Archive of SID

بررسی اثر ضددردی عصاره الکلی برگ گیاه نعناع (*Mentha piperita* Linn.) در موشهای کوچک نر بالغ آزمایشگاهی

اکرم عیدی*[۱]، عبدالحسین روستائیان[۲]، مریم عیدی[۳] و مهناز بهرامیان[۱]

[۱] تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

[۲] تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم، گروه شیمی

[۳] ورامین، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۸۷/۵/۲۸ تاریخ پذیرش: ۸۸/٤/۳۱

چکیده

برگ گیاه نعناع (*Mentha piperita* Linn.) بـه دلیـل فعالیتهـای بیولـوژیکی ماننـد درمـان اخـتلالات گوارشـی، سوءهاضـمه، ضدالتهاب، ضدباکتری و ضدویروسی در طب سنتی کاربرد دارد. در تحقیق حاضر، اثرات ضددردی عصاره اتانلی برگ گیاه نعناع در موشهای کوچک آزمایشگاهی نر بالغ ارزیابی گردید. فعالیت ضددردی با اسـتفاده از آزمـایش فرمـالین، هـات پلیـت و اسـید استیک مورد ارزیابی قرار گرفت. عصاره اتانلی به صورت درون صفاقی تزریق شد. گروههای کنترل سرم فیزیولوژیک به عنـوان حلال دریافت نمودند. نتایج تحقیق نشان داد که عصاره اتانلی فاز اولیه و ثانویه درد را در آزمایش فرمالین کـاهش مـی‌دهـد. در آزمایش هات پلیت، عصاره اتانلی آستانه درد را در مدت زمان ٦٠ دقیقه افزایش می‌دهد. عصاره اتانلی در انقباض شـکمی القـاء شده با اسید استیک فعالیت ضد دردی نشان داد. داده‌های تحقیق حاضر نشان می‌دهد که برگ گیـاه نعنـاع اثـرات ضـددردی در موشهای کوچک آزمایشگاهی دارد و پیشنهاد می‌شود که این گیاه می تواند در درمانهای آینده مورد توجه قرار گیرد.

واژه های کلیدی: نعناع، گیاه دارویی، درد، موش

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ٤٤٨٦٥٩٣٩

مقدمه

نعناع (*Mentha piperita* Linn.) گیاهی معطر و یک‌ساله از تیره Lamiaceae با پراکندگی وسیع در اکثـر نـواحی ایـران دیده می شود. نعناع علاوه بر صنایع دارویـی و عطرسـازی در طب سنتی جهـت درمـان بیماریهـای مختلفـی اسـتفاده می‌گـردد. گیـاه نعنـاع جهـت درمـان سـرماخوردگی، رفـع التهاب در نواحی دهان، حنجره، سینوسها، کبد، کیسه صفرا و درمان اختلالات سیستم گوارشـی ماننـد تهـوع، اسـهال، استفراغ، نفخ و سوءهاضمه کاربرد دارد. نعناع موجب مهـار فعالیت پریستالتیک خودبخودی، کاهش تخلیه لوله گوارش و مهـار پاسـخ القـاء شـده دپلاریزاسـیون پتاسـیم در روده می‌گردد (۱۷ و ۲۳). نعناع موجب شل‌شدن اسفنکتر مـروی تحتانی می‌شود (۲۲). منتول موجـود در گیـاه نعنـاع دارای اثرات ضدباکتریایی اسـت (۲۸). گیـاه نعنـاع دارای اثـرات هضم کننده، ضد باکتری، ضدقارچ و ضدانگل بوده، برگ و اسانس نعناع دارای ترکیبات استالدئید، آمیل الکل، استرهای منتیـــل، لیمـــون، پیـــنن، فلانـــدرن، کـــادینن، پوگلـــون، دی‌متیل‌سولفید، آلفا پینن، سابینن، ترپینولن، اوسیمن، گامـا تـرپینن، آلفـا و بتـا توجـون، سـیترونلول و ... مـی‌باشـد (۲۱،۲٤). گیـاه نعنـاع دارای تنـوعی از ترکیبـات از جملـه مونوترپن‌ها، ترپن‌هـا، تـانین‌هـا، فلاونوئیـدها و اسـیدهای فنولیک است (۲۰). گیـاه نعنـاع بـا دارا بـودن ترکیبـاتی از جمله ۱،۸-سینئول، لیمونن، لینالول و منتول دارای فعالیـت ضدباکتریایی دارد (۱۲).

درد یک تجربه حسی ناخوشآیند است که با آسـیب بـافتی ارتباط می‌یابـد. در هنگـام احسـاس درد وقـایع زیـادی در سیستم عصبی مرکزی رخ می‌دهد. اطلاعـات دریـافتی درد از طریق طناب نخاعی وارد شده و سپس در سـطوح فـوق نخاعی مختلف بـا واسـطهٔ سیسـتم لیمبیـک و عقـده‌هـای

