد.

متغیرهای مورد بررسی

Locomotion: که به سه قسم مرکزی Central, Periphral تقسیم شد. که مجموعه حرکت در قسمت مرکزی (خانه‌های دور خانه مرکز) و مجموعه حرکت در قسمت محیطی (خانه‌های پایه دیواره جعبه) شمارش شد.

آنالیز آماری داده‌ها

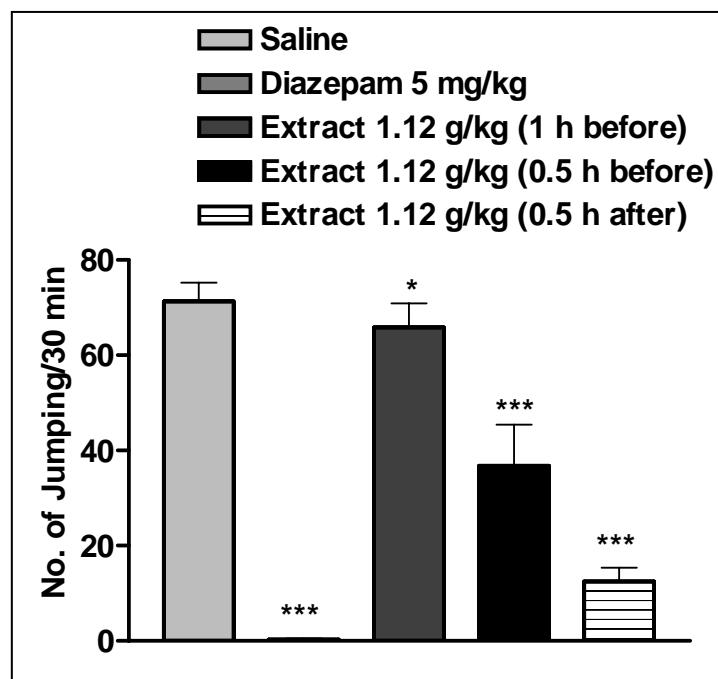
داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار گزارش شده است. پس از انجام ANOVA و در صورت معنی دار بودن آن از آزمون Tukey استفاده شد. نتایج با $p < 0.05$ به عنوان معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

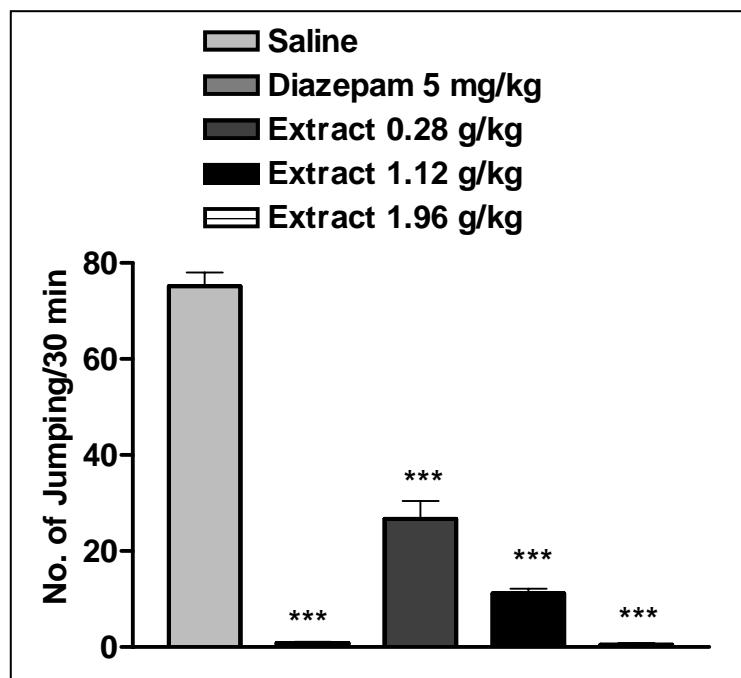
نتایج عصاره‌گیری

از 150 گرم پودر خشک شده گیاه مهرخوش در مرحله اول عصاره‌گیری 35 گرم عصاره تام متابولی به دست آمد. این عصاره تام به رنگ سبز تیره بود. در مرحله دوم عصاره‌گیری 5 گرم عصاره خشک اتردوپترولی به رنگ قهوه‌ای و 30 گرم عصاره آبی

