

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

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

۱- استاد، گروه فارماکودینامی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و فارماکونوزی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم دارویی، دانشکده داروسازی مشهد

۳- داروساز

* آدرس مکاتبه: مشهد، دانشکده داروسازی، صندوق‌پستی: ۹۱۷۷۵ - ۱۳۶۵

تلفن: ۸۸۲۳۲۵۵ (۰۵۱۱)، نمابر: ۸۸۲۳۲۵۱ (۰۵۱۱)

پست الکترونیک: hosseinzadehh@mums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۴/۵/۱۰

تاریخ تصویب: ۸۵/۷/۲۱

چکیده

مقدمه: گیاه مهرخوش اثر ضددردی و 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 اویپویدی، تاثیر عصاره تام و فراکسیون‌های این گیاه بر روی سندرم محرومیت از مورفین در موش بررسی شد.

روش بررسی: جهت ایجاد وابستگی، موش را به مدت سه روز تحت تزریق مورفین 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 مورفین (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 زیر جلدی، دو ساعت پس از آخرین تزریق مورفین صورت گرفت. تزریق عصاره تام و فراکسیون‌ها نیم ساعت پس از آخرین تزریق مورفین صورت گرفت. تعداد پرش‌ها به عنوان نشانه‌ای از سندرم محرومیت به مدت نیم‌ساعت، یک دقیقه پس از تزریق نالوکسان شمارش گردید.

نتایج: عصاره متانولی تام با دوزهای ۰/۲۸ g/kg، ۱/۱۲ g/kg و ۱/۹۶ g/kg سبب کاهش تعداد پرش‌ها و بهبود علائم سندرم محرومیت (نسبت به کنترل) به صورت وابسته به دوز به ترتیب به میزان ۶۴/۵ درصد، ۸۵ درصد، ۹۹/۳ درصد شد. به منظور جداسازی اجزای گیاه، عصاره متانولی در مخلوط آب - متانول (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 مخلوط شده و ۳ فراکسیون A، B و C حاصل شد. اثر فراکسیون‌ها روی کاهش تعداد پرش‌ها در دوز ۰/۲۸ g/kg بررسی 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 علائم سندرم محرومیت از مورفین را کاهش دهند.

کل‌واژگان: سندرم محرومیت، مهرخوش، فراکسیون، وابستگی به مورفین



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 نعنای معمولاً به خاطر آثار فارماکولوژیکی‌شان 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 کاهندگی قند خون [۸] را نام برد. این گیاه دارای اسانس مرکب از کامفر و لینالول است. از قسمت‌های مختلف گیاه نیز نوعی تری‌ترپن به فرمول $C_{30}H_{40}O_3$ و دو فلاونوئید به نام‌های *Desmethoxycetauredine* و *Cirsimartine* استخراج و تعیین فرمول مولکولی شده است [۹]. نتایج تحلیل‌های نقاط اوج کوچک و بزرگ منحنی‌های حاصله، در اسانس فاز خشتی نشان می‌دهد که تقریباً به طور انحصاری، محتوی مونوترپن‌های اکسیژن‌دار (۸۸/۹ درصد) و مونوترپن‌های هیدروکربنی (۱۱/۲۸ درصد) است. دو ماده اصلی به نام‌های کامفر با ۳۹/۷ درصد و لینانول با ۴۱/۵ درصد شناسایی شدند. در میان مواد فرعی اسانس این گیاه، *Octan-3 one* با ۰/۸۲ درصد، *Bacaryophllene* با ۰/۶۳ 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 موش 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

موش سفید کوچک نر با وزن ۳۰ - ۲۵ گرم از مرکز تحقیقات علوم دارویی تهیه شد. حیوانات در اتاق ۱۲ ساعت روشنایی 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 هراریومی دانشکده داروسازی مشهد: ۳-۲۶۱۳-۱۵۳).

تهیه عصاره تام متانولی

مقدار ۱۵۰ گرم از پودر گیاه خشک را توزین کرده و به منظور تهیه عصاره تام متانولی، 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 تغلیظ عصاره، عصاره تغلیظ شده را داخل پلیت‌های از قبل توزین شده ریخته و بقیه حلال در پلیت و روی بن ماری (دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد) تبخیر شد.

جداسازی فراکسیون‌های اتردوپترولی و آبی - متانولی

عصاره تام را پس از حذف حلال و قبل از تبخیر کامل حلال در مخلوط ۱۰۰ سی‌سی آب - متانول نسبت ۱ به ۹ حل کرده، سپس با اتردوپترول داخل کیف دکانتور (هر بار با ۵۰ سی‌سی 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.