www.SID.ir

Archive of SID

قاعده‌ای که در بـه رمـز در آوردن جنبـه‌هـای احساسـی و حرکتی پاسخ نقش کلیدی دارنـد، تنظـیم مـی‌شـوند (۱۰ و ۳۲). آنالژزیا، فقدان درد در پاسخ به محرکی اسـت کـه بـه صورت عادی دردناک اسـت. از جملـه مـواد انـدوژن کـه مکانیسمهای آنالژزیک را فعال می‌کنند، اوپیوئیدها هسـتند. اوپیوئیدها شامل انکفالین‌ها، داینـورفین‌هـا و انـدورفین‌هـا هسـتند. اُپیـات‌هـا، داروهـای آنالژزیـک کـه سـیگنالهای نوسی‌سپتیو را بدون اثر بر دیگر حسها بلوکه مـی‌کننـد، بـه همان مکانهای گیرنده‌های اوپیوئیدها شامل مو، کاپا و دلتـا متصل می‌شوند (۱۵). گرچـه مـورفین بـه عنـوان سردسـته تسکین‌دهنده‌های درد معرفی شده است، امـا اثـر آن کـاملاً بی‌خطر نمی‌باشـد (۲). خصوصـیات اعتیـادآور و عـوارض جانبی در اثر مصرف مورفین به وجـود مـی‌آیـد. عـوارض جانبی شامل مشکلات تنفسی، چرت زدن، کـاهش تحـرک معدی-روده‌ای، تهوع و تغییرات در سیستم عصبی خودکار و اندوکرین اسـت، (۲، ۳ و ۲٦). اسـتفاده طـولانی مـدت اُپیات‌ها منتهی بـه تحمـل و وابسـتگی فیزیکـی، همچنـین افزایش حساسیت نسبت به درد یـا هـایپرآلژزی مـی‌شـود. تحمـل و وابسـتگی فیزیکـی نتیجـه کـاهش در بیوسـنتز اوپیوئیدهای آندوژن یـا پـیش‌سازهایشـان در منـاطق ویـژه سیستم عصبی می‌باشـد. همچنـین افـزایش در کاتابولیسـم پپتیـدهای اوپیوئیـدی در مغـز مـی‌توانـد باعـث تحمـل و وابستگی فیزیکی شود (۲۹،۱۹،٤،٦).

تاکنون گزارشی در ارتباط با اثـرات ضـددردی گیـاه نعنـاع ارائه نشده است، لذا در تحقیـق حاضـر اثـرات ضـددردی عصاره الکلی برگ گیاه نعناع با استفاده از آزمایش فرمالین، آزمایش انقباضات شکمی و آزمایش صـفحه داغ در مـوش کوچک آزمایشگاهی مـورد بررسـی قـرار گرفتـه و اثـرات ضددردی آن گیـاه بـا داروهـای ضـددرد متـداول مقایسـه گردید. همچنین به منظور اطمینـان از ایمـن بـودن دُزهـای مورد استفاده LD_{50} عصاره الکلی گیاه نیز تعیین گردید.

مواد و روشها

جمع‌آوری و شناسایی گیاه: برگ گیاه نعناع (*Mentha piperita* L.) در خرداد ماه سال ۱۳۸٦ جمع‌آوری گردیده و پس از شناسایی از نظر تاکسونومیکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در سایه خشک شده و توسط آسیاب مکانیکی جهت تهیه عصاره گیاه به پودر تبدیل گردید. پودر خشک در کیسه‌های نایلونی تا زمان آزمایش در جای خنک نگهداری شد.

آماده‌سازی عصاره الکلی: عصاره الکلی گیاه با استفاده از دستگاه سوکسله (Suxhlet; Gerhardt, Germany) و اتانول ۸۰ درصد به دست آمده و توسط دستگاه روتاری (Rotary; Heidolph, Germany) خشک گردید.

حیوانات آزمایشگاهی: موشهای کوچک آزمایشگاهی نر بالغ (نژاد NMRI) با محدوده وزنی ۳۰ – ۲۵ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری شده و در شرایط آزمایشگاهی با درجه حرارت ۲ ± ۲۲ درجه سلسیوس و سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و نیز رطوبت نسبی ٤۰ تا ٦۰ درصد نگهداری شدند. شرایط نگهداری و انجام آزمایشها بر روی حیوانات آزمایشگاهی مطابق با قوانین بین المللی می‌باشد. حیوانات در گروههای ٦ تایی در قفسهای پلکسی‌گلاس نگهداری شدند و به استثنای زمان آزمایش به آب و غذا دسترسی داشتند. هر حیوان فقط یکبار مورد آزمایش قرار گرفت.

داروها: در تحقیق حاضر از داروهای استاندارد تسکین‌دهنده درد شامل مورفین (شرکت تماد، ایران)، ایندومتاسین (Sigma, UK) و عصاره الکلی برگ گیاه نعناع استفاده شد. تمامی تیمارها به صورت تزریق درون صفاقی انجام گردید. حجم تیمار ۰/۲ میلی‌لیتر برای هر موش و حلال مواد در تمامی تیمارها سرم فیزیولوژیک می‌باشد. فرمالین و اسید استیک جهت انجام آزمایشها استفاده گردید.

تعیین LD_{50} : به منظور تعیین دُز کشنده، تعداد ۱۰ حیوان در هر گروه انتخاب و عصاره الکلی برگ نعناع در دُزهای ۳۰۰۰، ۵۰۰۰، ٦۰۰۰ و ۷۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن

www.SID.ir

Archive of SID

بدن به صورت درون صفاقی تیمار گردیدند. میزان مرگ و میر حیوانات تا ۷۲ ساعت بعد از تزریق شمارش و LD_{50} عصاره الکلی گیاه تعیین گردید (۵).