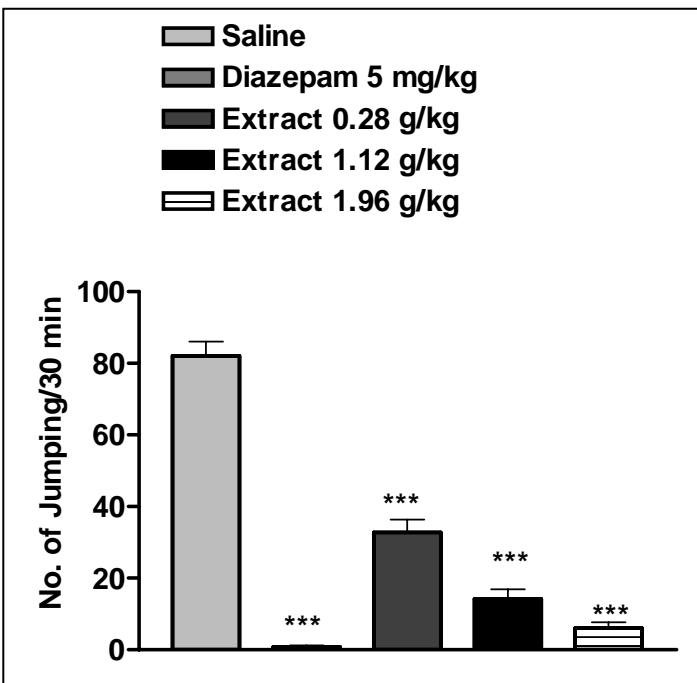




شکل شماره ۱- بررسی بهترین زمان اثر عصاره آبی تام مтанولی گیاه مهرخوش بر تعداد پرش‌های ناشی از سندروم محرومیت در موش. نتایج به صورت میانگین تعداد پرش‌ها + خطای معیار ۶ موش بیان شده است. مقایسه با کنترل. آزمون توکی: *** $p < 0.001$, *** $p < 0.005$.



شکل شماره ۲- اثر عصاره آبی تام مтанولی گیاه مهرخوش بر تعداد پرش‌های ناشی از سندروم محرومیت در موش. نتایج به صورت میانگین تعداد پرش‌ها + خطای معیار ۶ موش بیان شده است. مقایسه با کنترل. آزمون توکی: *** $p < 0.01$.



شکل شماره ۳- اثر فراکسیون اتردو پترولی گیاه مهرخوش بر تعداد پرش‌های ناشی از سندرم محرومیت در موش. نتایج به صورت میانگین تعداد پرش‌ها + خطای معيار ۶ موش بیان شده است. مقایسه با کنترل آزمون توکی: $p < 0.001$. *** $p < 0.001$.

- فراکسیون‌های به دست آمده از ستون MPLC

تعداد فراکسیون‌های به دست آمده از ستون MPLC کروماتوگرافی مایع با فشار متوسط، ۵۸ فراکسیون بود که پس از بررسی R_f حاصل از کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) هر جزو، فراکسیون‌های ۱ تا ۱۳ در گروه A ۱۴ تا ۲۱ در گروه B و فراکسیون‌های ۲۲ تا ۵۸ در گروه C با هم محلول شدند. نتایج نشان داد که هر سه فراکسیون A و B و C در دوز 0.28 g/kg سبب کاهش تعداد پرش‌ها در سندرم محرومیت در موش‌ها شدند و اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل منفی نشان دادند. فراکسیون‌های A و B در مقایسه با فراکسیون C نتایج بهتری را نشان دادند. درصد کاهش تعداد پرش‌ها در دوز 0.28 g/kg برای فراکسیون‌های A و B و C به ترتیب $97/4$ درصد و $92/9$ درصد و 55 درصد به دست آمد (شکل شماره ۷).

نتایج حاصل از آزمایش‌های فیتوشیمیایی

نتایج نشان می‌دهد که فراکسیون آبی - مثانولی حاوی فلاونوئید و ترپنوفلورین است.

معنی‌داری با گروه کنترل نشان دادند. درصد کاهش تعداد پرش‌ها در دوزهای 0.28 g/kg , $1/12 \text{ g/kg}$, $1/12 \text{ g/kg}$ به ترتیب $74/8$ درصد، 93 درصد و $97/5$ درصد به دست آمد (شکل شماره ۴).

- فراکسیون آبی - مثانولی (۲ به ۳)

نتایج نشان می‌دهد که فراکسیون آبی - مثانولی (۲ به ۳) در تمامی دوزها به صورت وابسته به دوز، سبب کاهش میزان پرش‌ها شده و اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل منفی دارد ($p < 0.001$). درصد کاهش تعداد پرش‌ها در دوزهای $1/96 \text{ g/kg}$, $1/12 \text{ g/kg}$ و 0.28 g/kg به ترتیب 64 درصد، $83/7$ درصد و 96 درصد به دست آمد (شکل شماره ۵).