¹ *Zhumeria majdae* Rech. f. & Wendelbo



جداسازی فراکسیون‌های کلروفرمی آبی - متانولی

عصاره تام پس از حذف حلال و قبل از تبخیر کامل حلال (در مرحله تغلیظ) به نسبت ۲ به ۳ در ۱۰۰ سی سی مخلوط آب - متانول حل شده، به قیف دکانتور منتقل شده و سپس جداسازی با ۱۰۰ سی سی کلروفرم انجام شد. استخراج تا بی‌رنگ 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 MPLC^۱

ابتدا ستون پر شده توسط سیلیکاژل ($40 - 150 \mu m$) به مدت یک ساعت و با ۳۰۰ سی سی متانول ۹۹/۱ 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. سرعت جریان حلال ۵ سی سی در دقیقه انتخاب شد. در لوله‌های آزمایش ۵۸ فراکسیون با حجم ۱۰ سی سی جمع‌آوری گردید. سپس با روش کروماتوگرافی لایه نازک و با سیستم حلال کلروفرم - متانول با نسبت ۷۰ به ۳۰ جداسازی 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 - الکلی [۱۱]

الف) آزمون فلاونوئیدها: مقدار ۱ تا ۲ میلی‌لیتر از فراکسیون آبی الکلی را در دو لوله آزمایش ریخته و سپس به آن مقدار ۰/۵ ml اسید 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 الکل 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 ترپنوئیدها: روی صفحه TLC آماده یک تا دو قطره از فراکسیون آبی متانولی گذاشته، پس از خشک شدن،

معرف لیبرمن بوشاردا روی آن اسپری شد. رنگ قهوه‌ای حاصله نشان دهنده وجود ترپنوئید است.

(معرف لیبرمن بوشاردا: ۲ g دیدید پتاسیم + ۲ g ید که با 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، ۵۰ و ۷۵ mg/kg) به صورت زیرجلدی (۰/۳ ml) به ترتیب در ساعات ۸ و ۱۱ دریافت کردند. (دوز بالاتر در دوز سوم جهت جلوگیری از ایجاد سندرم 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 سندرم محرومیت در موش‌ها و شمارش پرش‌ها

سندرم 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 سندرم محرومیت است. درصد کاهش پرش‌ها نسبت به کنترل سنجیده شد.

روش بررسی اثر عصاره گیاه روی سندرم 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 ۱/۹۶ g/kg، ۱/۱۲ g/kg و ۰/۲۸ g/kg به صورت داخل صفاقی به میزان ۰/۳ ml نیم ساعت پس از

¹ Medium Pressure Liquid Chromatography



- متانولی (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 - متانولی (۲ به ۳) به رنگ قهوه‌ای روشن به دست آمد. در مرحله جداسازی فراکسیون‌ها از ۲ گرم عصاره خشک آبی - متانولی حاصل از مرحله سوم، سه فراکسیون A، B و C به وزن‌های ۰/۳ و ۰/۳ و ۰/۳ گرم به دست آمد. رنگ فراکسیون‌های حاصل از ستون زرد روشن بود.

بررسی اثر زمان تجویز عصاره تام متانولی گیاه مهرخوش روی کاهش تعداد پرش‌ها در سندرم محرومیت
بهترین زمان تجویز، نیم‌ساعت 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 متانولی

تجویز داخل صفاقی عصاره تام نشان داد که تمامی گروه‌ها به صورت وابسته به دوز (در دوزهای ۰/۲۸ g/kg، ۰/۱۲ g/kg، ۱/۹۶ g/kg) و همچنین گروه دیازپام (۵ mg/kg) (به ترتیب ۶۴/۵ درصد، ۸۵ درصد، ۹۹ درصد و ۹۸/۹ درصد) نسبت به گروه کنترل منفی باعث کاهش شدت سندرم 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 ۰/۲۸ g/kg، ۰/۱۲ g/kg و ۱/۹۶ g/kg به ترتیب ۶۱ درصد، ۸۲/۸ درصد، ۹۳ درصد به دست آمد (شکل شماره ۳).

- فراکسیون آبی - متانولی (۱ به ۹)
تجویز عصاره آبی - متانولی 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 $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ بیان شدند.
در گروه شاهد منفی، نرمال سالیین حاوی تونین ۸۰ (۵ درصد) و در گروه شاهد مثبت دیازپام با دوز ۵ mg/kg استفاده شد.