آزمایش فرمالین: جهت انجام این آزمایش از جعبه شیشه‌ای به ابعاد ۱۳×۱۲×۳۰ سانتیمتر استفاده گردید. آیینه‌ای با زاویه ٤٥ درجه در فاصله‌ای از جعبه و سطح افق قرار گرفت، به صورتی‌که مشاهدات را آسان‌تر نماید. فرمالین به حجم ۵۰ میکرولیتر و غلظت ۲/۵ درصد استفاده گردید. تزریق فرمالین در سطح پشتی پای راست حیوان به صورت زیر جلدی انجام شد. از آنجایی که لیسیدن پای عقبی به ندرت در طی رفتار طبیعی حیوان رخ می‌دهد، پاسخی که در صورت استفاده از پای عقبی ایجاد می‌شود، در مقایسه با پای جلویی بیشتر به درد اختصاص دارد. مهم‌ترین ویژگی آزمایش فرمالین این است که جوندگان دو پاسخ به درد را نشان می‌دهند که ظاهراً دو مکانیسم مختلف دارد. مرحله اول بلافاصله بعد از تزریق فرمالین ظاهرمی‌شود که به مدت ۵-۳ دقیقه طول می‌کشد. بعد از ۵ دقیقه اول در فاصله ۱۵ دقیقه بعد از تزریق فرمالین، رفتار خاصی از خود نشان نداده و بعد از ۱۵ دقیقه، فاز دوم درد شروع می‌شود و حیوان دوباره شروع به لیسیدن کف پای عقبی مربوطه می‌پردازد که حدود ٦٠ دقیقه طول می‌کشد (۳۰، ۲۵، ۱۳).

نحوه نمره‌گذاری: اساس نمره‌گذاری به شرح زیر است :

امتیاز صفر – هر دو پنجه روی کف جایگاه قرار گرفته‌اند، وزن حیوان به طور مساوی روی آنها قرار دارد. حین حرکت نیز ترجیح اختیاری جهت استفاده از پنجه مقابل وجود ندارد.

امتیاز یک – پای تزریق شده به آرامی روی کف یا بخشی از بدن حیوان قرار گرفته و فشار کمی روی آن اعمال می‌شود. حین حرکت لنگیدن واضحی دیده می‌شود.

امتیاز دو – پای تزریق شده کاملاً از کف جعبه برداشته شد و هیچ تماسی با سطح ندارد. پای مقابل محکم روی سطح قرار گرفته است.

امتیاز سه – حیوان پای تزریق شده را می‌لیسد، گاز می گیرد یا به شدت می‌لرزاند. این حرکت به طور مشخصی با حرکات حیوان جهت تمیز کردن خودش متفاوت است، گرچه تبدیل شدن یکی به دیگری ممکن است، دیده شود.

گروههای تجربی در آزمایش فرمالین: گروه ۱ (شاهد): حیواناتی که سرم فیزیولوژیک را به عنوان حلال عصاره دریافت نمودند.

گروههای ۲، ۳، ٤ و ۵: حیواناتی که عصاره الکلی برگ گیاه نعناع را با مقادیر ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند.

گروه ٦: حیواناتی که مورفین را با دُز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند.

۱۵ دقیقه پس از هر تیمار، آزمایش فرمالین انجام گردید و رفتار حیوان نمره‌گذاری شد.

آزمایش انقباضات شکمی (Writhing test): در روز آزمایش به منظور عادت کردن حیوانات به محیط، هریک از آنها ۳۰ دقیقه قبل از شروع آزمایش در جعبه استاندارد شیشه‌ای مذکور قرار داده شدند. ابتدا عصاره اتانلی برگ نعناع که در سرم فیزیولوژیک استریل حل شده بود با دُزهای مختلف ۱، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تیمار گردید. پس از گذشت ۱۵ دقیقه اسید استیک به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن بدن با غلظت ۱ درصد تزریق شد و ۵ دقیقه پس از تزریق درون صفاقی اسیداستیک تعداد انقباضات شکمی به مدت ۲۰ دقیقه (به گونه‌ای که هر دو پای موش کاملاً کشیده گردد) شمارش گردید (۲۷، ۱۸، ۱۱).

گروههای تجربی در آزمایش اسید استیک: گروه ۱ (شاهد): حیواناتی که سرم فیزیولوژیک را به عنوان حلال عصاره دریافت نمودند.

گروههای ۵،٤،۳،۲: حیواناتی که عصاره الکلی برگ گیاه نعناع را با مقادیر ۱، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند.

www.SID.ir

Archive of SID

گروه ٦: حیواناتی که مورفین با دُز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند.

گروه ۷: موشهایی که ایندومتاسین با دُز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن را دریافت نمودند.

۱۵ دقیقه پس از تیمار، آزمایش اسید استیک انجام گردید و تعداد انقباضات شکمی در مدت زمان ۲۰ دقیقه شمارش گردید.