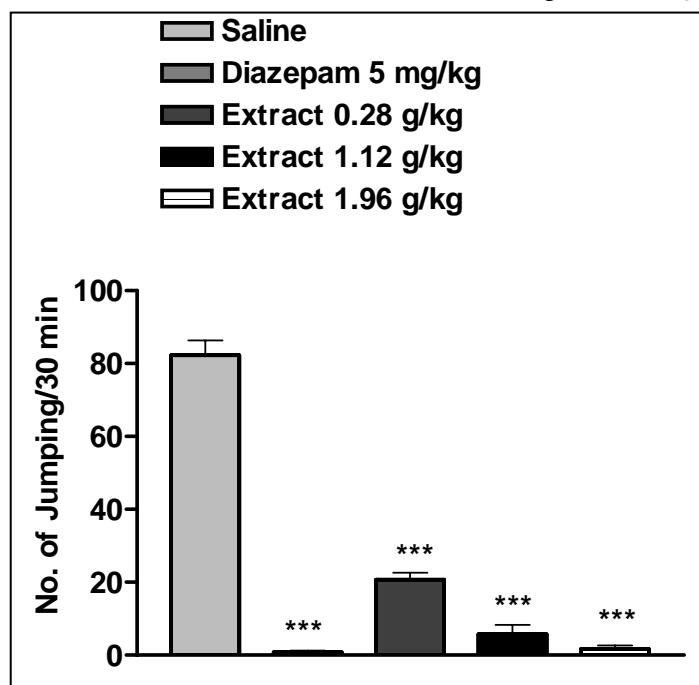
- فراکسیون کلروفرمی

نتایج نشان می‌دهد که این فراکسیون در بالاترین دوز ($1/96 \text{ g/kg}$), اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل منفی نشان داده است ($p < 0.001$). درصد کاهش میزان پرش‌ها در دوزهای $1/96 \text{ g/kg}$, $1/12 \text{ g/kg}$, 0.28 g/kg به ترتیب $4/6$ درصد، $10/9$ درصد و 18 درصد به دست آمد (شکل شماره ۶).

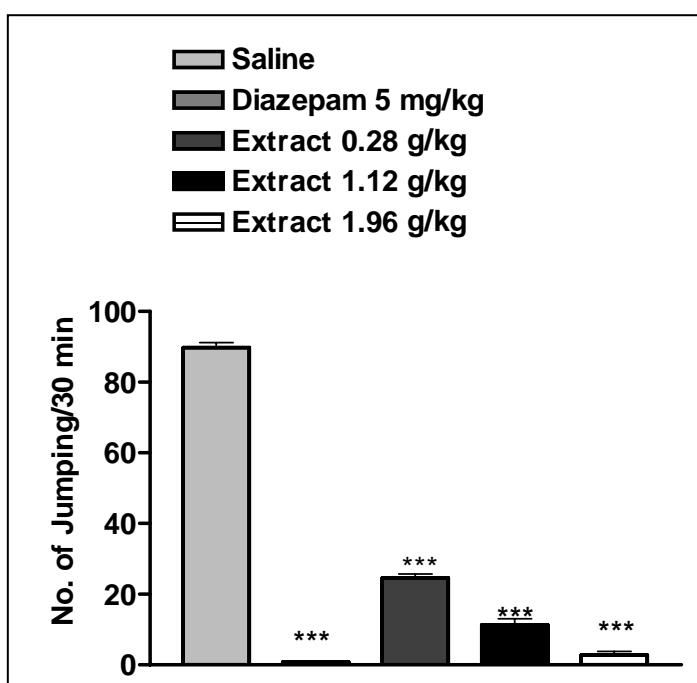
فراکسیون‌ها عملاً روی فاکتورهای حرکتی نقشی نداشتند

(شکل شماره ۹).

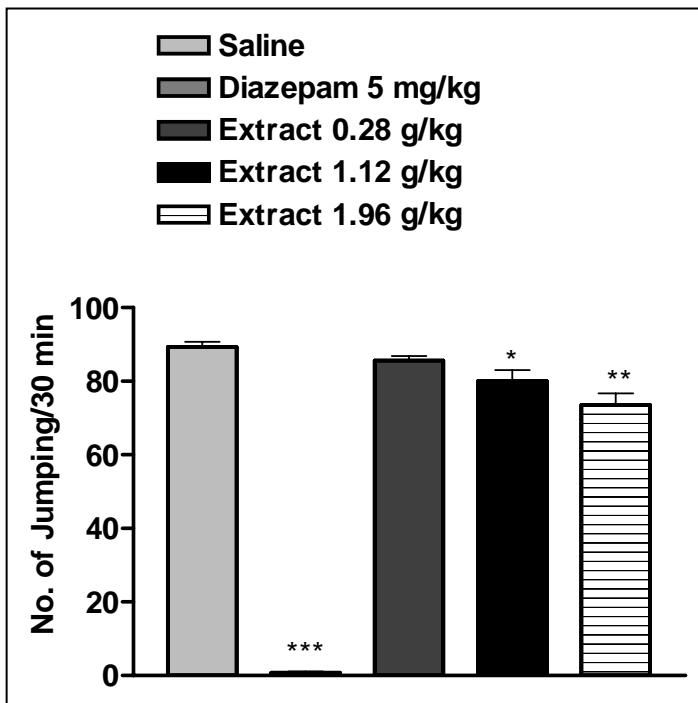
آزمون حرکت عصاره تام متابولی و کنترل مثبت دیازپام به طور عمده باعث کاهش فاکتورهای حرکتی شدند (شکل شماره ۸)، اما