تعیین فعالیت حرکتی [۱۴، ۱۵]

آزمون جعبه باز

پس از تزریق ماده مورد بررسی این آزمون در اتاقی که شرایط اتاق نگهداری حیوانات را داشت در محفظه‌ای چوبی به طول‌های ۱۰۰ × ۱۰۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر که با رنگ سفید پوشیده شده بود انجام شد. داخل محفظه چوبی با خط‌های قرمز رنگ به ۲۵ خانه تقسیم شده بود که هر خانه ۲۰ × ۲۰ 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 قسمت مرکزی Central، Total، 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

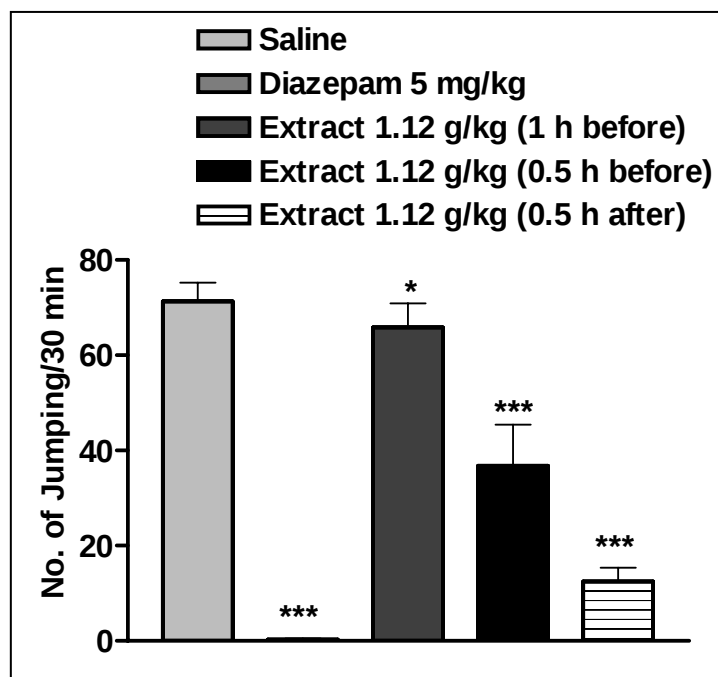
داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار گزارش شده است. پس از انجام ANOVA، و در صورت معنی‌دار بودن آن از آزمون Tukey - Kramer استفاده شد. نتایج با $p < 0.05$ به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

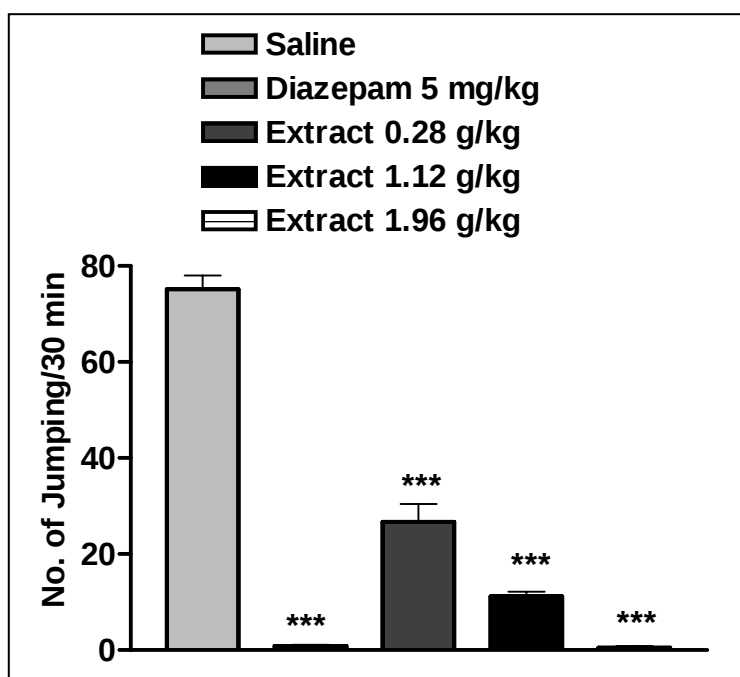
نتایج عصاره‌گیری

از ۱۵۰ گرم پودر خشک شده گیاه مهرخوش در مرحله اول عصاره‌گیری ۳۵ گرم عصاره تام متانولی به دست آمد. این عصاره تام به رنگ سبز تیره بود. در مرحله دوم عصاره‌گیری ۵ گرم عصاره خشک اتردوپترولی به رنگ قهوه‌ای و ۳۰ گرم عصاره آبی