آزمایش صفحه داغ (hot plate): در این آزمایش، ابتدا حیوانات با ماده مورد نظر به حجم ۰/۲ میلی‌لیتر به صورت درون صفاقی تیمار شدند. موشها بلافاصله بعد از تزریق (دقیقه صفر) و نیز در دقایق ۱۵، ۳۰، ٤٥ و ٦۰ بر روی صفحه داغ با دمای ٥٦ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و زمان عکس‌العمل روی صفحه داغ (Edenbridge kent TN8 6HE, England) اندازه‌گیری شد. عکس‌العمل حیوان شامل پریدن یا لیسیدن یکی از پنجه‌های عقبی یا جلویی می‌باشد. برای جلوگیری از آسیب بافتی، اگر حیوانات بعد از ۲۰ ثانیه هیچ‌گونه واکنشی نداشتند از روی صفحه برداشته شدند (۱٤، ۷، ۱).

جدول ۱- اثر تزریق درون صفاقی عصاره الکلی برگ گیاه نعناع بمنظور تعیین LD_{50}

دُز (میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)	تعداد حیوانات کشته شده در ساعتهای مختلف پس از تزریق								باقیمانده
	۰/٥	۱	٤	۸	۱۲	۲٤	٤۸	۷۲	
٤۰۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲	۰	۸
٥۰۰۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۲	۱	٥
٦۰۰۰	۱	۰	۰	۰	۱	۳	۲	۰	۳
۷۰۰۰	٤	۰	٦	۰	۰	۰	۰	۰	۰

تعداد حیوانات در هر گروه = ۱۰ سر

گروههای تجربی در آزمایش صفحه داغ: گروه ۱ (شاهد): حیواناتی که سرم فیزیولوژیک را به عنوان حلال عصاره دریافت نمودند.

گروههای ۲، ۳ و ٤: حیواناتی که عصاره الکلی برگ نعناع را با مقادیر ۱۰، ٥۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند.

گروه ٥: حیواناتی که مورفین را با دُز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند.

پس از گذشت ۱٥ دقیقه، آزمایش صفحه داغ انجام گردید و زمان عکس‌العمل روی صفحه داغ اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری داده‌ها : تمامی داده‌ها از نظر آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 10 و از طریق آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و آزمون Tukey بررسی گردیدند. ملاک استنتاج آماری $p< ۰/۰٥$ درنظر گرفته شد. نتایج به صورت Mean±S.E.M. ارائه گردید. نمودارها با استفاده از برنامه Excel 2007 تهیه گردید.

نتایج

نتایج تحقیق حاضر در دُز ٥۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به عنوان LD_{50} عصاره الکلی برگ گیاه نعناع تعیین شد (جدول ۱).

در تحقیق حاضر عصاره الکلی برگ گیاه نعناع در دُزهای ٥۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن همانند مورفین موجب کاهش معنی‌داری در پاسخهای ظاهر شده در فاز اولیه و ثانویه درد القاء شده توسط آزمایش فرمالین گردید (نمودارهای ۱ و ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

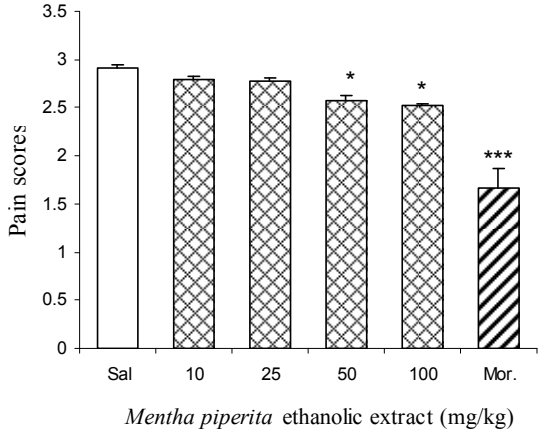
با این مطالعات مشخص گردید که تزریق درون صفاقی عصاره الکلی برگ گیاه نعناع در دُزهای ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب کاهش درد القاء شده توسط اسید استیک در موش نر بالغ می‌گردد. مورفین در دُز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و ایندومتاسین در دُز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب کاهش درد می‌گردد (نمودار ۳).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تزریق درون صفاقی عصاره الکلی برگ گیاه نعناع در دُزهای ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن باعث تأخیر در پاسخ القاء شده توسط صفحه داغ در موش نر بالغ می‌گردد (نمودار ٤).

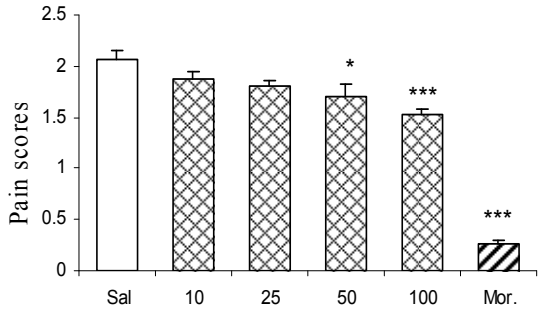
بحث

در تحقیق حاضر ابتدا، سمیت عصاره الکلی برگ گیاه نعناع جهت قضاوت بر ایمن بودن دُزهای مؤثر بر اثرات ضددردی تعیین گردید. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میزان LD_{50} در ۷۲ ساعت پس از تیمار درون صفاقی عصاره الکلی برگ گیاه نعناع ۵۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن می‌باشد. لذا گیاه دارای سمیت بسیار اندک بوده و دُزهای موثر بر تسکین درد ایمن هستند.