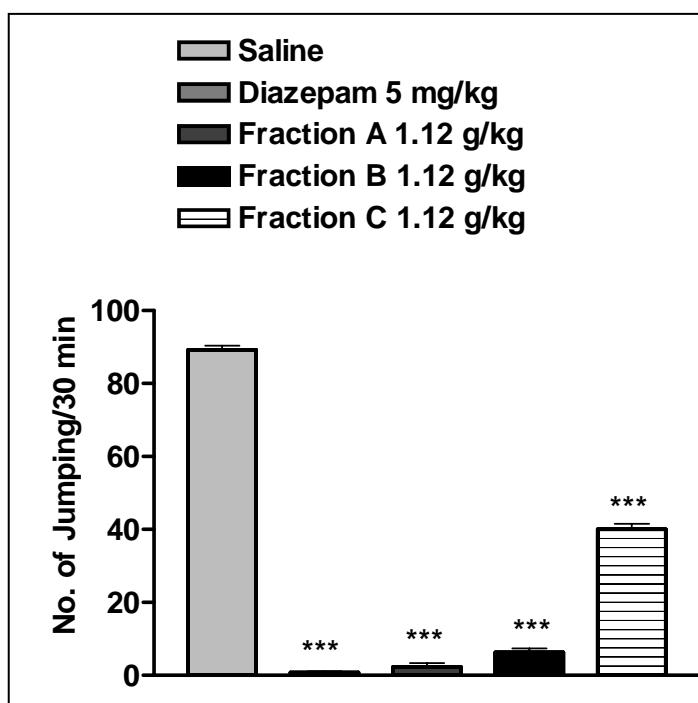
شکل شماره ۴- اثر فراکسیون آبی - الکلی (۱ به ۹) گیاه مهرخوش بر تعداد پرش‌های ناشی از سندروم محرومیت در موش. نتایج به صورت میانگین تعداد پرش‌ها + خطای معیار ۶ موش بیان شده است. مقایسه با کنترل. آزمون توکی: *** $p < 0.001$.



شکل شماره ۵- اثر فراکسیون آبی - الکلی (۲ به ۳) گیاه مهرخوش بر تعداد پرش‌های ناشی از سندروم محرومیت در موش. نتایج به صورت میانگین تعداد پرش‌ها + خطای معیار ۶ موش بیان شده است. مقایسه با کنترل. آزمون توکی: *** $p < 0.001$.

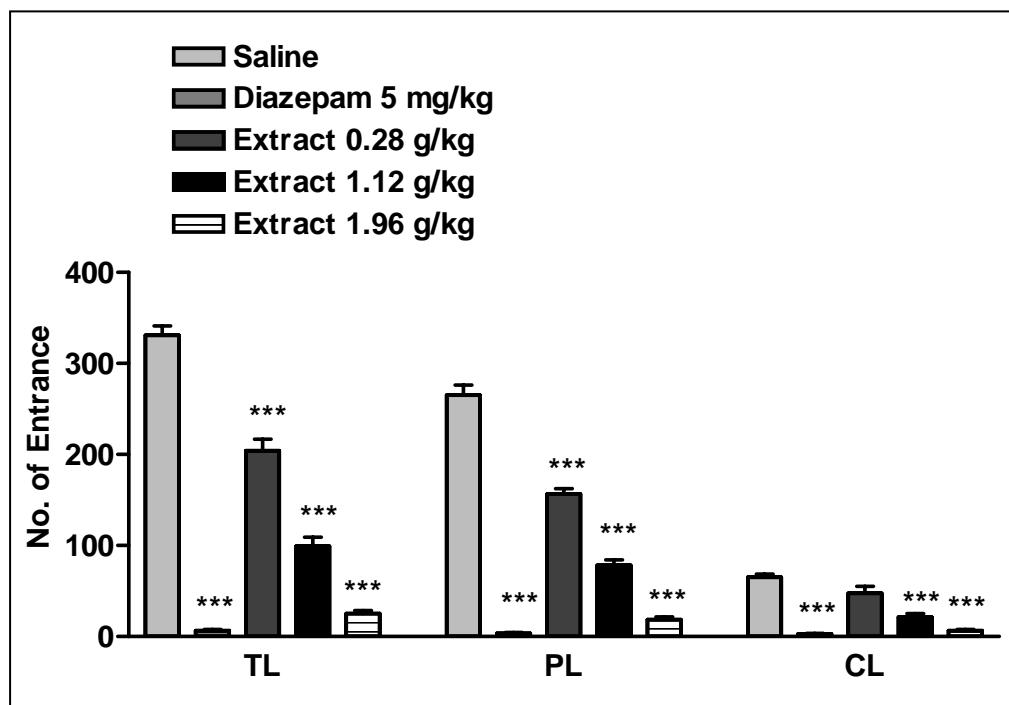


شکل شماره ۶- اثر فراکسیون کلروفرمی گیاه مهرخوش بر تعداد پرش‌های ناشی از سندرم محرومیت در موش. نتایج به صورت میانگین تعداد پرش‌ها + خطای معیار ۶ موش بیان شده است. مقایسه با کنترل. آزمون توکی: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