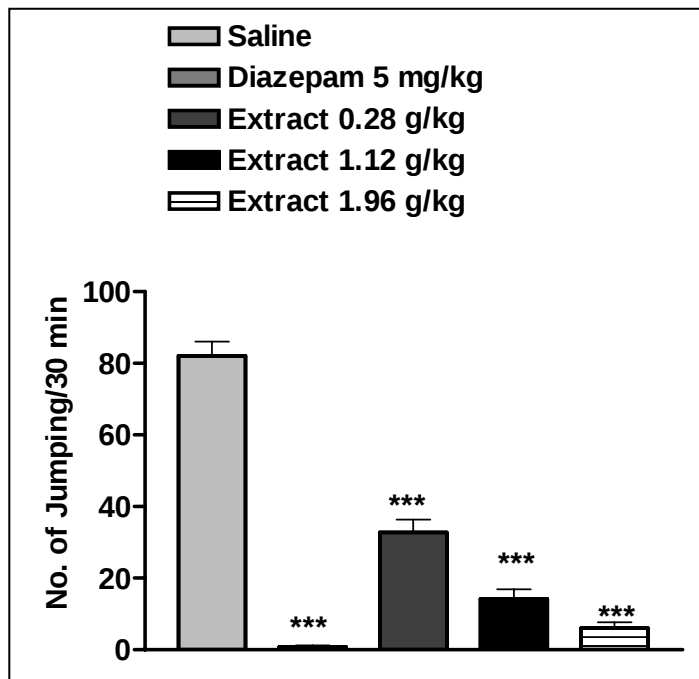




شکل شماره ۱- بررسی بهترین زمان اثر عصاره آبی تام متانولی گیاه مهرخوش بر تعداد پرش‌های ناشی از سندرم محرومیت در موش. نتایج به صورت میانگین تعداد پرش‌ها + خطای معیار ۶ موش بیان شده است. مقایسه با کنترل. آزمون توکی: $p < 0.001$ (***)، $p < 0.05$ (*).



شکل شماره ۲- اثر عصاره آبی تام متانولی 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: $p < 0.001$ (***)، $p < 0.05$ (*).



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 معیار ۶ موش بیان شده است. مقایسه با کنترل. آزمون توکی: $p < 0.001$ ***.

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 جزء، فراکسیون‌های ۱ تا ۱۳ در گروه A، ۱۴ تا ۲۱ در گروه B و فراکسیون‌های ۲۲ تا ۵۸ در گروه C با هم مخلوط 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 $97/4\%$ ، $92/9\%$ درصد و 55% درصد به دست آمد (شکل شماره ۷).

نتایج حاصل از آزمایش‌های فیتوشیمیایی

نتایج نشان می‌دهد که فراکسیون آبی - متانولی حاوی فلاونوئید و ترپنوئید است.

معنی‌داری با گروه کنترل نشان دادند. درصد کاهش تعداد پرش‌ها در دوزهای 0.28 g/kg ، $1/12 \text{ g/kg}$ ، $1/96 \text{ g/kg}$ به ترتیب $74/8\%$ درصد، 93% درصد و $97/5\%$ درصد به دست آمد (شکل شماره ۴).

فراکسیون آبی - متانولی (۲ به ۳)

نتایج نشان می‌دهد که فراکسیون آبی - متانولی (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 0.28 g/kg ، $1/12 \text{ g/kg}$ و $1/96 \text{ g/kg}$ به ترتیب 74% درصد، $83/7\%$ درصد و 96% درصد به دست آمد (شکل شماره ۵).

فراکسیون کلروفرمی

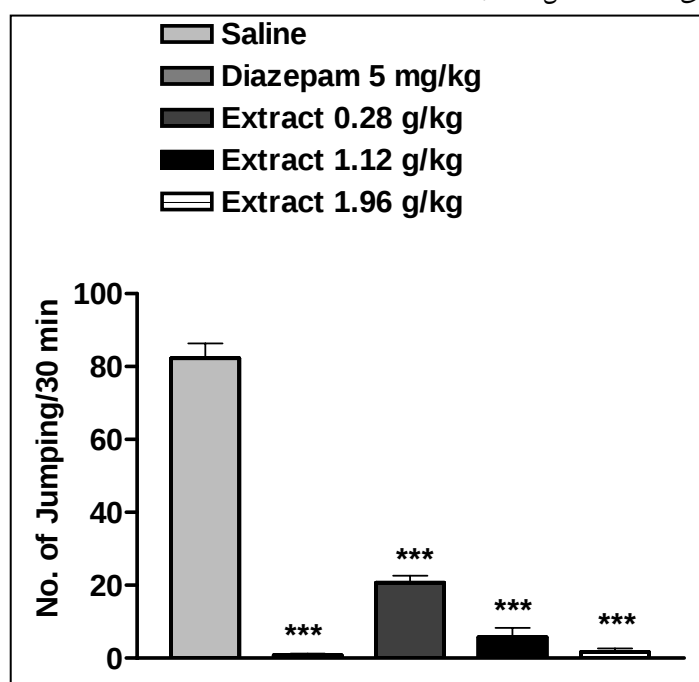
نتایج نشان می‌دهد که این فراکسیون در بالاترین دوز ($1/96 \text{ g/kg}$)، اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل منفی نشان داده است ($p < 0.001$). درصد کاهش میزان پرش‌ها در دوزهای 0.28 g/kg ، $1/12 \text{ g/kg}$ و $1/96 \text{ g/kg}$ به ترتیب $4/6\%$ درصد، $10/9\%$ درصد و 18% درصد به دست آمد (شکل شماره ۶).