این تحقیقات در خصوص اثرات ضددردی عصاره الکلی برگ گیاه نعناع حاکی از آن است که عصاره الکلی در دُزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت وابسته به دُز، فاز اولیه و ثانویه درد القاء شده توسط آزمایش فرمالین را به صورت معنی‌داری کاهش می‌دهد.



نمودار ۱- اثر تیمار درون صفاقی مورفین (Mor.) در دُز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و عصاره الکلی برگ گیاه نعناع در دُزهای ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر فاز اولیه درد القاء شده توسط آزمایش فرمالین. حیوانات کنترل سرم فیزیولوژیک (Sal.) دریافت نمودند. هر ستون Mean±S.E.M. را نشان می‌دهد. تعداد حیوانات در هر گروه ٦ سر می‌باشد. $p<$ ۰/۰۵ *، $p<$ ۰/۰۰۱ *** اختلاف پاسخ به درد را از گروه کنترل نشان می‌دهد.

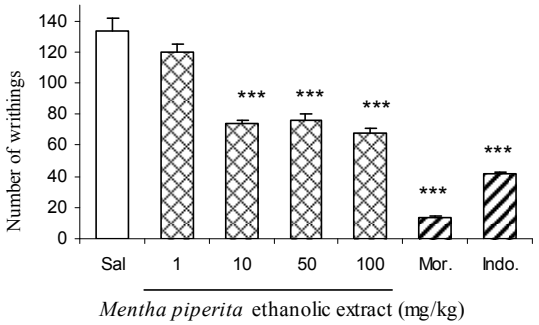


نمودار ۲- اثر تیمار درون صفاقی مورفین (Mor.) در دُز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و عصاره الکلی برگ گیاه نعناع در دُزهای ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر فاز ثانویه درد القاء شده توسط آزمایش فرمالین. حیوانات کنترل سرم فیزیولوژیک (Sal.) دریافت نمودند. هر ستون Mean±S.E.M. را نشان می‌دهد. تعداد حیوانات در هر گروه ٦ سر می باشد. $p<$ ۰/۰۵ *، $p<$ ۰/۰۰۱ *** اختلاف پاسخ به درد را از گروه کنترل نشان می‌دهد.

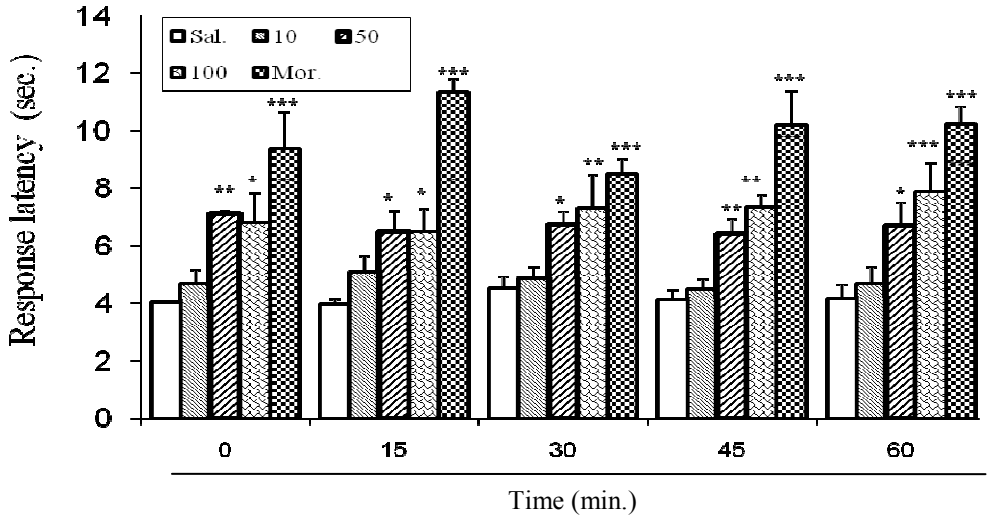
www.SID.ir

Archive of SID

میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و عصاره الکلی برگ گیاه نعناع در دُزهای ۱، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلو گرم وزن بدن بر درد القاء شده توسط اسید استیک در موش کوچک آزمایشگاهی نر بالغ. حیوانات گروه شاهد سرم فیزیولوژیک (.Sal) دریافت نمودند. تعداد حیوانات در هر گروه ٦ سر می‌باشد. نتایج به صورت Mean±S.E.M. ارائه گردید.۰/۰۰۱ >p *** اختلاف پاسخ به درد را از گروه کنترل نشان می‌دهد.



نمودار ۳- اثر تزریق درون صفاقی مورفین (.Mor) در دُز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، ایندومتاسین (.Indo) در دُز ۱۰



نمودار ٤ – اثر تزریق درون صفاقی مورفین (.Mor) در دُز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و عصاره الکلی برگ گیاه نعناع در دُزهای ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در مدت زمان تاخیر در پاسخ القاء شده توسط صفحه داغ در موش کوچک آزمایشگاهی نر بالغ. آزمایش صفحه داغ بلافاصله پس از تزریق عصاره (دقیقه صفر) و همچنین در دقایق ۱۵، ۳۰، ٤٥ و ٦٠ پس از تزریق عصاره انجام گردید. تعداد حیوانات در هر گروه ٦ سر می‌باشد. نتایج به صورت Mean ± S.E.M ارائه گردیده است. ۰/۰۰۱ >p *** اختلاف پاسخ به درد را از گروه کنترل نشان می‌دهد.