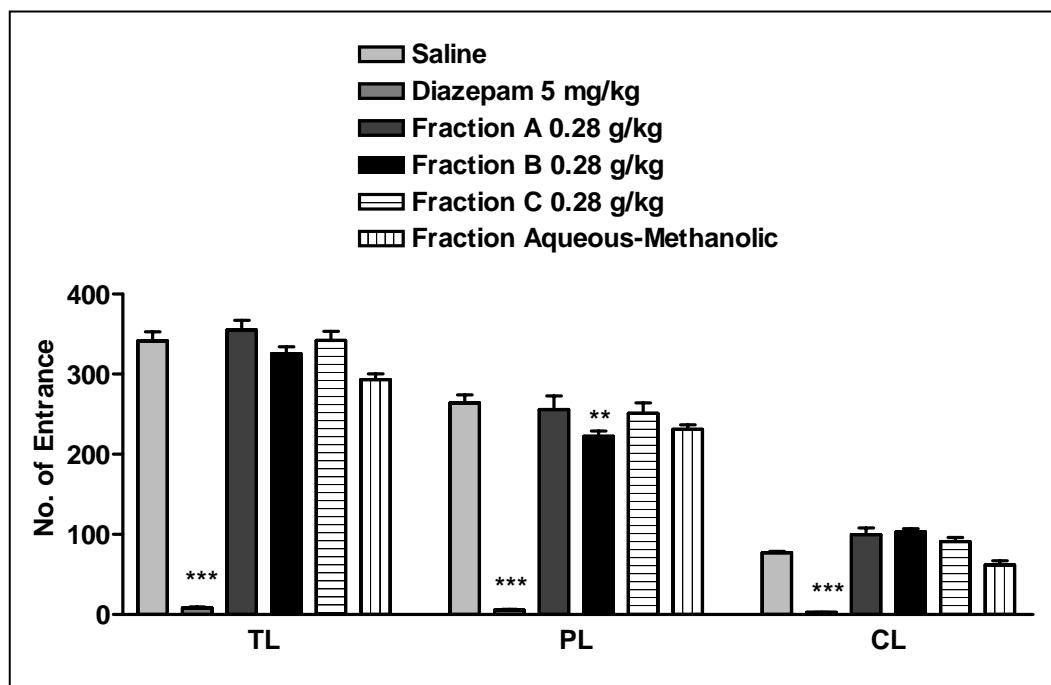


شکل شماره ۷- اثر سه فراکسیون گیاه مهرخوش جدا شده به روش MPLC بر تعداد پرش‌های ناشی از سندرم محرومیت در موش. نتایج به صورت میانگین تعداد پرش‌ها + خطای معیار ۶ موش بیان شده است. مقایسه با کنترل. آزمون توکی: *** $p < 0.001$.





شکل شماره ۸- اثر عصاره آبی تام متابولی گیاه مهر خوش بر فعالیت حرکتی رت در آزمون جعبه باز (Open-field test). داده‌ها به صورت میانگین ورود به خانه‌های جعبه باز + خطای استاندارد ۶ موش نمایش داده شده است. مجموعه حرکت در قسمت مرکزی CL (خانه‌های دور مرکز) و مجموعه حرکت در قسمت محیطی PL (خانه‌های پایه دیواره جعبه) و کل حرکات TL شمارش می‌شد. مقایسه با کنترل. آزمون توکی: *** $p < 0.001$.



شکل شماره ۹- اثر سه فراکسیون گیاه مهر خوش جدا شده به روشن MPLC بر فعالیت حرکتی رت در آزمون جعبه باز (Open-field test). داده‌ها به صورت میانگین ورود به خانه‌های جعبه باز + خطای استاندارد ۶ موش نمایش داده شده است. مجموعه حرکت در قسمت مرکزی CL (خانه‌های دور مرکز) و مجموعه حرکت در قسمت محیطی PL (خانه‌های پایه دیواره جعبه) و کل حرکات TL شمارش می‌شد. مقایسه با کنترل. آزمون توکی: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

بحث

در دوز یکسان (g/kg ۰/۲۸) عصاره کلروفرمی کمترین تاثیر را روی کاهش تعداد پرش‌ها در موش داشت به طوری که اختلاف معنی‌داری را با گروه کنترل نشان نمی‌دهد. اما فراکسیون‌های A و B حاصل از ستون سبب کاهش تعداد پرش‌ها در موش در حد دیازپام شده‌اند. یعنی قدرتی در حد دیازپام در بهبود عالیم سندرم محرومیت داشته است. البته به دلیل مقادیر کم فراکسیون‌های حاصل از ستون MPLC امکان بررسی اثر دوزهای پایین‌تر فراکسیون‌ها در کاهش تعداد پرش‌ها وجود نداشت تا بتوان کارآیی این فراکسیون‌ها را نیز با دیازپام مقایسه کرد.

در دوزهای یکسان، فراکسیون آبی - الکلی (۲ به ۳) فعالیت به مراتب بهتری را از فراکسیون کلروفرمی نشان داده است. در حالی که فراکسیون‌های اتردوپترولی و آبی - الکلی (۱ به ۹) اختلاف زیادی با یکدیگر ندارد.