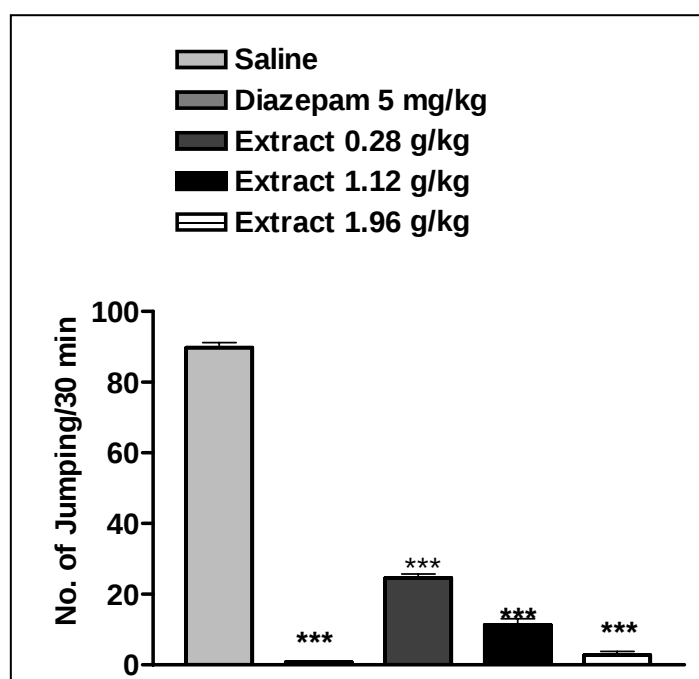
آزمون حرکت

فراکسیون‌ها عملاً روی فاکتورهای حرکتی نقشی نداشتند (شکل شماره ۹).

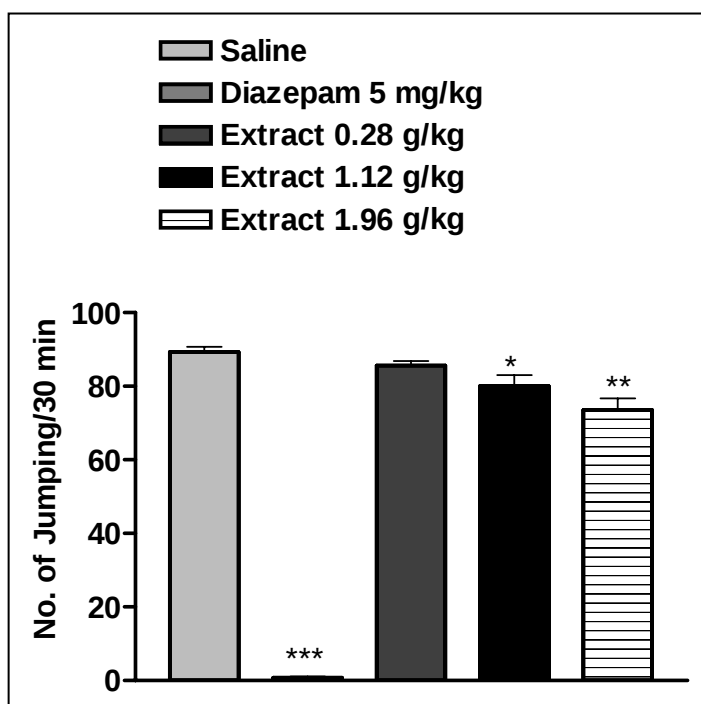
عصاره تام متانولی و کنترل مثبت دیازپام به طور عمده باعث کاهش فاکتورهای حرکتی شدند (شکل شماره ۸)، اما