عصاره الکلی در دُزهای ۱۰ ، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت وابسته به دُز بروز انقباضات شکمی القاء شده با اسید استیک را به صورت معنی‌داری در موش کوچک آزمایشگاهی کاهش می‌دهد. عصاره الکلی گیاه در دُزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تغییر معنی‌داری در مدت زمان تأخیر در پاسخ القاء شده توسط آزمون صفحه داغ ایجاد می‌نماید. با توجه به نتایج تحقیق حاضر و از آنجایی که عصاره گیاه بر فاز اولیه درد القاء شده توسط آزمایش فرمالین و پاسخ القاء شده توسط آزمون صفحه داغ تأثیر معنی‌داری دارد، بنابراین گیاه دارای اثرات ضددردی مرکزی می‌باشد. از طرف دیگر عصاره گیاه فاز ثانویه درد القاء شده توسط آزمایش فرمالین و بروز پاسخ انقباضات شکمی القا شده با اسید استیک را به صورت معنی‌داری کاهش می‌دهد، بنابراین گیاه دارای اثرات ضددردی محیطی می‌باشد. با توجه به نتایج این تحقیق دُز مطلوب عصاره گیاه ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم

www.SID.ir

Archive of SID

وزن بدن تعیین گردید. دُزهای مذکور حداقل میزانی است که می‌تواند پاسخ معنی‌داری در کاهش درد القاء شده در هر سه آزمایش به کار رفته (آزمایش فرمالین، اسید استیک و صفحه داغ) ایجاد نماید.

آزمایش فرمالین برای نخستین بار در سال ۱۹۷۷ توسط Dubuisson و Dennis در گربه و رت استفاده گردید. اغلب آزمایش‌هایی که برای ارزیابی درد مورد استفاده قرار می‌گیرد از قبیل آزمایشهای hot-plate و tail-flick براساس محرک حاد و با شدت زیاد می‌باشد (۱۳). مهم‌ترین ویژگی آزمایش فرمالین این است که جوندگان دو نوع پاسخ به درد را نشان می‌دهند که ظاهراً از طریق دو مکانیسم مختلف عمل می‌کنند. مرحله اول بلافاصله بعد از تزریق فرمالین ظاهر می‌شود که به مدت ۵ دقیقه طول می‌کشد. ظاهراً این درد به علت تحریک شیمیایی مستقیم گیرنده‌های درد است. شواهد نشان می‌دهد که فرمالین، به خصوص فعالیت رشته‌های C را زیاد می‌کند و عمل آن از طریق فیبرهای A-δ صورت نمی‌گیرد. در فاصله ۱۵ دقیقه بعد از تزریق فرمالین، حیوان رفتار خاصی از خود نشان نمی‌دهد، بعد از ۲۰-۱۵ دقیقه فاز دوم درد شروع می‌شود و حیوان دوباره شروع به لیسیدن پای مربوطه را ادامه می‌دهد که حدوداً ٤٠ دقیقه طول می‌کشد (۱۳).

در آزمایش انقباضات شکمی، اسید استیک تزریق شده به صورت درون‌صفاقی موجب افزایش پروستاگلاندین‌ها ($PGF_{2\alpha}$) در سطح مایع صفاقی می‌گردد و بخشی از گیرنده‌های صفاقی را درگیر می‌نماید و سبب القاء درد التهابی توسط القاء نفوذپذیری مویرگی می‌گردد. اگر چه این آزمایش کاملاً تخصصی نمی‌باشد ولی روش بسیار حساسی برای نشان دادن اثرات ضددردی پیچیده می‌باشد. اثرات مشاهده شده همچنین پیشنهاد می‌کنند که احتمالاً پروستاگلاندین‌ها در عمل ضددردی گیاهان مورد بررسی درگیر شده باشند. فعالیت ضددردی آگونیست اوپیوئیدی، پارشیال آگونیست و نمایندگان ضدالتهابی غیراستروئیدی را می‌توان بوسیله آزمایش انقباضات شکمی شناسایی نمود.

این روش به طور طبیعی برای مطالعه فعالیت ضددردی محیطی داروها کاربرد دارد. آزمایش انقباضات شکمی القاء شده با اسید استیک معتبر، قابل اجراء و آسان بوده و قابلیت ایجاد سریع درد محیطی را دارا می‌باشد. به منظور تشخیص فعالیت ضددردی محیطی و مرکزی عصاره برگ گیاه نعناع پاسخ انقباضات شکمی القاء شده با اسید استیک در موش نر بالغ آزمایش گردید. این روش نه تنها آسان و معتبر می‌باشد بلکه توانایی سریع ایجاد درد محیطی وابسته به دُز را نیز دارد (۳۱).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره برگ نعناع به طور معنی‌داری پاسخ اسید استیک را به صورت وابسته به دُز مهار نموده است. انقباضات شکمی وابسته به حساسیت گیرنده‌های درد به پروستاگلاندین‌ها می‌باشد. بنابراین احتمالاً گیاهان مورد استفاده اثرات ضددردی خود را از طریق سنتز مهارکنندگان یا فعالیت پروستاگلاندین‌ها القاء می‌نماید. عملکرد ضددردی این گیاهان احتمالاً ناشی از سرکوب پروستاگلاندین اکسیژناز و تنظیم گیرنده‌های درد می‌باشد (١٦).