برای مقایسه بهتر درصد کاهش تعداد پرش‌ها در دوز یکسان (g/kg ۰/۲۸) به ترتیب عبارت است از: فراکسیون A ۹۷/۴ درصد، فراکسیون B ۹۲/۹ درصد، فراکسیون آبی - الکلی (۲ به ۳)، ۷۴/۸ درصد، عصاره تام متابولی، ۶۴/۵ درصد، فراکسیون آبی - الکلی (۱ به ۹)، ۶۴ درصد فراکسیون اتری، ۶۱ درصد، فراکسیون C، ۵۵ درصد و فراکسیون کلروفرمی ۴/۶ درصد.

با توجه به نتایج به دست آمده شاید بتوان گفت که ترکیبات موثر موجود در فراکسیون‌ها، احتملاً نسبتاً قطعی هستند و با توجه به اثرات بهتر فراکسیون A و B نسبت به C و با توجه به سیستم حلال به کار رفته جهت شستشوی ستون، این ترکیبات درجهاتی از غیر قطبی بودن را نیز دارا هستند.

آزمایش‌های فیتوشیمیابی حضور فلاونوئیدها و ترپنوهای را در فراکسیون آبی - متابولی مشخص کرده است. بررسی‌های گوناگون نشان می‌دهد که بسیاری از فلاونوئیدها برگیرنده‌های اوپیوئیدی تاثیر دارند و اثر ضددردی مرکزی نشان داده‌اند [۲۰]. علاوه بر این ترکیبات دی‌ترپین (که درجهاتی از قطبیت را دارند) مثل *Miltirone* به عنوان آگونیست نسبی گیرنده‌های بنزوپیازپینی شناخته شده‌اند و می‌توانند عالیم سندرم محرومیت از مورفین را بهبود بخشنده [۲۱].

بر طبق نتایج به دست آمده از این تحقیق عصاره تام متابولی، فراکسیون اتردوپترولی فراکسیون آبی الکلی و فراکسیون‌های حاصل از ستون MPLC همگی سبب کاهش تعداد پرش‌های ناشی از سندرم محرومیت از مرفین در موش شدند. فراکسیون کلروفرمی کمترین اثر را نشان داد.

با توجه به این که در سندرم محرومیت سیستم‌های بسیاری تحت تاثیر قرار می‌گیرند، بنابراین اگر ماده‌ای بتواند هر یک از سیستم‌های تغییر یافته را تعديل کند و یا باعث تحریک سیستم‌های مهاری شود، می‌تواند در سندرم محرومیت نقش داشته باشد. عوامل و سیستم‌هایی همچون آدنوزین [۱۶]، سیستم آدرنرژیک [۱۷]، اسیدهای آمینه تحریکی [۱۸] و مهارکننده‌های PKC [۱۹] می‌توانند بر روی سندرم محرومیت نقش داشته باشند. بنابراین برای این که ماده‌ای بتواند عالیم سندرم محرومیت را مهار می‌کند، باید دارای عملکرد چندگانه‌ای بوده و بتواند بر یک مجموعه سیستم‌ها اثر بگذارد.

از آنجا که عصاره تام متابولی و فراکسیون‌های حاصل از گیاه مهرخوش توانسته‌اند علائم سندرم محرومیت را کنترل کنند، بنابراین عصاره گیاه مهرخوش حاوی ترکیب یا ترکیباتی است که بر یک یا چند تا از این سیستم‌های دخیل، موثر بوده‌اند.

با توجه به نتایج به دست آمده، بهترین زمان تاثیر عصاره گیاه مهرخوش، ۹۰ دقیقه پس از تزریق عصاره است و با گذشت زمان بیشتر (در زمان‌های ۱۵۰ و ۱۸۰ دقیقه قبل از تجویز) اثر عصاره کاهش می‌یابد.

با توجه به این نتیجه، تزریق عصاره در تمامی مراحل نیم ساعت پس از آخرین تزریق مورفین صورت گرفت.

نتایج نشان می‌دهد که عصاره تام متابولی به طور مشخصی سبب بهبود عالیم سندرم محرومیت از مورفین در موش شده است که این اثر در دوز بالا (g/kg ۱/۹۶) در حد دیازپام (۵ mg/kg) بوده است که این فعالیت قوی عصاره تام می‌تواند مربوط به تاثیر زیاد این عصاره روی کاهش میزان حرکات موش در آزمون حرکت و شلی عضلانی ناشی از عصاره تام باشد.



mekanisim احتمالی دیگر که سبب بهبود عالیم سندروم محرومیت شده است، احتمالاً مهار اسیدهای آمینه تحریکی توسط عصاره گیاه است. لینالول موجود در گیاه فعالیت گلوتامات را در آزمایش‌های بروون تنی (به عنوان آنتاگونیست رقابتی L - گلوتامات) و در آزمایشات درون تنی (تشنج ناشی از NMDA و Quin) را بلوك می‌کند، تعدیل می‌کند و سبب کاهش آزاد شدن گلوتامات می‌شود. لینالول علاوه بر این دارای اثرات سداتیو (وابسته به دوز)، ضدتشنج و خواب‌آوری است (که احتمالاً عامل ایجاد خواب‌آوری شدید پس از تجویز عصاره تام، در موش‌ها می‌باشد) [۲۴، ۲۵، ۲۶، ۲۷].