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

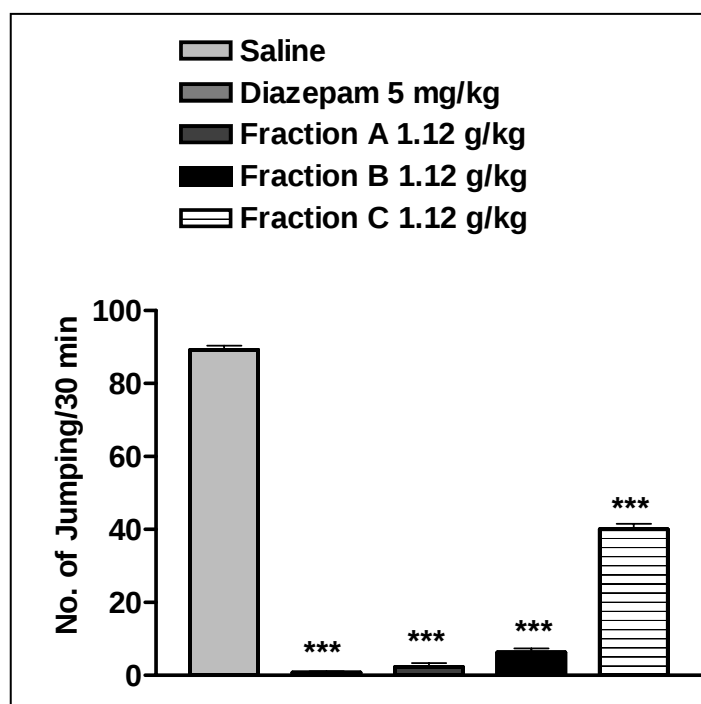


شکل شماره ۵- اثر فراکسیون آبی - الکلی (۲ به ۳) گیاه مهرخوش بر تعداد پرش‌های ناشی از سندرم محرومیت در موش. نتایج به صورت میانگین تعداد پرش‌ها + خطای معیار ۶ موش بیان شده است. مقایسه با کنترل. آزمون توکی: $p < 0.001$.



شکل شماره ۶- اثر فراکسیون کلروفومی گیاه مهرخوش بر تعداد پرش‌های ناشی از سندرم محرومیت در موش. نتایج به صورت میانگین تعداد پرش‌ها + خطای معیار

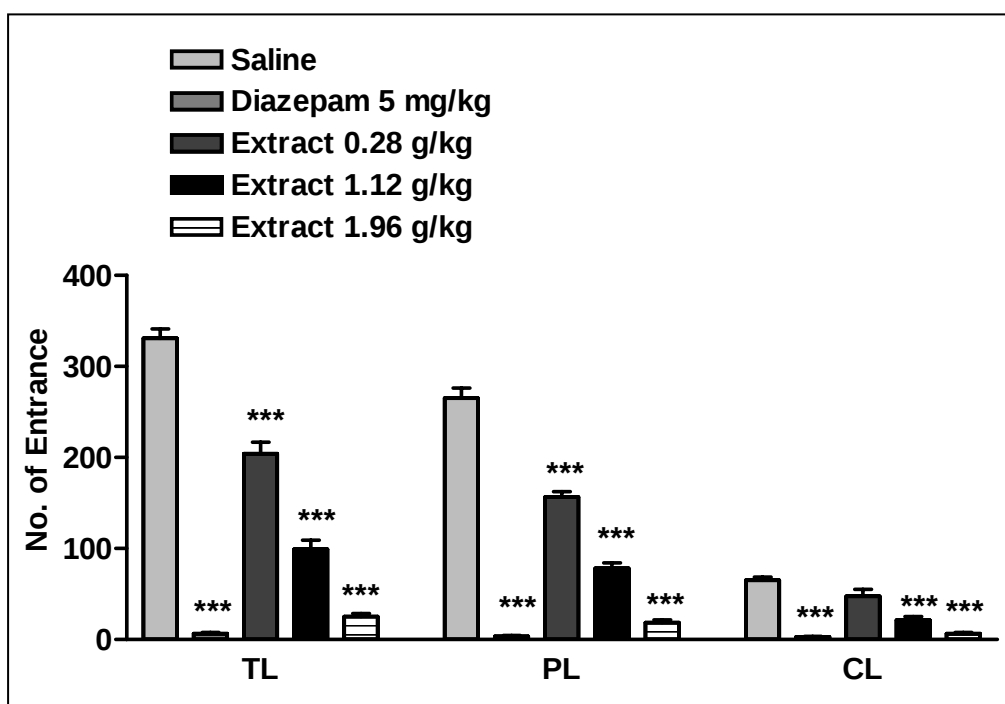
۶ موش بیان شده است. مقایسه با کنترل. آزمون توکی: $p < 0.001$; $p < 0.05$; $p < 0.01$.