آزمایش صفحه داغ یک مدل درد حاد فوق نخاعی است. خصوصیات اصلی این آزمایش توانایی فراهم‌آوردن بررسی مستقیم و با دقت پاسخ جانور متعاقب پاره تیمارها، همچنین کاربرد ساده و بسیار پذیرفته شده آن است. به خوبی شناخته شده است که درد حاد هم در جانوران و هم در انسان شرایطی است که به پاتولوژی مرتبط نیست، بنابراین بی‌شباهت به درد التهابی و نوروپاتیک که در آنها علائم ثابت بیماری توسعه می‌یابند، مدل‌های درد حاد رفتارهای دفاعی خود به خود ایجاد می‌کنند (۸).

ترکیبات شیمیایی بسیاری از گیاهان با خصوصیات ضددردی و ضدالتهابی شناسایی شده‌اند که از جمله می‌توان به گروه فنانترن موجود در آلکالوئیدها، کانابینوئیدها، سالیسین و سالیسیک اسید و تعداد وسیعی از آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، کاپساسینوئیدها، استروئیدها،

www.SID.ir

Archive of SID

فلاونوئیدها، گزانتین‌ها، تامین‌ها، گزافتون‌ها، لیگاندها، ساپونین‌ها ، لاکتون‌ها و گلیکوزیدها اشاره نمود (۹).

نتیجه کلی حاصل از پژوهش حاضر، تأیید استفاده سنتی از گیاه نعناع در تسکین درد می‌باشد. براساس نتایج تحقیق حاضر عصاره الکلی برگ گیاه نعناع دارای اثرات ضددردی مرکزی و محیطی به صورت وابسته به دُز در مدلهای درد القاء شده توسط آزمایش فرمالین، اسید استیک و صفحه داغ است. اثرات ضددردی گیاه نعناع را بر اساس گزارشات موجود می‌توان به برخی از ترکیبات موجود در گیاه نسبت داد، ولی جهت روشن‌شدن مکانیسم عمل گیاه و تعیین ترکیبات مؤثر در عملکرد آن نیاز به تحقیقات بیشتری می‌باشد.

منابع

1. Adzu, B., Amos, S., Kapu, S.D., Gamaniel, K.S., 2003. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of Sphaeranthus senegalensis. Journal of Ethnopharmacology. 84: 169-173.
2. Almeidal, R.N., Navarro, D.S., Barbosa-Filho, J.M., 2001. Plants with central analgesic activity. Phytomedicine. 8: 310-318.
3. Andersen, G., Christrup, L., Sjogren, P., 2003. Relationships among morphine metabolism, pain and side effects during long-term treatment: an update. Journal of Pain and Symptom Management. 25(1): 74-91.
4. Angst, M.S., Clark, J.D., 2006. Opioid-induced hyperalgesia: a qualitative systematic review. Anesthesiology. 104: 570-587.
5. Bodi, T., Nodine, J.H., 1964. Clinical techniques for evaluation of anti-anxiety drugs. In: Nodine, J.H., Siegler, P.E. (Eds.), Animal and Clinical Pharmacologic Techniques in Drug Evaluation, 1st ed. Yearbook Medical, USA, pp. 325-329.
6. Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., 2002. Differential mechanisms of morphine antinociceptive tolerance revealed in (beta) arrestin-2 knock-out mice. Journal of Neuroscience. 22: 10494-10500.
7. Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R., Peppel, K., Caron, M.G., Lin, F.T., 1999. Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. Science. 286: 2495-2498.
8. Casarrubea, M., Sorbera, F., Crescimanno, G., 2006. Effects of 7-OH-DPAT and U99194 on the behavioral response to the hot plate test in rats. Physiology & Behavior. 89: 552-562.
9. Caterina, M.J., Rosen, T.A., Tominaga, M., 1991. A capsaicin receptor homologue with a high threshold for noxious heat. Nature. 398: 436-441.
10. Chen, C.L., Broom, D.C., Liu, Y., de Nooji, J.C., Li, Z., Cen, C., Samad, O.A., Jessell, T.M., Woolf, C.J., Ma Q., 2006. Runx1 determines nociceptive sensory neuron phenotype and is required for thermal and neuropathic pain. Neuron. 49: 365-377.
11. Collier, H.D.J., Dinnin, L.C., Johnson, C.A., Schneider, C., The abdominal response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. British Journal of Pharmacology Chemotherapies. 32: 295-310.
12. Duarte, M.C., Figueira, G.M., Sartoratto, A., Rehder, V.L., Delarmelina, C., 2005. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology. 97: 305–311.
13. Dubuisson, D., Dennis, S.G., 1977. The fomalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rat and cats. Pain. 4: 161-174.
14. Eddy N.B., Leimback D., 1953. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. J. Pharmacol. Exp. Ther. 107: 385-393.
15. Ekman, L., 2002. Neuroscience, 2nd Edition, pp. 135-151.
16. Ferreira, S.H., 1972. Prostaglandins aspirin-like drugs and analgesia. Nature new biology. 240: 200-203.
17. Fonseka-Kruel, V.S., Fernandes, P.V., 2003. Coleção de Plantas Medicinais, Wrst ed. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
18. Fukawa, K., Kawano, O., Hibi, M., Misaki, N., Ohba, S., Hatanaka, Y., 1980. A method for evaluating analgesic agents in rats. Journal of Pharmacological Methods. 4: 251-259.
19. Gardell, L.R., King, T., Ossipov, M.H., Rice, K.C., Lai, J., Vanderah, T.W., 2006. Opioid receptor–mediated hyperalgesia and antinociceptive tolerance induced by sustained opiate delivery. Neuroscience Letters. 396: 44-49.
20. Guedón, D.J., Pasquier, B.P., 1994. Analysis and distribution of Xavonoid glycosides and rosmarinic acid in 40 *Mentha piperita* clones. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 42: 679-684.
21. Inoue, T., Sugimoto, Y., Masuda, H., Kamei, C., 2002. Antiallergic effect of flavonoid glycosides obtained from *Mentha piperita* L. Biology Pharmaceutical Bulletin. 25: 256-258.
22. Melzer, J., Rosch, W., Reichling, J., Brignoli, R., Saller, R., 2004. Metaanalysis: phytotherapy of