mekanisim دیگری که احتمالاً در تاثیر عصاره گیاه روی سندروم محرومیت مطرح است، دخالت در سیستم دوپامینزیک است. کامفر (از جمله مونوتترپن‌های موجود در ترکیبات گیاه با درصد بالا) و بورنئول، سبب مهار ترشح کاتکول آمین‌ها از جمله دوپامین می‌شوند که این اثر به دلیل اثر روی گیرنده‌های نیکوتینی استیل کولین و بلوك آنها است. به علاوه بورنئول سبب مهار ترشح نوراپی نفرين القا شده توسط DMPP (دی‌متیل ۱ و ۴ فنیل پیپرازینیوم یدید) می‌شود که خود این مساله می‌تواند سبب بهبود عالیم سندروم محرومیت شود. همچنین کامفر موجود در گیاه می‌تواند سبب مهار افزایش کلسیم القاء شده توسط DMPP شود. یعنی کاهش کلسیم داخل سلولی نیز از دیگر مکانیسم‌های احتمالی دخیل در بهبود عالیم سندروم محرومیت از مورفین در موش، توسط عصاره گیاه مهرخوش است [۲۶، ۲۷].

لينالول موجود در گیاه همچنین سبب تعدیل انتقال گاباپنتریک شده است (مهار تشنج ناشی از پیکروتوکسین و پیتیلن ترازاول) و سبب افزایش تمایل گابا به اتصال به ریپتور گابا A می‌شود [۲۸، ۲۹]. احتمالاً عصاره این گیاه از طریق تقویت سیستم گابا نیز در کاهش عالیم سندروم محرومیت موثر بوده است.

در آزمون open field عصاره تام متابولی و دیازپام برخلاف فراکسیون‌ها باعث کاهش حرکات شدنی. به نظر می‌رسد فراکسیون‌ها جدا از کاهش حرکات و سداسیون با مکانیسم‌های اختصاصی باعث مهار پرس‌های ناشی از سندروم محرومیت می‌شوند.

بعضی از مکانیسم‌های احتمالی در زیر بحث شده است. گیاه مهرخوش از گونه‌های موجود در تیره نعناع است که به طور واضحی سبب کاهش عالیم سندروم محرومیت از مورفین در موش سفید کوچک شده است. یعنی عصاره این گیاه حاوی ترکیب با ترکیباتی است که می‌توانند روی هر یک از سیستم‌های دخیل در ایجاد سندروم محرومیت تاثیر گذاشته و آن را بهبود بخشنند.

با توجه به این که عصاره گیاه مهرخوش دارای اثرات ضدالتهابی و ضددردی است، (عصاره تام متابولی در آزمون صفحه داغ اثرات ضددردی از خود نشان داده است) و اثر ضددردی آن توسط نالوکسان (آنتاگونیست گیرنده‌های اوپیوئیدی)، مهار می‌شود [۱۰]. بنابراین عصاره گیاه با تاثیر روی سیستم اوپیوئیدی و تحریک گیرنده‌های اوپیوئیدی (آگونیست) و یا تحریک رهاسازی پیتیدهای اندوژن، در سطح فوق نخاعی، سبب ایجاد اثر ضددردی و همچنین بهبود عالیم سندروم محرومیت می‌شود.

به علاوه عصاره تام متابولی (و نه فراکسیون‌ها) حاوی ترکیباتی است که سبب شلی عضلانی و در نهایت کاهش تعداد حرکات موش‌ها در آزمون حرکت شده است و از طریق این مکانیسم نیز روی کاهش تعداد پرس‌های ناشی از سندروم محرومیت موثر بوده است [۳].

لينالول مونوتترپن (با درصد بالا)، لیمونن و آلفا پینن از جمله ترکیبات موجود در گیاه هستند [۱] که تonusیته عضلات اسکلتی را با تأثیر روی سیستم cAMP کاهش می‌دهند و سبب شلی عضلانی می‌شوند [۲۲].