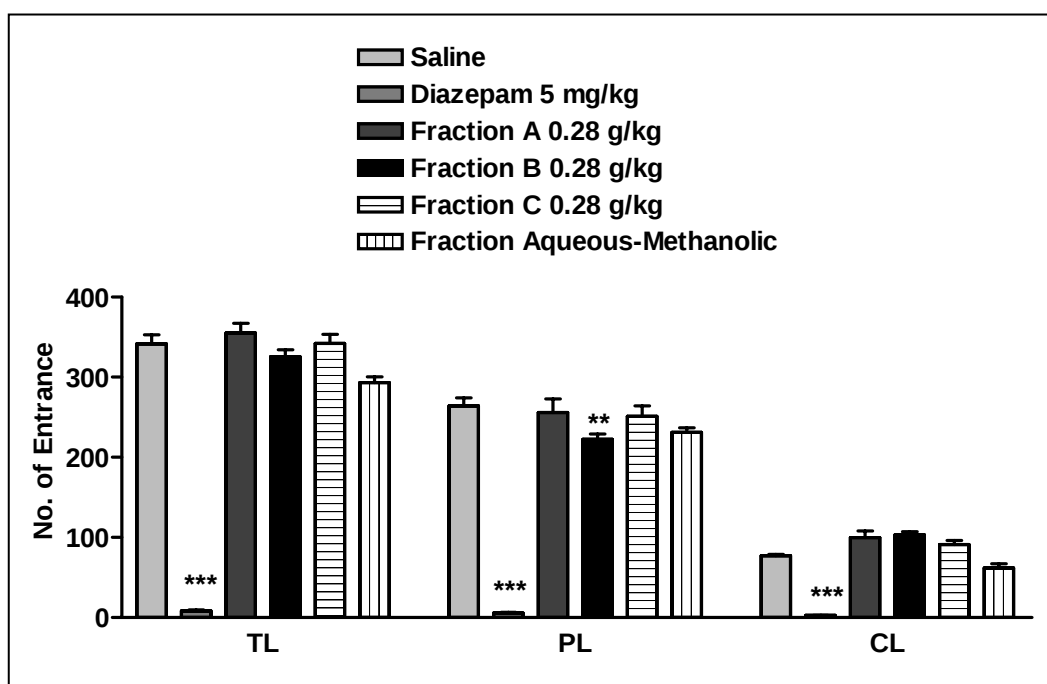
شکل شماره ۷- اثر سه فراکسیون گیاه مهرخوش جدا شده به روش MPLC بر تعداد پرش‌های ناشی از سندرم محرومیت در موش. نتایج به صورت میانگین تعداد

پرش‌ها + خطای معیار ۶ موش بیان شده است. مقایسه با کنترل. آزمون توکی: $p < 0.001$.





شکل شماره ۸- اثر عصاره آبی تام متانولی 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 خانه 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 روش 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 خانه مرکز) و مجموعه حرکت در قسمت محیطی PL (خانه‌های پایه دیواره جعبه) و کل حرکات TL شمارش می‌شد. مقایسه با کنترل. آزمون توکی. $p < 0.001$ ***، $p < 0.01$ **.

بحث

بر طبق نتایج به دست آمده از این تحقیق عصاره تام متانولی، فراکسیون اتردو پترولی فراکسیون آبی الکلی و فراکسیون‌های حاصل از ستون MPLC همگی سبب کاهش تعداد پرش‌های ناشی از سندرم محرومیت از مورفین در موش شدند. فراکسیون کلر فرمی 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 تعدیل کند و یا باعث تحریک سیستم‌های مهاری شود، می‌تواند در سندرم محرومیت نقش داشته باشد. عوامل و سیستم‌هایی همچون آدنوزین [۱۶]، سیستم آدرنژیک [۱۷]، اسیدهای آمینه تحریکی [۱۸] و مهارکننده‌های PKC [۱۹] می‌توانند بر روی سندرم محرومیت نقش داشته باشند. بنابراین برای این که ماده‌ای بتواند علایم سندرم محرومیت را مهار می‌کند، باید دارای عملکرد چندگانه‌ای بوده و بتواند بر یک مجموعه سیستم‌ها اثر بگذارد.

از آنجا که عصاره تام متانولی و فراکسیون‌های حاصل از گیاه مهرخوش توانسته‌اند علایم 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 متانولی به طور مشخصی سبب بهبود علایم سندرم محرومیت از مورفین در موش شده است که این اثر در دوز بالا ($1/96 \text{ g/kg}$) در حد دیازپام (5 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.

در دوز یکسان ($0/28 \text{ g/kg}$) عصاره کلر فرمی 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 علایم 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 کارایی این فراکسیون‌ها را نیز با دیازپام مقایسه کرد.