www.SID.ir

Archive of SID

functional dyspepsia with the herbal drug preparation STW 5 (Iberogast). Aliment Pharmacology Therapeutic. 20: 1270-1287.
23. Mizuno, S., Kato, K., Ono, Y., Yano, K., Kurosaka, H., Takahashi, A., 2006. Oral peppermint oil is a useful antispasmodic for double-contrast barium meal examination. Gastroenterology Hepatology. 21: 1297-1301.
24. Nair, B., 2001. Final report on the safety assessment of Mentha piperita (Peppermint) oil, *Mentha piperita* (Peppermint) leaf extract, *Mentha piperita* (Peppermint) leaf, and *Mentha piperita* (Peppermint) leaf water. International Journal of Toxicology. 20: 61-73.
25. Nakano, H., Minami, T., Abe, K., Arai, T., Tokumura, M., Ibii, N., Okuda-Ashitaka, E., Mori, H., Ito, S., 2000. Effect of intrathecal nocistatin on the formalin-induced pain in mice versus that of nociceptin/orphanin FQ. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 292: 331-336.
26. Paice, J.A., 2007. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Pharmacogenomics of Opioids. Pain Management Nursing. 8: S2-S5.
27. Ribeiro, R.A., Vale, M.L., Thomazzi, S.M., Paschoalato, A.B., Poole, S., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., 2000. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. European Journal of Pharmacology. 387: 111-118.
28. Schuhmacher, A., Reichling, J., Schnitzler, P., 2003. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped herpes simple virus type 1 and type 2 in vitro. Phytomedicine. 10: 504-510.
29. Towett, P.K., Kanui, T.I., Juma, F.D., 2006. Stimulation of mu and delta opioid receptors induces antinociception in the hot plate test in the naked mole-rat (Heterocephalus glaber). Brain Research Bulletin. 71: 60-68.
30. Tsuda, M., Ueno, S., Inoue, K., 1999. Evidence for the involvement of spinal endogenous ATP and P_2X receptors. Br. J. Pharmacol. 128: 1497-1504.
31. Vogel, H.G., 1997. Drug discovery and evolution. Pharmacological Assays. 32: 402-403.
32. Walsh, L.J., 2003. Mast cell and oral inflammation. Critical reviews in oral biology & medicine. 14: 188-198.

Antinociception effects of ethanolic extract of *Mentha piperita* leaves in adult male mice

Eidi A.[1], Rustaiyan A.H.[2], Eidi M.[3] and Bahramian M.[1]

[1] Biology Dept., Science & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of IRAN
[2] Chemistry Dept., Science & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of IRAN
[3] Biology Dept., Varamin Branch, Islamic Azad University, Varamin, I.R. of IRAN

Abstract

In the popular medicine, *Mentha piperita* leaves are used to treat flatulence, vomiting, indigestion and stomach cramps. It is also recognized for its anti-inflammatory, antibacterial and antiviral activities. To determine the antinociceptive effects of *Mentha piperita* leaves, we investigated the effects of plant ethanolic extract in adult male NMRI mice. Antinociceptive activity was done by using formalin, hot plate and writhing tests. The ethanolic extract was injected intraperitoneally. The control groups were administered saline as vehicles of ethanolic extract. The results showed that the ethanolic extract decreased the both first and second phases of pain in formalin test. In hot plate test, the extract raised pain threshold during 60 min. The ethanolic extract exhibited antinociceptive activity against writhing-induced by acetic acid. The present data indicates that the *Mentha piperita* leaves may have analgesic effects in mice and the plant should be considered in future therapeutic researches.

Keywords: *Mentha piperita*; medicinal plant; pain; mice

www.SID.ir