منابع

- 11.** Trease GE and Evans WC. *Pharmacognosy*. Bailliere Tindall Press. London. 1983, pp: 309-706.
- 12.** Rezayat M, Azizi N and Zarrindast MR. On the mechanism (s) cholecystokinin of (CCK): receptor stimulation attenuates morphine dependence in mice. *J. Pharmacol. Toxicol.* 1997; 81: 124-129.
- 13.** Ramezani M, Hosseinzadeh H and Mojtabaei K. Effects of *Ferula gummosa* Boiss. fractions on morphine dependence in mice. *J. Ethnopharmacol.* 2001; 77: 71-75.
- 14.** Pardon MC, Perez-Diaz F, Joubert C and Cohen-Salmon C. Age-dependent effects of a chronic ultramild stress procedure on open-field behaviour in B6D2F1 female mice. *Physiol. Behav.* 2000; 70: 7-13.
- 15.** Ballard TM and McAllister KH. Acutely administered clozapine does not modify naloxone-induced withdrawal jumping in morphine-dependent mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2001; 62: 285-290.
- 16.** Michalska E and Malec D. Agonist and antagonists of adenosine receptors and morphine withdrawal syndrome in rats. *Pol. J. Pharmacol.* 1993; 45: 1-9.
- 17.** Ambrosio E, Iglesias V, Garcia-Lecumberri C, Orensan L and Alguacil LF. Effect of yohimbine on the development of morphine dependence in the rat: lack of involvement of cortical beta-adrenoceptor modifications. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1997; 56: 487-491.
- 18.** Gonzalez P, Cabello P, Germany A, Norris, B. and Contreras E. Decrease of tolerance to, and physical dependence on morphine by, glutamate receptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 1997; 332: 257-262.
- 19.** Tokuyama S, Feng Y, Wakabayashi H and Ho IK. Possible involvement of protein kinases in physical dependence on opioids: study using protein kinase C inhibitors, H7 and H8. *Eur. J. Pharmacol.* 1995; 284: 101-107.
- 1.** صدری حسینعلی. ترکیب‌های شیمیایی موجود در روغن اسانس گونه مهرخوش. پژوهش و سازنده‌گی. ۱۳۷۵، شماره ۳۱، صفحات ۶۱ - ۵۹
- 2.** Hernandez-Perez M, Rabanal RM, de la Torre MC and Rodriguez B. Analgesic, anti-inflammatory, antipyretic and haematological effect of aethiopinone, an o-naphthoquinone diterpenoid from *Salvia aethiopis* roots and two hemisynthetic derivatives. *Planta Med.* 1995; 61: 505-509.
- 3.** Hosseinzadeh H and Yavari M. Anti-inflammatory effects of *Salvia leriifolia* Benth. leaf extract in mice and rats. *Pharmac. Pharmacol. Lett.* 1999; 9: 60-61.
- 4.** Hosseinzadeh H, Ramezani M and Salmani G-A. Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of *Zataria multiflora* Boiss extracts in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.* 2000; 73: 379-385.
- 5.** Hosseinzadeh H and Lari P. Effect of *Salvia leriifolia* extract on morphine dependence in mice. *Phytother. Res.* 2000; 14: 384-387.
- 6.** Cuppett SL and Hall CA. Antioxidant activity of the Labiate. *Adv. Food. Nutr. Res.* 1998; 42: 245-271.
- 7.** Wasser S, Ho JM, Ang HK and Tan CE. *Salvia miltiorrhiza* reduce experimentally-induced hepatic fibrosis in rats. *J. Hepatol.* 1998; 29: 760-771.
- 8.** Hosseinzadeh H, Haddad-Khadaparast MH and Shokohizadeh H. Antihyperglycemic effect of *Salvia leriifolia* Benth. leaf and seed extract in mice. *Irn. J. Med. Sci.* 1998; 23: 74-80.
- ۹.** زرگری علی. گیاهان دارویی. چاپ چهارم. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۱۳۷۶، جلد سوم، صفحه ۱۳۶.
- 10.** Hosseinzadeh H, Ramezani M, Fadishei M and Mahmoudi M. Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of *Zhumeria majdae* extracts in mice and rats. *Phytomedicine.* 2002; 9: 135-141.



- 20.** Anjaneyulu M and Chopra K. Quercetin, a bioflavonoid, attenuates thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2003; 27: 1001-1005.
- 21.** Lee CM, Wong HN, Chui KY, Coang TF, Hon PM and Chang HM. Miltrione, a central benzodiazepine receptor partial agonist from a chinese medicinal herbs *Salvia miltorrhiza*. *Neurosci. Lett.* 1991; 127: 241-273.
- 22.** Lis-Balchin M and Hart S. Studies on the mode of action of the essential oil of Lavender (*Lavandula angustifolia* P. Miller). *Phytother. Res.* 1999; 13: 540-542.
- 23.** Elisabetsky E, Brum LF and Souza DO. Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. *Phytomedicine* 1999; 6: 107-113.
- 24.** Brum LF, Elisabetsky E and Souza DO. Effects of linalool on [(3)H]MK801 and [(3)H] muscimol binding in mouse cortical membranes. *Phytother. Res.* 2001; 15: 422-425.
- 25.** Re L, Barocci S, Sonnino S, Mencarelli A, Vivani C, Paolucci G, Scarpantonio A, Rinaldi L and Mosca E. Linalool modifies the nicotinic receptor-ion channel kinetics at the mouse neuromuscular junction. *Pharmacol. Res.* 2000; 42: 177-182.
- 26.** Park TJ, Park YS, Lee TG, Ha, H and Kim KT. Inhibition of acetylcholine-mediated effects by borneol. *Biochem. Pharmacol.* 2003; 65: 83-90.
- 27.** Park TJ, Seo HK, Kang BJ and Kim KT. Noncompetitive inhibition by camphor of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol.* 2001; 61: 787-793.
- 28.** Julfikar HS and Koutaro H. Effects of tea components on the response of GABA_A receptors expressed in Xenopus Oocytes. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 3954-3960.