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

برای مقایسه بهتر درصد کاهش تعداد پرش‌ها در دوز یکسان ($0/28 \text{ g/kg}$) به ترتیب عبارت است از: فراکسیون A، $97/4$ درصد، فراکسیون B، $92/9$ درصد، فراکسیون آبی - الکلی (۲ به ۳)، $74/8$ درصد، عصاره تام متانولی، $64/5$ درصد، فراکسیون آبی - الکلی (۱ به ۹)، 64 درصد فراکسیون اتری، 61 درصد، فراکسیون C، 55 درصد و فراکسیون کلر فرمی $4/6$ درصد.

با توجه به نتایج به دست آمده شاید بتوان گفت که ترکیبات موثره موجود در فراکسیون‌ها، احتمالاً نسبتاً قطبی 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 درجاتی از غیر قطبی بودن را نیز دارا هستند.

آزمایش‌های فیتوشیمیایی حضور فلاونوئیدها و ترپنوئیدها را در فراکسیون آبی - متانولی مشخص کرده است. بررسی‌های گوناگون نشان می‌دهد که بسیاری از فلاونوئیدها برگیرنده‌های اویپوئیدی تاثیر دارند و اثر ضد درد مرکزی نشان داده‌اند [۲۰]. علاوه بر این ترکیبات دی‌ترین (که درجاتی از قطبیت را دارند) مثل *Miltirone* به عنوان آگونیست نسبی گیرنده‌های بنزودیازپینی شناخته شده‌اند و می‌توانند علایم سندرم محرومیت از مورفین را بهبود بخشند [۲۱].



در آزمون open field عصاره تام متانولی و دیازپام برخلاف فراکسیون‌ها باعث کاهش حرکات شدند. به نظر می‌رسد فراکسیون‌ها جدا از کاهش حرکات و سداسیون با مکانیسم‌های اختصاصی باعث مهار پرش‌های ناشی از سندرم 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 علائم سندرم محرومیت از مورفین در موش سفید کوچک شده است. یعنی عصاره این گیاه حاوی ترکیب با ترکیباتی است که می‌تواند روی هر یک از سیستم‌های دخیل در ایجاد سندرم محرومیت تاثیر گذاشته و آن را بهبود بخشند.

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

به علاوه عصاره تام متانولی (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 پرش‌های ناشی از سندرم محرومیت موثر بوده است [۳].

لینالول مونوترپن (با درصد بالا)، لیمونن و آلفا پینن از جمله ترکیبات موجود در گیاه هستند [۱] که تونوسیتة عضلات اسکلتی را با تاثیر روی سیستم CAMP کاهش می‌دهند و سبب شلی عضلانی می‌شوند [۲۲].

مکانیسم احتمالی دیگر که سبب بهبود علائم سندرم محرومیت شده است، احتمالاً مهار اسیدهای آمینه تحریکی توسط عصاره گیاه است. لینالول موجود در گیاه فعالیت گلوتامات را در آزمایش‌های برون تنی (به عنوان آنتاگونیست رقابتی L - گلوتامات) و در آزمایشات درون تنی (تشنج ناشی از NMDA و Quin را بلوک 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) [۲۲،۲۳،۲۴،۲۵].

مکانیسم دیگری که احتمالاً در تاثیر عصاره گیاه روی سندرم محرومیت مطرح است، دخالت در سیستم دوپامینرژیک است. کامفر (از جمله مونوترپن‌های 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 بلوک آنها است. به علاوه بورنئول سبب مهار ترشح نوراپی نفرین القا شده توسط DMPP (دی متیل ۱ و ۴ فنیل پیرازینیوم یدید) می‌شود که خود این مساله می‌تواند سبب بهبود علائم سندرم 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 علائم سندرم محرومیت از مورفین در موش، توسط عصاره گیاه مهرخوش است [۲۶،۲۷].

لینالول موجود در گیاه همچنین سبب تعدیل انتقال گابانرژیک شده است (مهار تشنج ناشی از پیکروتوکسین و پنتیلن تترازول) و سبب افزایش تمایل گابا به اتصال به رسپتور گابا A می‌شود [۲۴،۲۸]. احتمالاً عصاره این گیاه از طریق تقویت سیستم گابا نیز در کاهش علائم سندرم محرومیت موثر بوده است.



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 Mojtahedi 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, Orensanz 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.
۱. صدری حسینعلی. ترکیب‌های شیمیایی موجود در روغن اسانس گونه مهرخوش. پژوهش و سازندگی. 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 Labiatae. *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-Khodaparast MH and Shokohizadeh H. Antihyperglycemic effect of *Salvia leriifolia* Benth. leaf and seed extract in mice. *Iran. 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 miltiorrhiza*. *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 glutamat-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. Phramacol*. 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.

